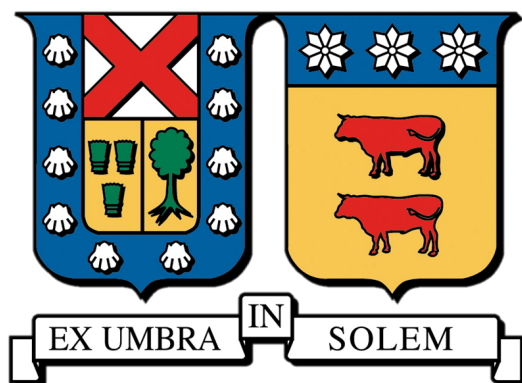


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL



EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DESDE
ORUJO DE ARÁNDANO MEDIANTE ULTRASONIDO

MANUEL IGNACIO BENÍTEZ FAJARDO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

Profesor Guía: GONZALO NÚÑEZ MONTOYA
Profesores Co-referentes: FRANCO ESPINOZA CARTAGENA
ANDREA CARVAJAL GUEVARA

junio, 2026



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☒ Memoria o trabajo de título ☐ Tesis de Postgrado

Título del trabajo:

Extracción de compuestos bioactivos desde orujo de arándano mediante ultrasonido

Nombre del candidato: Manuel Ignacio Benítez Fajardo

Carrera / Grado: Ingeniería Civil Química

Campus: San Joaquín Departamento: Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Gonzalo Alexis Núñez Montoya, en mi calidad de profesor guía/director del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

☒ El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 08/07/2026

Firma: 

Estudiante o Candidato:

Fecha: 08/07/2026

Firma: 

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

Resumen

El creciente volumen de residuos agroindustriales generado por la industria de berries plantea la necesidad de estrategias de revalorización orientadas a recuperar compuestos bioactivos de alto valor. En particular, el orujo de arándano contiene una fracción importante de polifenoles y otros fitoquímicos con actividad antioxidante, susceptibles de ser recuperados mediante procesos de extracción adecuados. En este trabajo se estudió la revalorización del orujo de arándano mediante maceración hidroetanólica convencional y extracción asistida por ultrasonido (UAE).

La maceración se evaluó mediante metodología de superficie de respuesta, utilizando un diseño central compuesto centrado en las caras, con el fin de optimizar el contenido de polifenoles totales extraídos (TPC, mg GAE/g DW) y el rendimiento total de extracción. Como variables independientes se consideraron el tiempo de extracción, la temperatura y la concentración de etanol en la mezcla hidroetanólica. El tiempo de extracción se evaluó en el intervalo de 20 a 60 min, la temperatura en el rango de 20 a 60 °C, y la concentración de etanol entre 20 y 80% v/v. Los modelos ajustados permitieron determinar condiciones óptimas distintas para ambas respuestas. La mayor recuperación de polifenoles se obtuvo a $t = 60$ min, $T = 60$ °C y 40 % v/v de etanol, alcanzando aproximadamente un 42 % del TPC extraíble determinado mediante extracción metanólica ácida. En cambio, el mayor rendimiento total de extracción se obtuvo a las mismas condiciones de tiempo y temperatura, pero con 60 % v/v de etanol, alcanzando cerca de un 33 % de la masa inicial de orujo en base seca.

Posteriormente, se evaluó la UAE considerando como factores el tiempo de sonicación y la potencia ultrasónica. En las condiciones de mayor energía específica ($t = 60$ min, $P = 70$ W), la UAE permitió recuperar $37,94 \pm 0,42$ mg GAE/g DW, equivalente a un $73,78 \pm 0,82$ % de rendimiento respecto del TPC extraíble, y obtener un rendimiento total de extracción de $45,07 \pm 0,08$ % respecto de la masa inicial utilizada de orujo en base seca. En el rango estudiado, tanto el TPC como el rendimiento total aumentaron con la potencia y el tiempo, alcanzando sus valores máximos en 70 W y 60 min. En comparación con la maceración, la UAE permitió una mayor recuperación fenólica y un mayor rendimiento total de extracto, lo que respalda su uso como estrategia de intensificación para la valorización del orujo de arándano.

Abstract

The increasing volume of agro-industrial residues generated by the berry industry highlights the need for valorization strategies aimed at recovering high-value bioactive compounds. In particular, blueberry pomace contains a significant fraction of polyphenols and other antioxidant phytochemicals that can be recovered through suitable extraction processes. In this work, blueberry pomace valorization was studied through conventional hydroethanolic maceration and ultrasound-assisted extraction (UAE).

Maceration was evaluated using response surface methodology and a face-centered central composite design to optimize total phenolic content (TPC, mg GAE/g DW) and total extraction yield. The independent variables were extraction time, temperature, and ethanol concentration in the hydroethanolic mixture. Extraction time was evaluated over the range of 20–60 min, temperature from 20 to 60 °C, and ethanol concentration between 20 and 80% v/v. The fitted models showed different optimum conditions for each response. The highest polyphenol recovery was obtained at $t = 60$ min, $T = 60$ °C, and 40 % v/v ethanol, reaching approximately 42 % of the TPC determined by acidified methanolic extraction. In contrast, the highest total extraction yield was obtained at the same time and temperature conditions, but with 60 % v/v ethanol, reaching about 33 % of the initial dry-basis pomace mass.

Subsequently, UAE was evaluated considering sonication time and ultrasonic power as factors. Under the conditions of highest specific energy ($t = 60$ min, $P = 70$ W), UAE allowed the recovery of 37.94 ± 0.42 mg GAE/g DW, equivalent to a $73.78 \pm 0.82\%$ yield relative to the extractable TPC, and a total extraction yield of $45.07 \pm 0.08\%$ based on the initial blueberry pomace dry weight used. Within the studied range, both TPC and total yield increased with power and time, reaching their maximum values at 70 W and 60 min. In comparison with maceration, UAE provided a higher phenolic recovery and a greater total extract yield, supporting its use as an intensification strategy for blueberry pomace valorization.

Agradecimientos

Primero, quiero agradecer a Dios y a la Virgen María por ser el fundamento de mi fe católica. En los momentos de mayor esfuerzo y también en los de alegría, su presencia me sostuvo con esperanza y me dio la convicción de que siempre es posible trabajar por un futuro mejor. Extiendo también mi gratitud a los santos y mártires, cuyo testimonio y sacrificio inspiran a perseverar con humildad, fortaleza y amor al prójimo.

Agradezco profundamente a mi familia por el cariño, el cuidado y la paciencia de tantos años. A mi mamá, por su amor incondicional, su protección constante y por estar siempre presente incluso cuando las circunstancias se volvían exigentes. A mi papá, por su sacrificio, su bondad y su sabiduría, que han sido una guía silenciosa y firme a lo largo de mi formación. A mi hermana, por su preocupación genuina y su compañía. Y a mis gatos, que han sido parte importante de mi vida: a los que siguen conmigo día a día, y a aquellos que ya no están, pero permanecen en mi recuerdo y en mi corazón.

También deseo agradecer a la Universidad Técnica Federico Santa María por la oportunidad de haber sido parte de su comunidad y por la sólida formación académica recibida, que sin duda marcó mi desarrollo profesional y personal. En particular, agradezco al profesor Gonzalo Núñez por su apoyo, su motivación y su guía durante el proceso de elaboración de esta memoria, así como por la disposición para orientar y aportar con criterio en cada etapa del trabajo.

Finalmente, expreso mi sincero agradecimiento al Centro de Biotecnología de Sistemas de la Universidad Andrés Bello, y especialmente al área de alimentos encabezada por Freddy Urrego, por permitirme realizar esta memoria y el trabajo experimental en sus instalaciones, brindando un entorno de aprendizaje valioso y recursos fundamentales para el desarrollo del estudio. Del mismo modo, agradezco al profesor Franco Espinoza por los conocimientos compartidos, su apoyo y la disposición para acompañar el proceso, lo cual fue clave para llevar a cabo este trabajo de la mejor manera posible.

Tabla de Contenidos

1	Introducción	1
2	Objetivos y Alcances	4
2.1	Objetivos	4
2.2	Objetivos específicos	4
2.3	Alcances del estudio	4
3	Estado del Arte	6
4	Materiales y Métodos	10
4.1	Materia prima	10
4.2	Reactivos y solventes	11
4.3	Equipos	11
4.4	Determinación del contenido de humedad del orujo de arándano	11
4.5	Diseño experimental de maceración hidroetanólica	11
4.6	Procedimiento de maceración hidroetanólica	13
4.7	Determinación del rendimiento total de extracción	13
4.8	Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	14
4.9	Extracción de compuestos fenólicos	15
4.10	Cuantificación del contenido de polifenoles totales	15
4.11	Construcción de la superficie de respuesta	17
4.12	Optimización de la superficie de respuesta mediante el método L-BFGS-B	18
4.13	Perfil de antocianinas por HPLC-DAD de extractos obtenidos por UAE	19
5	Resultados y Discusión	21
5.1	Resultados Experimentales	21
5.2	Modelado empírico y optimización	27
5.2.1	Maceración hidroetanólica	27
5.2.2	Extracción asistida por ultrasonido	34

5.3	Análisis cromatográfico del perfil de antocianinas en extractos obtenidos por UAE .	39
6	Conclusiones y Recomendaciones	46
	Referencias	49
A	Anexos	57
A.1	Antecedentes de Arantruf	57
A.2	Modelo completo para el contenido de polifenoles totales por maceración hidroetanólica	57
A.3	Modelo completo para el rendimiento total de extracción por maceración hidroetanólica	58
A.4	Modelo completo para el rendimiento total de extracción por UAE	58
A.5	Modelo completo para el contenido de polifenoles totales por extracción asistida por ultrasonido	58

Lista de Tablas

4.1	Matriz experimental de la maceración hidroetanólica.	12
4.2	Matriz experimental de la extracción asistida por ultrasonido.	15
5.1	Contenido de polifenoles totales (TPC) y su rendimiento de extracción correspondientes a los tratamientos evaluados en el diseño experimental de maceración hidroetanólica, presentados en la Tabla 4.1.	22
5.2	Materia extraída y rendimiento total para los tratamientos evaluados en el diseño experimental de maceración hidroetanólica, presentados en la Tabla 4.1.	23
5.3	Contenido de polifenoles totales (TPC) y su rendimiento de extracción para los tratamientos evaluados en el diseño de extracción asistida por ultrasonido (UAE), presentados en la Tabla 4.2.	24
5.4	Evaluación de las diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales (TPC) de los tratamientos evaluados en el diseño de extracción asistida por ultrasonido (UAE), según la prueba post hoc de Tukey.	25
5.5	Materia extraída y rendimiento total para los tratamientos evaluados en el diseño de extracción asistida por ultrasonido (UAE), presentados en la Tabla 4.2.	26
5.6	Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el rendimiento total obtenido por maceración hidroetanólica.	28
5.7	Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales extraídos por maceración hidroetanólica.	29
5.8	Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el rendimiento de extracción por UAE.	35
5.9	Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el contenido de polifenoles extraídos por UAE.	36
5.10	Principales señales cromatográficas observadas en las muestras de extractos obtenidos por UAE.	42

Lista de Figuras

5.1	Cubo de respuesta para el rendimiento total de extracción (%) mediante maceración hidroetanólica, el triángulo rojo indica el punto óptimo.	31
5.2	Cubo de respuesta para el contenido de polifenoles (mg GAE/g DW) obtenidos en la maceración hidroetanólica, el triángulo rojo indica el punto óptimo.	32
5.3	Superficie de respuesta para el rendimiento total de extracción a 60 °C, en función del tiempo y de la concentración de etanol.	33
5.4	Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales extraídos a 60 °C, en función del tiempo y de la concentración de etanol.	34
5.5	Superficie de respuesta para el rendimiento total en función del tiempo y de la potencia ultrasónica en UAE.	38
5.6	Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales en función del tiempo y de la potencia ultrasónica en UAE.	39
5.7	Cromatogramas HPLC-DAD correspondientes a las muestras de extractos obtenidos por UAE.	41
5.8	Imagen ampliada de la región cromatográfica principal.	44

Nomenclatura

Símbolo	Significado, unidades
C	Concentración de etanol en el solvente, % v/v
m_{DW}	Masa de orujo de arándano en base seca, g DW
$m_{\text{extraída}}$	Masa extraída, g
P	Potencia ultrasónica, W
t	Tiempo de extracción (maceración o UAE), min
T	Temperatura de extracción, °C
y_{masa}	Rendimiento de extracción, %
y_{TPC}	Contenido de polifenoles totales, mg GAE/g DW
Siglas	
DW	<i>Dry weight</i> , masa seca
FCCD	<i>Face-Centered Central Composite Design</i>
GAE	<i>Gallic Acid Equivalents</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
TPC	<i>Total Phenolic Content</i>
UAE	<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>

Capítulo 1

Introducción

La industria del arándano ha adquirido una creciente relevancia económica en Chile durante las últimas décadas. De acuerdo con ODEPA, entre 2002 y 2011 el volumen de las exportaciones chilenas de arándanos frescos aumentó en 1,1%, mientras que la participación de Chile en el mercado mundial pasó de 5,4% a 30,9%, consolidando al país como uno de los principales actores del comercio internacional de esta especie. Más recientemente, ODEPA informó que, entre septiembre de 2025 y enero de 2026, las exportaciones chilenas de arándano fresco alcanzaron USD 374 millones y 73 mil toneladas, con incrementos de 41% en valor y 32% en volumen respecto del mismo período de la temporada anterior. En este contexto, el dinamismo productivo y comercial del rubro refuerza la pertinencia de estudiar la valorización de subproductos agroindustriales derivados de su procesamiento, tal como el orujo o la fruta de descarte [1, 2].

Estos residuos agroindustriales suelen presentar una elevada fracción de materia orgánica biodegradable y, cuando no son valorizados ni gestionados adecuadamente, pueden transformarse en una fuente relevante de impacto ambiental. El Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés) señala que los residuos orgánicos dispuestos en sistemas de eliminación final generan emisiones de metano asociadas a su degradación anaerobia, mientras que una gestión deficiente de residuos y aguas residuales incrementa las descargas no tratadas hacia aguas superficiales, aguas subterráneas, suelos y zonas costeras. En la misma línea, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA; en inglés, United Nations Environment Programme, UNEP) advierte que la mala gestión de residuos provoca contaminación del aire, del agua y del suelo, y que los vertederos abiertos o insalubres pueden contaminar incluso fuentes de agua de consumo; adicionalmente, se ha documentado que la escorrentía puede arrastrar lixiviados desde sitios de disposición hacia cuerpos de agua. En un marco más amplio, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) ha mostrado que la biomasa alimentaria descartada genera impactos sobre el clima, el recurso hídrico, el uso de la tierra y la biodiversidad, lo que refuerza la pertinencia de estrategias de prevención, tratamiento

y valorización de subproductos como orujos [3–6].

Dentro de estos residuos, el orujo de arándano se caracteriza por contener una fracción importante de compuestos fenólicos de alto valor agregado, tales como antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos, que permanecen en la matriz sólida después de la extracción primaria de jugo o del proceso de fermentación [7]. Diversos estudios han mostrado que el orujo de arándano conserva una capacidad antioxidante comparable a la pulpa original, lo que lo convierte en una materia prima atractiva para la obtención de extractos con aplicaciones en alimentos funcionales, nutraceuticos y cosméticos [7–9]. La valorización de este residuo, por ende, contribuye tanto a la generación de nuevos productos como a la reducción del impacto ambiental de la cadena productiva.

Desde el punto de vista tecnológico, la extracción de polifenoles desde matrices vegetales puede llevarse a cabo mediante diferentes estrategias, que incluyen métodos convencionales como la maceración y la extracción Soxhlet, así como tecnologías emergentes basadas en intensificación de procesos, entre ellas la extracción asistida por ultrasonido (UAE), la extracción con fluidos supercríticos y el uso de solventes eutécticos profundos naturales [10–12]. Los métodos convencionales de extracción se caracterizan por su robustez operativa, simplicidad instrumental y amplia aplicabilidad a distintas matrices vegetales. Sin embargo, estos procedimientos suelen requerir tiempos de extracción prolongados, elevadas relaciones solvente:sólido y, en consecuencia, un mayor consumo de solventes y energía. Además, la exposición extendida a ciertas condiciones de proceso, particularmente temperatura y tiempo, compromete la estabilidad de compuestos sensibles y reducir parcialmente su bioactividad. En contraste, las tecnologías emergentes de extracción han sido desarrolladas con el objetivo de intensificar la transferencia de materia y mejorar la eficiencia global del proceso, favoreciendo una recuperación más rápida y selectiva de compuestos de interés. En este contexto, tecnologías emergentes como la extracción asistida por ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos o líquidos presurizados permiten, en muchos casos, disminuir el uso de solventes, acortar los tiempos de operación y reducir la demanda energética, al mismo tiempo que contribuyen a preservar la integridad de compuestos bioactivos como los polifenoles [13, 14].

La extracción asistida por ultrasonido se ha consolidado como una alternativa particularmente interesante para la recuperación de compuestos fenólicos, debido a que la cavitación acústica generada por las ondas ultrasónicas provoca la formación, crecimiento y colapso violento de microburbujas en el seno del líquido. Este fenómeno genera microchorros y ondas de choque que favorecen la ruptura de paredes celulares, incrementan la accesibilidad del solvente a los solutos y reducen las resistencias difusivas internas y externas [10, 11]. En el caso de matrices de berries y sus subproductos, se han reportado incrementos cercanos al 50% en el rendimiento de extracción y, en muchos casos, una mejor preservación de la estructura de los compuestos fenólicos frente a tratamientos térmicos más agresivos [8, 15].

No obstante, la respuesta del sistema de extracción depende de diversas variables de operación,

tales como el tiempo de contacto, la temperatura, la composición del solvente, la relación sólido:líquido y, en el caso de UAE, la potencia ultrasónica y la amplitud de la sonda. En particular, el porcentaje de etanol en la mezcla hidroetanólica modula la polaridad del medio y, por tanto, la solubilidad relativa de diferentes familias de polifenoles; al mismo tiempo, la temperatura influye tanto en la difusividad como en la estabilidad de los compuestos termolábiles [16].

En este contexto, el presente trabajo aborda la revalorización del orujo de arándano mediante la recuperación de compuestos bioactivos por extracción hidroetanólica convencional y por extracción asistida por ultrasonido. Para ello, se evalúa el efecto de variables operacionales relevantes sobre el contenido de polifenoles totales extraídos y sobre el rendimiento total de extracción, empleando metodología de superficie de respuesta como herramienta para modelar y optimizar el proceso. De este modo, la investigación no solo busca comparar el desempeño de una tecnología convencional y una emergente, sino también establecer condiciones de operación que contribuyan al aprovechamiento de este subproducto agroindustrial desde una perspectiva de valorización funcional y tecnológica.

Capítulo 2

Objetivos y Alcances

2.1 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es revalorizar el orujo de arándano mediante la recuperación de compuestos bioactivos por extracción asistida por ultrasonido, comparando su rendimiento con una extracción convencional por maceración en medio hidroetanólico.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de la memoria son los siguientes:

- Evaluar el rendimiento total y el rendimiento de polifenoles totales de la extracción realizada al orujo de arándano mediante métodos convencionales de maceración, utilizando una mezcla hidroetanólica como solvente.
- Optimizar la extracción de compuestos bioactivos desde orujo de arándano en función del tiempo de maceración, la temperatura y la concentración de etanol en el solvente mediante un modelo estadístico.
- Evaluar el efecto de la asistencia ultrasónica sobre el rendimiento total y el rendimiento de polifenoles totales de la extracción realizada al orujo de arándano, empleando como referencia las condiciones óptimas obtenidas para la maceración convencional.

2.3 Alcances del estudio

El trabajo experimental se llevó a cabo íntegramente a escala de laboratorio, utilizando orujo de arándano proveniente de un proveedor local de Lautaro, Región de la Araucanía, y bajo

condiciones controladas de extracción. Las extracciones se realizaron empleando únicamente mezclas hidroetanólicas como solvente y relaciones sólido/líquido fijas en los diseños experimentales definidos, por lo que los resultados deben interpretarse dentro de esos rangos operacionales y para la matriz estudiada. El análisis se centró en la cuantificación de polifenoles totales mediante el método de Folin–Ciocalteu y en la determinación del rendimiento total de extracción por vía gravimétrica, así como en el ajuste de modelos estadísticos a partir de los datos experimentales obtenidos. En consecuencia, este estudio no aborda la identificación individual de compuestos fenólicos mediante técnicas cromatográficas, ni la evaluación específica de la actividad antioxidante, la estabilidad de los extractos durante el almacenamiento o su desempeño en aplicaciones alimentarias, nutracéuticas o cosméticas. Asimismo, no se contempla el escalamiento del proceso a nivel piloto o industrial, ni un análisis económico o de factibilidad tecnoeconómica. Por ello, los resultados obtenidos constituyen una base experimental y metodológica para la valorización del orujo de arándano, pero requieren estudios complementarios para avanzar hacia una aplicación tecnológica más amplia.

Capítulo 3

Estado del Arte

El *orujo de arándano* (o *blueberry pomace*) corresponde al subproducto sólido del arándano que resta tras procesos industriales como el prensado para jugos, y está constituido principalmente por pieles y semillas, además de fracciones residuales de pulpa. En la industria de berries, este tipo de subproducto puede representar una fracción relevante del material procesado y, debido a su alta humedad, tiende a ser altamente perecible y susceptible a contaminación microbológica si no se estabiliza (por ejemplo, mediante secado) [17, 18]. En consecuencia, la valorización del orujo mediante recuperación de compuestos de alto valor agrega interés tanto tecnológico como ambiental.

Desde el punto de vista composicional, el orujo de arándano concentra una proporción importante de los compuestos bioactivos originalmente presentes en el fruto, ya que numerosos polifenoles se asocian a tejidos estructurales de la piel y la semilla. En particular, se ha reportado que el orujo contiene cantidades relevantes de *antocianinas* (responsables del color), además de otros fenoles como *flavonoles* y *ácidos fenólicos*, junto con un aporte importante de fibra dietética, lo que lo convierte en una matriz atractiva para desarrollar ingredientes funcionales o extractos antioxidantes [17, 18]. Sin embargo, la naturaleza heterogénea de la matriz y la interacción de los compuestos con la pared celular hacen que la recuperación eficiente dependa fuertemente del método de extracción y de sus condiciones operacionales.

Tradicionalmente, la recuperación de polifenoles desde matrices vegetales se ha realizado mediante extracción sólido-líquido con solventes hidroorgánicos (por ejemplo, mezclas agua-etanol), incluyendo maceración con agitación y, en algunos casos, Soxhlet u otros arreglos que favorecen el contacto solvente-matriz. Estas estrategias son simples y accesibles, pero suelen penalizarse por mayores tiempos de operación y/o consumos de solvente, además de degradación cuando se aplican temperaturas elevadas o tiempos prolongados sobre compuestos sensibles [10]. Para superar estas limitaciones, la literatura reciente sobre subproductos de berries destaca el uso de tecnologías emergentes de intensificación tales como ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos y el empleo

de solventes alternativos (p. ej., eutécticos profundos), orientadas a mejorar transferencia de masa, reducir tiempos y disminuir consumo de solvente [10, 12, 17, 18].

En este marco, la extracción asistida por ultrasonido (UAE) se ha consolidado como una alternativa particularmente pertinente para matrices tipo orujo. Su fundamento es la cavitación acústica generada por ondas ultrasónicas (en aplicaciones de potencia, típicamente sobre 20 kHz), la cual produce ciclos de compresión y rarefacción que favorecen la nucleación y colapso de microburbujas. Este colapso genera microturbulencia, microchorros y ondas de choque a microescala, promoviendo la disrupción de estructuras celulares, el aumento del área efectiva de contacto y la disminución de resistencias difusivas en la capa límite externa, con el consecuente aumento de la tasa de transferencia de materia hacia el solvente [10, 19]. A nivel práctico, esto suele traducirse en extracciones más rápidas y eficientes que métodos convencionales, con menor requerimiento de solvente y, frecuentemente, a temperaturas moderadas, lo que resulta favorable para preservar fracciones fenólicas sensibles [10, 11, 19]. En comparación con otras tecnologías emergentes, la UAE destaca además por su implementación relativamente directa a escala laboratorio (baño o sonda) y por su compatibilidad con mezclas hidroetanólicas ampliamente utilizadas en el ámbito alimentario [10, 17].

Las variables operacionales que típicamente gobiernan la UAE incluyen la potencia o amplitud aplicada, el tiempo de sonicación, la temperatura, la composición del solvente (especialmente fracción de etanol en agua), la relación sólido:líquido y, en ciertos casos, el pH del medio. Estas variables interactúan entre sí: por ejemplo, condiciones demasiado severas pueden favorecer degradación u oxidación de algunos compuestos, mientras que condiciones insuficientes pueden limitar la ruptura de la matriz y la liberación de solutos [10, 11, 19].

En el caso específico del orujo de arándano, la evidencia disponible no se restringe a un único estudio o aproximación. Bamba et al. evaluaron parámetros como tiempo de sonicación, composición del solvente y relación sólido:líquido, observando que una mezcla hidroetanólica intermedia (por ejemplo, 50% etanol/agua) puede maximizar contenidos de fenoles totales, flavonoides y antocianinas, con efectos además sobre la actividad antioxidante [8]. De manera complementaria, He et al. optimizaron la UAE de compuestos fenólicos y antocianinas desde orujo de vino de arándano mediante un diseño Box–Behnken, reportando un conjunto de condiciones óptimas de temperatura moderadamente elevada, tiempo corto y relación líquido:sólido acotada, con buena concordancia entre los valores predichos y experimentales [20]. Asimismo, Zhang et al. optimizaron la recuperación de antocianinas desde orujo de arándano mediante un diseño Box–Behnken, reportando condiciones óptimas representativas de la intensificación por ultrasonido, junto con caracterización cromatográfica de los pigmentos recuperados [15]. En conjunto, estos trabajos, sumados a revisiones recientes centradas en *blueberry pomace*, muestran que la UAE es una estrategia efectiva para recuperar fracciones fenólicas de alto interés desde este subproducto, y que es posible modular

simultáneamente *rendimiento* y *selectividad* mediante la elección adecuada de las condiciones de operación [8, 15, 18, 20].

Ahora bien, la literatura pertinente no se agota en el orujo de arándano. Existen antecedentes consistentes en subproductos de berries afines, particularmente de los géneros *Vaccinium*, *Rubus* y *Ribes*, los cuales presentan similitudes estructurales y composicionales relevantes para el análisis comparado de procesos extractivos. De hecho, estudios comparativos en orujos de arándano, frambuesa roja, grosella roja y mora han mostrado que todas estas matrices constituyen fuentes relevantes de antioxidantes y pigmentos, aunque con perfiles cualitativos y cuantitativos distintos según la especie, lo que refuerza la idea de que la recuperación de compuestos fenólicos desde orujos de berries corresponde a una línea de investigación más amplia y consolidada, y no a un caso aislado de *blueberry pomace* [17, 21, 22].

En residuos de frambuesa, la extracción convencional por maceración ha mostrado que la composición del solvente influye de manera decisiva sobre la recuperación de compuestos fenólicos, observándose en general un desempeño favorable de mezclas hidroetanólicas intermedias frente al uso de agua o etanol puros [23]. Esta tendencia no se restringe a la frambuesa, sino que ha sido descrita de manera más amplia para subproductos de berries, donde el efecto de la composición del solvente se relaciona con el equilibrio entre polaridad, hidratación e hinchamiento de la matriz vegetal y solubilización de distintas familias fenólicas [17, 22]. En el caso específico de orujos de arándano y frambuesa, se ha reportado que la extracción asistida por ultrasonido constituye una estrategia eficaz para intensificar la recuperación de compuestos bioactivos, favoreciendo la liberación de solutos y reduciendo los tiempos de proceso respecto de esquemas extractivos convencionales [24]. Para residuos prensados de cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), Klavins et al. compararon distintos métodos de extracción de polifenoles y señalaron que la asistencia ultrasónica presenta ventajas relevantes desde el punto de vista de la intensificación del proceso y de la recuperación de fracciones fenólicas de interés [25]. Posteriormente, estos mismos autores extendieron el análisis a residuos de berries del género *Vaccinium*, incluyendo nuevamente cranberry y otras matrices afines, confirmando que la eficiencia extractiva depende marcadamente de la interacción entre variables como la composición del solvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la relación sólido:líquido, lo que refuerza la necesidad de abordar estos procesos mediante estrategias de optimización multivariable [26]. De forma complementaria, en pomaces de mora (*blackberry*), chokeberry (*aronia*) y frambuesa, se ha empleado metodología de superficie de respuesta para optimizar la UAE de extractos ricos en polifenoles, evidenciando que la amplitud o potencia ultrasónica, el tiempo de tratamiento y la naturaleza del medio de extracción modifican significativamente tanto el rendimiento global como la recuperación de compuestos fenólicos específicos [27]. En el caso de la grosella negra (*blackcurrant*), también se ha documentado el potencial de la UAE para mejorar la extracción de antocianinas y otros fenoles desde el orujo, incluso bajo condiciones relativamente suaves, lo

que refuerza la aplicabilidad de esta tecnología en subproductos de berries ricos en pigmentos y compuestos antioxidantes [28, 29]. En conjunto, estos antecedentes muestran que, aunque la literatura específicamente centrada en orujo de arándano es más acotada que la disponible para otros subproductos vegetales, existe un marco de evidencia amplio y consistente en berries afines —frambuesa, cranberry, mora, chokeberry y grosella negra— que respalda el uso de solventes hidroetanólicos, la aplicación de ultrasonido y la optimización multivariable como estrategias pertinentes para maximizar la recuperación de compuestos bioactivos y modular la selectividad del proceso.

Debido a la naturaleza multivariable del proceso y a la presencia de interacciones entre factores (p. ej., tiempo–temperatura–composición del solvente), la optimización de extracciones suele abordarse mediante diseño de experimentos (DoE) y metodologías de superficie de respuesta (RSM), que permiten ajustar modelos empíricos (usualmente cuadráticos) y explorar compromisos entre respuestas como contenido de polifenoles totales y rendimiento gravimétrico [30, 31]. Esta aproximación es coherente con lo reportado tanto para orujo de arándano como para residuos de berries similares, donde es común emplear diseños compuestos centrales o Box–Behnken para identificar condiciones óptimas y regiones operacionales robustas [15, 20, 26, 27].

Finalmente, la valorización del orujo de arándano no se limita a la obtención de extractos. Revisiones recientes reportan su uso como ingrediente funcional en matrices alimentarias (panificados, snacks, lácteos y bebidas), aportando fibra y compuestos fenólicos, además de atributos de color asociados a antocianinas; asimismo, puede incorporarse como fuente de antioxidantes naturales con potencial impacto en estabilidad oxidativa y vida útil [17, 18]. En el contexto nacional, un ejemplo de valorización aplicada es el caso de Arantruf, empresa familiar ubicada en Lautaro, Región de La Araucanía, vinculada al trabajo con arándanos orgánicos y al desarrollo de productos de mayor valor agregado a partir de esta materia prima y sus subproductos [32, 33]. En colaboración con el CSB–UNAB y con financiamiento Corfo, esta empresa impulsó el desarrollo de *Antiox&Fiber*, un ingrediente o suplemento microencapsulado rico en fibra y antioxidantes elaborado a partir de subproductos de arándanos fermentados y topinambur [33]. Mayores antecedentes sobre la empresa y su contexto productivo se presentan en el Anexo A.1. En conjunto, esta evidencia sustenta que la UAE es una alternativa especialmente adecuada para la recuperación de polifenoles desde orujo de arándano, siempre que sus condiciones sean seleccionadas y optimizadas considerando rendimiento, selectividad, estabilidad de compuestos y factibilidad de implementación.

Capítulo 4

Materiales y Métodos

En este capítulo se describen la materia prima, los solventes, los equipos y los procedimientos utilizados para la extracción de compuestos bioactivos desde orujo de arándano mediante maceración hidroetanólica y extracción asistida por ultrasonido (UAE), así como los métodos de cuantificación de polifenoles y de determinación de la masa extraída.

4.1 Materia prima

Se trabajó con orujo de arándano (*Vaccinium* spp.) procedente de la empresa Arantruf (Región de La Araucanía, Chile), obtenido como subproducto del prensado de arándanos para la elaboración de vinagre. De acuerdo con la información del proveedor, el orujo se seca a bajas temperaturas y posteriormente se muele hasta obtener un polvo fino, rico en antioxidantes y polifenoles [34]. El material se recibió en 2022 y se almacenó en envases herméticos, protegidos de la luz, a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador hasta su uso experimental. Bajo estas condiciones, la actividad de enzimas oxidativas como la polifenol oxidasa, responsables del pardeamiento enzimático y de la degradación de compuestos fenólicos, se ve fuertemente reducida durante el almacenamiento prolongado [35, 36]. Adicionalmente, diversos estudios han mostrado que el mantenimiento de berries y derivados en congelación profunda favorece la conservación del contenido de polifenoles y de la capacidad antioxidante en comparación con temperaturas de almacenamiento más elevadas, especialmente cuando se limita la exposición a oxígeno y luz [37, 38]. De esta forma, el almacenamiento del orujo de arándano a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en condiciones oscuras se considera adecuado para preservar el contenido fenólico y la estabilidad oxidativa de la matriz, permitiendo utilizar estos lotes como materia prima representativa para los ensayos de extracción realizados en esta memoria.

4.2 Reactivos y solventes

Para la preparación de las mezclas hidroetanólicas empleadas en las maceraciones y en las extracciones asistidas por ultrasonido se utilizó etanol (alcohol etílico) grado técnico (Winkler Ltda., Chile). Para la determinación del contenido de polifenoles totales se empleó reactivo de Folin–Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemania), junto con carbonato de sodio anhidro, agua destilada y ácido gálico anhidro. Para la preparación de muestras destinadas al análisis por HPLC se utilizaron agua grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania) y etanol grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).

4.3 Equipos

Los ensayos experimentales y las determinaciones analíticas fueron realizados empleando un analizador de humedad PMC 50 (RADWAG, Radom, Polonia), una centrífuga refrigerada de mesa Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), un baño termorregulado de agua con control digital y tapa metálica (MRC, Israel), un procesador ultrasónico tipo sonda UP200St de 200 W y 26 kHz (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemania) y un espectrofotómetro Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Suiza).

4.4 Determinación del contenido de humedad del orujo de arándano

El contenido de humedad del orujo de arándano se determinó mediante un analizador de humedad PMC 50 (RADWAG, Radom, Polonia), equipo que estima la humedad de la muestra a partir de la pérdida de masa registrada durante el secado. Para esto, una porción representativa del orujo se distribuyó de manera uniforme sobre el platillo del equipo, de modo de favorecer un secado homogéneo y una lectura reproducible. Este criterio de preparación es concordante con lo reportado para la determinación gravimétrica rápida de humedad en matrices alimentarias mediante analizadores termogravimétricos [39, 40].

4.5 Diseño experimental de maceración hidroetanólica

La extracción por maceración se evaluó mediante un diseño de superficie de respuesta basado en un diseño central compuesto centrado en las caras (*face-centered central composite design*, FCCD) de tres factores [30, 31]. La definición del dominio experimental se sustentó en antecedentes

bibliográficos reportados para residuos de arándano y otras matrices *berry*, en los que la extracción de compuestos fenólicos ha sido estudiada mediante sistemas hidroetanólicos, empleando temperaturas moderadas, tiempos del orden de decenas de minutos hasta una hora completa y concentraciones variables de etanol, generalmente dentro de intervalos intermedios a altos, dependiendo de la fracción fenólica de interés [8, 18, 41–43]. En este contexto, se seleccionaron como variables independientes el tiempo de maceración (t), la temperatura (T) y la concentración volumétrica de etanol en la mezcla hidroetanólica (C_{EtOH}), definiéndose los niveles experimentales en 20, 40 y 60 min; 20, 40 y 60 °C; y 20, 50 y 80 % v/v, respectivamente. Esta selección permitió abarcar condiciones de operación compatibles con la literatura y, al mismo tiempo, explorar un intervalo suficientemente amplio para identificar efectos lineales, de interacción y de curvatura sobre las respuestas evaluadas.

En todos los ensayos de maceración se utilizó una relación sólido/líquido de 1:20 (1,00 g de orujo seco en 20 mL de solvente hidroetanólico), valor próximo a relaciones previamente reportadas para la extracción de polifenoles en orujo de arándano y subproductos de *berries* [8, 15, 18]. Cada condición experimental se realizó en triplicado independiente y el orden de ejecución se aleatorizó para minimizar la influencia de factores no controlados.

Con base en los rangos experimentales definidos para el FCCD, la Tabla 4.1 presenta la matriz experimental utilizada para evaluar la maceración hidroetanólica del orujo de arándano.

Tabla 4.1: Matriz experimental de la maceración hidroetanólica.

Experimento	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración de etanol (% v/v)
1	60	60	80
2	60	60	20
3	60	20	80
4	60	20	20
5	20	60	80
6	20	60	20
7	20	20	80
8	20	20	20
9	40	40	50
10	40	40	80
11	40	40	20
12	40	60	50
13	40	20	50
14	60	40	50
15	20	40	50

4.6 Procedimiento de maceración hidroetanólica

Para cada corrida del diseño experimental se pesaron 1,0 g de orujo de arándano y, también, se pesaron tubos centrifugables de 50 mL. Previo al inicio de cada ensayo, el baño termorregulado con agitación se encendió y se ajustó a la temperatura definida por el diseño experimental (20, 40 o 60 °C). En paralelo, los tubos centrifugables se dispusieron en posición vertical sobre una gradilla y se añadieron 20 mL de la mezcla hidroetanólica correspondiente al nivel de C_{EtOH} definido para el experimento. Adicionalmente, se preparó un tubo centrifugable con 50 mL de agua, utilizado como referencia para verificar la temperatura efectiva del líquido en el interior de los tubos. Una vez alcanzada la temperatura programada del baño, esta se corroboró mediante la lectura del equipo y mediante una termocupla introducida en el tubo de referencia. Posteriormente, los tubos se mantuvieron en el baño hasta que el solvente alcanzó el equilibrio térmico a la temperatura objetivo. Alcanzada dicha condición, la gradilla se retiró momentáneamente, se adicionó el orujo de arándano a cada tubo, estos se cerraron nuevamente y se reintrodujeron de inmediato en el baño termorregulado. El tiempo de maceración (20, 40 o 60 min) se contabilizó desde esta segunda inmersión, correspondiente al inicio efectivo del contacto entre el solvente y la matriz sólida. Durante todo el ensayo se mantuvieron constantes tanto la temperatura como la agitación del sistema.

Transcurrido el tiempo establecido por cada experimento, los tubos se retiraron del baño termorregulado y las muestras se sometieron inmediatamente a centrifugación a 5000 RPM durante 10 minutos a 20 °C, con el fin de separar la fase líquida del residuo sólido. Posteriormente, el extracto sobrenadante se recuperó cuidadosamente y su volumen se determinó en probetas graduadas. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su determinación de contenido de polifenoles totales, con el objetivo de minimizar su degradación, mientras que el residuo de orujo se reservó para la determinación del rendimiento total.

4.7 Determinación del rendimiento total de extracción

El rendimiento total de extracción desde el orujo en cada experimento se estimó mediante el método gravimétrico basado en secado en estufa. Las muestras de orujo residual húmedo en los tubos centrifugables se secaron en un horno convectivo a 105 °C durante 24 h, siguiendo protocolos estándar de determinación gravimétrica de humedad y contenido de sólidos en matrices agroalimentarias, basados en el secado hasta masa constante [44]. Tras el secado, las muestras se enfriaron hasta temperatura ambiente y se pesó la masa final.

La masa extraída se calculó por diferencia entre la masa seca inicial de orujo y la masa seca remanente después de la maceración. Esta variable se utilizó como respuesta complementaria al contenido de polifenoles totales para evaluar la selectividad de la extracción.

El rendimiento de extracción (Y_{masa}) se calculó a partir de la diferencia entre la masa inicial de orujo seco y la masa remanente de orujo seco después de la extracción, normalizada por la masa inicial y expresada en porcentaje, según se indica en la Ecuación (4.1):

$$Y_{\text{masa}} (\%) = \frac{m_{\text{inicial}} - m_{\text{remanente}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (4.1)$$

donde:

- m_{inicial} es la masa de orujo de arándano seca utilizada en la extracción (g DW).
- $m_{\text{remanente}}$ es la masa de orujo de arándano seca remanente después de la extracción y del secado (g DW).

Este rendimiento total cuantifica la fracción de materia extraída desde el orujo bajo cada condición de operación y representa la cantidad de masa solubilizada.

4.8 Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

La extracción por ultrasonido se llevó a cabo con un dispositivo ultrasónico de laboratorio Hielscher UP200St (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemania), de tipo sonda, con potencia nominal de 200 W y frecuencia de 26 kHz [45].

Los ensayos se realizaron en vasos precipitados de 600 mL, cargados con 25 g de orujo de arándano y 500 mL de la mezcla hidroetanólica al 40 % v/v de etanol, manteniendo una relación sólido/líquido de 1:20. Los vasos se colocaron sobre una placa calefactora con agitación magnética para controlar la temperatura y asegurar una buena homogeneidad del sistema. La sonda ultrasónica se sumergió en el líquido a una profundidad adecuada, evitando el contacto con las paredes del vaso.

Los factores estudiados en UAE fueron la potencia ultrasónica aplicada (W) y el tiempo de sonicación (min), manteniendo constantes la composición del solvente, la relación sólido/líquido y la temperatura de acuerdo con la experimentación previa realizada en las maceraciones y con estudios previos sobre UAE en matrices de berries y subproductos de arándano [8, 10, 16]. Durante la sonicación se controló la temperatura del sistema mediante la termocupla incorporada en el equipo. También, se utilizó un baño de enfriamiento compuesto de un vaso precipitado de 1000 mL con agua fría y hielo para evitar alzas de temperatura excesivas que degraden compuestos termolábiles, como los polifenoles.

Al término del tiempo de sonicación, se procedió a separar el extracto líquido del remanente sólido por filtración por gravedad. El volumen de extracto se midió en probetas graduadas y el

residuo sólido se sometió a secado gravimétrico descrito para cuantificar la masa extraída bajo condiciones de UAE.

En la Tabla 4.2 se presentan las combinaciones de potencia y tiempo utilizadas en los experimentos de extracción asistida por ultrasonido. Cada punto experimental se ejecutó en duplicado.

Tabla 4.2: Matriz experimental de la extracción asistida por ultrasonido.

Experimento	Potencia ultrasónica (W)	Tiempo (min)
1	70	60
2	70	20
3	30	60
4	30	20
5	50	40
6	70	40
7	30	40
8	50	60
9	50	20

4.9 Extracción de compuestos fenólicos

Con el fin de estimar el contenido total de polifenoles extraíbles de la matriz, se realizó una extracción sólido-líquido exhaustiva con metanol acidificado. Para ello, se pesaron 2,00 g de orujo seco de arándano en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, al que se adicionaron 8 mL de la solución extractante de metanol acidificado. La mezcla se sometió a agitación orbital durante 1 h. Posteriormente, el extracto se transfirió cuantitativamente a un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recuperó y se filtró por gravedad a través de papel filtro Whatman N° 1 hacia un matraz aforado de 25 mL. El residuo sólido remanente fue sometido a dos ciclos adicionales de extracción bajo las mismas condiciones, mezclándose los sobrenadantes obtenidos en el mismo matraz. Finalmente, el extracto combinado se llevó a aforo con la solución de extracción hasta 25 mL.

Este procedimiento es consistente con metodologías de extracción analítica empleadas para la recuperación de compuestos fenólicos en subproductos de berries, donde el uso de solventes orgánicos acidificados favorece la extracción de la fracción fenólica extraíble, especialmente en matrices ricas en antocianinas y otros polifenoles [18, 43, 46–48].

4.10 Cuantificación del contenido de polifenoles totales

Los extractos obtenidos tanto por maceración como por UAE se analizaron para determinar su contenido de polifenoles totales (TPC, por sus siglas en inglés). La cuantificación se realizó mediante

el método colorimétrico de Folin–Ciocalteu, de acuerdo con el procedimiento clásico descrito por Singleton y Rossi, con las adaptaciones habituales para matrices frutales y subproductos ricos en compuestos fenólicos [10, 15, 49].

El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin–Ciocalteu. Para ello, se transfirieron 0,1 mL de extracto a un matraz aforado de 10 mL, al que se añadieron 4,9 mL de agua destilada y 0,5 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu, dejándose reaccionar durante 3 min. En paralelo, se preparó una solución blanco compuesta por 5,0 mL de agua destilada y 0,5 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu. Transcurrido dicho intervalo, se incorporaron 1,7 mL de carbonato de sodio al 20 % a cada matraz y se completó el volumen con agua destilada. A continuación, las soluciones se homogenizaron y se mantuvieron en reposo durante 30 min en ausencia de luz. Posteriormente, se dispensaron 200 μ L de cada solución en triplicado en una microplaca de 96 pocillos, y la absorbancia fue medida a 760 nm. Finalmente, la concentración de polifenoles totales se calculó mediante la curva de calibración obtenida experimentalmente.

El contenido de polifenoles totales se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg GAE/g DW), calculado mediante la Ecuación (4.2):

$$\text{TPC (mg GAE/g DW)} = \frac{C_{\text{GAE}} \cdot V_{\text{ext}} \cdot \text{FD}}{m_{\text{DW}}} \quad (4.2)$$

donde:

- C_{GAE} es la concentración de polifenoles en el extracto, expresada como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/mL), obtenida a partir de la curva de calibración de Folin–Ciocalteu.
- V_{ext} es el volumen total del extracto (mL) obtenido.
- FD es el factor de dilución aplicado al extracto antes del análisis colorimétrico (adimensional).
- m_{DW} es la masa de orujo de arándano seca utilizada en la extracción (g DW).

Esta forma de cálculo es consistente con la práctica habitual en estudios de cuantificación de polifenoles en berries y sus subproductos, en los que se combinan la concentración equivalente de ácido gálico obtenida por espectrofotometría con el volumen total de extracto y la masa de muestra seca empleada [15, 50, 51].

Para evaluar qué fracción del contenido fenólico total potencial fue recuperada en las distintas condiciones de extracción, se calculó el rendimiento porcentual de polifenoles totales (TPC%) como la razón entre los polifenoles extraídos en una condición específica y el contenido total de polifenoles determinado a partir de la extracción metanólica ácida, según la Ecuación (4.3):

$$\text{TPC}\% = \frac{\text{TPC}_{\text{condición}}}{\text{TPC}_{\text{total}}} \times 100 \quad (4.3)$$

4.11 Construcción de la superficie de respuesta

La superficie de respuesta se construyó mediante el ajuste de modelos polinomiales de segundo orden en variables codificadas. En este trabajo, la variable respuesta Y correspondió, según el caso, al contenido de polifenoles totales (y_{TPC} , mg GAE/g DW) o al rendimiento de extracción (y_{masa} , %). En consecuencia, para cada respuesta se ajustó una función empírica capaz de describir el comportamiento del sistema dentro del dominio experimental estudiado.

En términos generales, el modelo ajustado se expresó mediante un polinomio de segundo orden de la forma:

$$\hat{Y}(\mathbf{x}) = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \hat{\beta}_{ij} x_i x_j \quad (4.4)$$

donde $\hat{Y}(\mathbf{x})$ corresponde a la respuesta predicha, x_i representa las variables independientes en forma codificada y los coeficientes $\hat{\beta}$ corresponden a los parámetros estimados a partir de los datos experimentales. Este tipo de modelo permite representar efectos lineales, cuadráticos e interacciones entre factores, lo que resulta adecuado para describir sistemas con curvatura dentro de la región experimental [30, 31, 52].

La estimación de los coeficientes del modelo se realizó en R mediante ajuste por mínimos cuadrados, utilizando la función `rsm()` del paquete `rsm`. Esta herramienta permite ajustar modelos de superficie de respuesta de primero y segundo orden en variables codificadas, facilitando además la representación gráfica y el análisis posterior de la superficie ajustada [52]. De este modo, a partir de los datos experimentales se obtuvo, para cada respuesta, una función continua que representó la superficie dentro de la región de estudio.

La codificación de las variables permitió expresar todos los factores en una escala adimensional común, centrada en el punto medio del diseño y delimitada por los niveles experimentales definidos. Esto facilitó tanto la estimación del modelo como la interpretación de los efectos de los factores sobre las respuestas [30, 31].

Para la etapa de maceración hidroetanólica, las variables codificadas se definieron de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$x_1 = \frac{T - 40}{20} \quad (4.5)$$

$$x_2 = \frac{t - 40}{20} \quad (4.6)$$

$$x_3 = \frac{C - 50}{30} \quad (4.7)$$

Para la etapa de extracción asistida por ultrasonido, las variables codificadas se definieron de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$x_1 = \frac{P - 50}{20} \quad (4.8)$$

$$x_2 = \frac{t - 40}{20} \quad (4.9)$$

En consecuencia, la superficie de respuesta empleada en este trabajo se obtuvo a partir del ajuste de un modelo empírico de segundo orden para cada respuesta de interés. Estas funciones ajustadas constituyeron la base para la etapa posterior de optimización numérica.

4.12 Optimización de la superficie de respuesta mediante el método L-BFGS-B

Una vez ajustada la superficie de respuesta para cada variable analizada, la determinación del punto óptimo se formuló como un problema de optimización restringida. En esta etapa, la optimización no se efectuó directamente sobre los valores observados en los ensayos, sino sobre la función predictiva $\hat{Y}(\mathbf{x})$ obtenida a partir del modelo. Esto permitió localizar numéricamente la condición de operación que maximizó la respuesta predicha dentro del dominio experimental [30, 31].

La optimización se realizó en R mediante la función `optim()` del paquete `stats`, empleando el método L-BFGS-B (*Limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno with Bounds*). Este algoritmo constituye una variante del método cuasi-Newton BFGS, diseñada para resolver problemas de optimización no lineal con restricciones de tipo caja, es decir, con límites inferiores y superiores predefinidos para cada variable de decisión. En este estudio, dichas cotas se establecieron de acuerdo con los límites del diseño experimental, de manera que la búsqueda del óptimo se mantuviera dentro de la región efectivamente evaluada [53].

Debido a que la función `optim()` resuelve problemas de minimización, la maximización de la respuesta predicha se planteó como la minimización de su función negativa, según la Ecuación 4.10:

$$f(\mathbf{x}) = -\hat{Y}(\mathbf{x}) \quad (4.10)$$

De este modo, el máximo de la superficie de respuesta se identificó como el mínimo de la función objetivo transformada. Operacionalmente, el algoritmo generó iterativamente nuevas soluciones dentro de las cotas especificadas hasta localizar el punto que maximizó la respuesta predicha en la región experimental.

En consecuencia, la optimización mediante L-BFGS-B constituyó una etapa posterior al ajuste

del modelo. Primero, los datos experimentales permitieron estimar en R una superficie de respuesta de segundo orden para cada variable analizada; posteriormente, sobre dicha función ajustada, se resolvió un problema de optimización restringida para localizar el punto de operación que maximizó y_{TPC} o y_{masa} , según correspondiera, dentro de los límites experimentales del estudio [52, 53].

4.13 Perfil de antocianinas por HPLC-DAD de extractos obtenidos por UAE

Con el fin de caracterizar el perfil de antocianinas presente en los extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido, se analizaron muestras seleccionadas por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV-Vis mediante detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Esta técnica permite separar los compuestos presentes en la muestra en función de sus diferencias de interacción con la fase estacionaria y la fase móvil bajo alta presión, generando señales cromatográficas diferenciadas en función del tiempo de retención. En el caso de las antocianinas, la separación cromatográfica suele complementarse con detección en la región visible, ya que estos compuestos presentan una absorción característica asociada al catión flavilio, lo que permite su seguimiento selectivo y mejora la interpretación del perfil cromatográfico [54–57].

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna C18 (Symmetry C18, Waters, 5 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm) bajo condiciones de elución en gradiente. La fase móvil estuvo constituida por una solución de ácido fórmico al 5% en agua (solvente A) y metanol al 100% (solvente B). Previo al análisis, todos los solventes se filtraron a través de una membrana de 0.45 μm . El programa de gradiente para el sistema se configuró de la siguiente manera: 0–5 min, 10–15% B; 5–15 min, 15–20% B; 15–20 min, 20–25% B; 20–25 min, 25–30% B; 25–45 min, 30–60% B; y finalmente 3 min a 100% B. Se mantuvo un flujo constante de 1.0 mL/min y el volumen de inyección de las muestras fue de 20 μL . El tiempo total de la corrida instrumental se extendió a 60 min para permitir la adecuada reequilibración de la columna entre inyecciones.

Desde el punto de vista instrumental, el detector de arreglo de diodos permitió registrar la absorbancia del eluato en una región del espectro UV-Vis, facilitando el monitoreo selectivo de compuestos cromóforos como las antocianinas a una longitud de onda de detección de 525 nm y un ancho de banda de 4 nm. Esta configuración de lectura es consistente con metodologías cromatográficas previamente reportadas para el seguimiento de estos pigmentos en berries y matrices vegetales ricas en estos compuestos [55–57]. Los picos cromatográficos fueron identificados mediante la comparación de sus respectivos tiempos de retención con aquellos obtenidos a partir de estándares analíticos analizados bajo idénticas condiciones cromatográficas. Finalmente, los cromatogramas resultantes fueron procesados mediante el software del equipo para la integración

de las señales detectadas, consolidando una metodología reproducible para la caracterización del perfil de antocianinas en los extractos obtenidos por UAE.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1 Resultados Experimentales

En esta sección se presentan los resultados experimentales obtenidos para las respuestas evaluadas en los ensayos de maceración hidroetanólica y de extracción asistida por ultrasonido (UAE), considerando tanto el contenido de polifenoles totales (TPC) y el rendimiento total de extracto. En primer lugar, se exponen los valores experimentales observados para cada tratamiento de los diseños empleados, con el propósito de describir el comportamiento general de las respuestas dentro de la región experimental estudiada. Posteriormente, estos resultados se analizan y discuten en función de las variables de operación evaluadas y en relación con antecedentes reportados en la literatura, a fin de interpretar su coherencia, relevancia tecnológica y aporte a la valorización del orujo de arándano. En las siguientes tablas los valores de TPC y de materia extraída se expresan como media $\pm$ desviación estándar.

De acuerdo con los resultados experimentales resumidos en la Tabla 5.1, el contenido de polifenoles totales (TPC) obtenido mediante maceración hidroetanólica del orujo de arándano varió entre $3,72 \pm 0,39$ y $20,30 \pm 1,01$ mg GAE/g DW. El mayor valor experimental se registró en el Experimento 12, correspondiente a 40 min, 60 °C y 50% v/v de etanol, alcanzando $20,30 \pm 1,01$ mg GAE/g DW, con un rendimiento de extracción de polifenoles del $39,48 \pm 1,96\%$. En contraste, el menor valor se observó en el Experimento 8, realizado a 20 min, 20 °C y 20% v/v de etanol, con un TPC de $3,72 \pm 0,39$ mg GAE/g DW y un rendimiento del $7,23 \pm 0,76\%$.

Tabla 5.1: Contenido de polifenoles totales (TPC) y su rendimiento de extracción correspondientes a los tratamientos evaluados en el diseño experimental de maceración hidroetanólica, presentados en la Tabla 4.1.

Experimento	TPC (mg GAE/g DW)	Rendimiento (%)
1	$11,09 \pm 0,21$	$21,57 \pm 0,41$
2	$16,33 \pm 0,84$	$31,76 \pm 1,63$
3	$4,50 \pm 0,38$	$8,75 \pm 0,74$
4	$6,98 \pm 0,32$	$13,57 \pm 0,62$
5	$9,91 \pm 0,75$	$19,27 \pm 1,46$
6	$15,71 \pm 0,19$	$30,55 \pm 0,37$
7	$5,30 \pm 0,45$	$10,31 \pm 0,88$
8	$3,72 \pm 0,39$	$7,23 \pm 0,76$
9	$13,77 \pm 0,78$	$26,78 \pm 1,52$
10	$7,40 \pm 0,32$	$14,39 \pm 0,62$
11	$6,71 \pm 0,29$	$13,05 \pm 0,56$
12	$20,30 \pm 1,01$	$39,48 \pm 1,96$
13	$12,53 \pm 0,20$	$24,37 \pm 0,39$
14	$13,53 \pm 1,13$	$26,31 \pm 2,20$
15	$11,71 \pm 1,02$	$22,77 \pm 1,98$

La tendencia observada, en la que una mezcla hidroetanólica intermedia, una mayor temperatura y un mayor tiempo favorecen la extracción de compuestos fenólicos, es consistente con lo reportado para matrices de berries. En residuos de frambuesa sometidos a extracción por maceración convencional, la mezcla agua/etanol 50:50 (v/v) presentó el mayor contenido fenólico, con 21,6 mg GAE/g de sólidos secos [23]. valor muy cercano al máximo experimental alcanzado en esta memoria. De manera complementaria, en matrices de berries se ha descrito que la eficiencia extractiva de los fenoles depende fuertemente de la polaridad del solvente, y que las mezclas etanol-agua suelen superar a los solventes puros, precisamente porque combinan capacidad de solvatación con hidratación de la matriz [41].

Por otra parte, el efecto favorable de la temperatura debe interpretarse dentro de una ventana de operación acotada. Si bien el incremento de temperatura puede mejorar la transferencia de masa, disminuir la viscosidad del solvente y favorecer la solubilización de compuestos fenólicos, su aumento no resulta indefinidamente beneficioso. Diversos autores han señalado que temperaturas excesivas o tiempos prolongados pueden inducir oxidación o degradación de compuestos termolábiles, entre ellos distintos polifenoles y, en particular, antocianinas [58, 59]. Por otro lado, aunque el aumento de temperatura hasta 60 °C mostró un efecto positivo sobre la recuperación de TPC, no sería

correcto asumir que temperaturas superiores conducirían necesariamente a mejores resultados, pues también podrían intensificar la pérdida de compuestos fenólicos termolábiles [59].

En la Tabla 5.2, se ve que la masa extraída presentó valores entre $0,1538 \pm 0,0285$ y $0,2703 \pm 0,0352$ g, mientras que el rendimiento total de extracción varió entre $16,30 \pm 3,02\%$ y $28,65 \pm 3,73\%$. El mayor rendimiento total se obtuvo en el Experimento 12 (40 min, 60 °C, 50% v/v EtOH), con $27,03 \pm 3,52\%$. La materia extraída corresponde al extracto crudo global y no exclusivamente a la fracción fenólica. En procesos de extracción de orujos y residuos vegetales, el rendimiento total integra compuestos fenólicos junto con otros sólidos solubles o parcialmente solubles, tales como azúcares, ácidos orgánicos y compuestos de pared celular [47, 60, 61].

Tabla 5.2: Materia extraída y rendimiento total para los tratamientos evaluados en el diseño experimental de maceración hidroetanólica, presentados en la Tabla 4.1.

Experimento	Materia extraída (g)	Rendimiento total (%)
1	$0,2323 \pm 0,0436$	$24,62 \pm 4,62$
2	$0,1857 \pm 0,0333$	$19,68 \pm 3,53$
3	$0,1830 \pm 0,0039$	$19,40 \pm 0,41$
4	$0,1769 \pm 0,0030$	$18,75 \pm 0,32$
5	$0,1732 \pm 0,0097$	$18,36 \pm 1,03$
6	$0,1538 \pm 0,0285$	$16,30 \pm 3,02$
7	$0,1625 \pm 0,0076$	$17,22 \pm 0,81$
8	$0,1944 \pm 0,0469$	$20,60 \pm 4,97$
9	$0,1925 \pm 0,0051$	$20,40 \pm 0,54$
10	$0,1677 \pm 0,0121$	$17,77 \pm 1,28$
11	$0,1672 \pm 0,0108$	$17,72 \pm 1,14$
12	$0,2703 \pm 0,0352$	$28,65 \pm 3,73$
13	$0,2614 \pm 0,0258$	$27,71 \pm 2,73$
14	$0,1924 \pm 0,0307$	$20,39 \pm 3,25$
15	$0,1680 \pm 0,0297$	$17,81 \pm 3,15$

En comparación con otros extractos obtenidos por maceración convencional en matrices tipo berry, el rendimiento total de 15–27% se ubica en un rango plausible. Sharma et al. reportaron un rendimiento de 15,2% para un extracto obtenido desde *orujo de Saskatoon* (*Saskatoon berry pomace*) [62]. De manera complementaria, Pérez reportó en frutos de *Ugni molinae* (murtilla) rendimientos de 12,7–24,3% [63]. En conjunto, ambos antecedentes permiten sostener que rendimientos del orden de 15–27% son compatibles con maceraciones tradicionales en matrices tipo berry cuando se cuantifica el rendimiento total de la extracción.[17, 42, 43, 47, 62, 63]. Bajo ese criterio, los porcentajes de

rendimiento total determinados para la maceración hidroetanólica pueden considerarse consistentes con lo descrito para maceraciones convencionales en matrices comparables.

De acuerdo con los resultados experimentales resumidos en la Tabla 5.3, el contenido de polifenoles totales (TPC) obtenido por extracción asistida por ultrasonido (UAE) varió entre $32,65 \pm 0,93$ y $37,94 \pm 0,42$ mg GAE/g DW. El mayor valor experimental correspondió al Experimento 1 (70 W, 60 min) con un rendimiento de extracción de polifenoles de $73,78 \pm 0,82\%$, mientras que el menor valor se observó en el Experimento 4 (30 W, 20 min) con un rendimiento del $63,50 \pm 1,81\%$. En términos comparativos, estos valores fueron consistentemente superiores a los obtenidos por maceración hidroetanólica, lo que indica una intensificación efectiva de la recuperación fenólica bajo la acción del ultrasonido.

Tabla 5.3: Contenido de polifenoles totales (TPC) y su rendimiento de extracción para los tratamientos evaluados en el diseño de extracción asistida por ultrasonido (UAE), presentados en la Tabla 4.2.

Experimento	TPC (mg GAE/g DW)	Rendimiento (%)
1	$37,94 \pm 0,42$	$73,78 \pm 0,82$
2	$36,04 \pm 0,80$	$70,09 \pm 1,56$
3	$35,54 \pm 0,89$	$69,12 \pm 1,73$
4	$32,65 \pm 0,93$	$63,50 \pm 1,81$
5	$35,53 \pm 0,51$	$69,10 \pm 0,99$
6	$36,64 \pm 0,76$	$71,26 \pm 1,48$
7	$33,39 \pm 1,47$	$64,94 \pm 2,86$
8	$36,94 \pm 0,25$	$71,84 \pm 0,49$
9	$35,05 \pm 0,80$	$68,16 \pm 1,56$

La magnitud de estos resultados es coherente con antecedentes reportados para orujos de arándano sometidos a UAE. Bamba et al. informaron que la extracción asistida por ultrasonido con 50% v/v de etanol, 40 °C y 40 min alcanzó 22,23 mg GAE/g DM, y demostraron además que dicha composición de solvente fue claramente superior a 10% y 90% v/v de etanol para la recuperación de compuestos fenólicos [8]. De forma concordante, He et al. optimizaron la UAE de polifenoles y antocianinas a partir de orujo de vino de arándano, obteniendo condiciones óptimas cercanas a 61,03 °C y 23,67 min, y verificando que los rendimientos de compuestos fenólicos fueron superiores a los alcanzados por extracción convencional con solvente [64]. Asimismo, en orujo de arándano cv. Legacy, Reinoso reportó para UAE contenidos de polifenoles totales entre 9,50 y 32,40 mg GAE/g residuo, con condiciones óptimas asociadas a 90% de amplitud, 10 min y 57,97% v/v de etanol [42]. En este contexto, el intervalo de 32,65–37,94 mg GAE/g DW puede considerarse compatible con la literatura disponible para matrices de arándano tratadas mediante

ultrasonido. En consecuencia, la superioridad observada frente a la maceración hidroetanólica no debe interpretarse como un comportamiento excepcional, sino como una respuesta consistente con el mecanismo de intensificación atribuido a la UAE.

Con el objetivo de determinar si los distintos tratamientos de extracción asistida por ultrasonido (UAE) produjeron diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales (TPC), se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), complementado con la prueba post hoc de Tukey para la comparación de medias. Los resultados evidenciaron un efecto significativo del tratamiento sobre el TPC ($p = 0,0024$), lo que indica que las condiciones operacionales evaluadas influyeron en la recuperación de compuestos fenólicos. En particular, la prueba de Tukey mostró que las diferencias significativas se concentraron principalmente entre los tratamientos ubicados en los extremos del dominio experimental: el Experimento 1 presentó un TPC significativamente superior al de los Experimentos 4 y 7, mientras que el Experimento 8 también superó significativamente a dichos tratamientos. Asimismo, el Experimento 6 fue significativamente mayor que el Experimento 4, y el Experimento 2 también exhibió un valor superior a este último. En contraste, entre la mayoría de los tratamientos intermedios no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere un solapamiento parcial en la respuesta bajo condiciones vecinas del diseño experimental. En conjunto, estos resultados indican que los menores valores de TPC se asociaron con las condiciones menos intensas del proceso, mientras que los mayores valores tendieron a concentrarse en tratamientos de mayor potencia y/o mayor tiempo de sonificación.

Tabla 5.4: Evaluación de las diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales (TPC) de los tratamientos evaluados en el diseño de extracción asistida por ultrasonido (UAE), según la prueba post hoc de Tukey.

Experimento	TPC (mg GAE/g DW)	Rendimiento (%)
1	$37,94 \pm 0,42^a$	$73,78 \pm 0,82$
2	$36,04 \pm 0,80^{ab}$	$70,09 \pm 1,56$
3	$35,54 \pm 0,89^{abc}$	$69,12 \pm 1,73$
4	$32,65 \pm 0,93^c$	$63,50 \pm 1,81$
5	$35,53 \pm 0,51^{abc}$	$69,10 \pm 0,99$
6	$36,64 \pm 0,76^{ab}$	$71,26 \pm 1,48$
7	$33,39 \pm 1,47^{bc}$	$64,94 \pm 2,86$
8	$36,94 \pm 0,25^a$	$71,84 \pm 0,49$
9	$35,05 \pm 0,80^{abc}$	$68,16 \pm 1,56$

Nota: Letras superíndice distintas en la columna de TPC indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba post hoc de Tukey.

En la Tabla 5.5, la materia extraída presentó rendimientos entre $41,91 \pm 0,12\%$ y $45,07 \pm$

0,08%, resultando el experimento 1 el de mayor valor y el experimento 4 el de menor valor. Este incremento respecto de la maceración hidroetanólica resulta lógico, ya que el ultrasonido no solo favorece la recuperación de compuestos fenólicos, sino también la extracción global de otros solutos solubles o parcialmente solubles presentes en el orujo. En ese sentido, el rendimiento total debe interpretarse como una medida de extracto crudo recuperado y no como un equivalente directo de selectividad hacia polifenoles, puesto que integra simultáneamente compuestos fenólicos, azúcares, ácidos orgánicos y otros constituyentes solubles de la matriz [47, 60, 61]. Por ello, que el rendimiento total se haya desplazado hacia valores de 42–45% bajo UAE es coherente con un proceso más intenso y eficiente de transferencia de masa.

Tabla 5.5: Materia extraída y rendimiento total para los tratamientos evaluados en el diseño de extracción asistida por ultrasonido (UAE), presentados en la Tabla 4.2.

Experimento	Materia extraída (g)	Rendimiento (%)
1	$10,6317 \pm 0,0196$	$45,07 \pm 0,08$
2	$10,2427 \pm 0,4354$	$43,42 \pm 1,85$
3	$10,2325 \pm 0,3803$	$43,38 \pm 1,61$
4	$9,8866 \pm 0,0424$	$41,91 \pm 0,12$
5	$10,2029 \pm 0,3875$	$43,26 \pm 1,64$
6	$10,5221 \pm 0,0650$	$44,61 \pm 0,28$
7	$9,8848 \pm 0,0289$	$41,91 \pm 0,18$
8	$10,5543 \pm 0,0022$	$44,75 \pm 0,01$
9	$9,9197 \pm 0,0085$	$42,05 \pm 0,04$

En conjunto, los resultados muestran que la UAE incrementó simultáneamente la recuperación de polifenoles y la recuperación global de extracto. Sin embargo, ambas respuestas no deben interpretarse como equivalentes. Mientras el aumento del TPC refleja una mejora en la recuperación de compuestos fenólicos, el aumento del rendimiento total expresa una extracción más amplia del extracto crudo. El hecho de que el incremento relativo del TPC haya sido mayor que el incremento del rendimiento total sugiere, además, que la UAE no solo aumentó la masa extraída, sino que también favoreció un extracto comparativamente más enriquecido en compuestos fenólicos. En consecuencia, la UAE puede considerarse una estrategia tecnológicamente consistente para intensificar la valorización del orujo de arándano, tanto por su mayor capacidad de recuperación fenólica como por el aumento esperable del extracto total asociado al fenómeno de cavitación y a la mejora de la transferencia de materia.

5.2 Modelado empírico y optimización

Con el fin de describir cuantitativamente el efecto de las variables de operación sobre las respuestas evaluadas y determinar las condiciones de trabajo más favorables dentro del dominio experimental, se ajustaron modelos empíricos de segundo orden mediante metodología de superficie de respuesta. En esta etapa, los resultados experimentales obtenidos para la maceración hidroetanólica y para la extracción asistida por ultrasonido se utilizaron para construir funciones predictivas continuas, capaces de representar el comportamiento de las respuestas dentro de la región estudiada. Posteriormente, dichas superficies ajustadas se emplearon en la etapa de optimización restringida, de manera de estimar el punto de operación que maximizó cada respuesta sin extrapolar fuera de los límites efectivamente evaluados.

5.2.1 Maceración hidroetanólica

Para la maceración hidroetanólica se ajustaron modelos polinomiales de segundo orden para dos respuestas: el rendimiento total de extracción, $\hat{y}_{\text{masa}}$, expresado en %, y el contenido de polifenoles totales, $\hat{y}_{\text{TPC}}$, expresado en mg GAE/g DW. En ambos casos se consideraron como factores el tiempo de extracción (t), la temperatura (T) y la concentración de etanol en el solvente (C).

La Tabla 5.6 presenta la ANOVA del modelo ajustado para $\hat{y}_{\text{masa}}$. En este caso, el modelo también fue altamente representativo, con $R^2 = 0,9269$ y $R^2_{\text{adj}} = 0,9015$. El tiempo mostró un efecto lineal significativo, mientras que la temperatura y la concentración de etanol se manifestaron principalmente a través de términos cuadráticos y de sus interacciones con la temperatura. La falta de ajuste no resultó significativa, lo que respalda la adecuación del modelo dentro del dominio experimental estudiado.

Tabla 5.6: Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el rendimiento total obtenido por maceración hidroetanólica.

Variable	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	P-value	Significant
Model	505.90	9	56.21	8.94	0.0000	**
A-Temperature	1.11	1	1.11	0.18	0.6774	
B-Time	42.08	1	42.08	6.69	0.0140	**
C-EtOH	5.00	1	5.00	0.80	0.3785	
AB	28.97	1	28.97	4.61	0.0388	**
AC	31.58	1	31.58	5.02	0.0314	**
BC	15.89	1	15.89	2.53	0.1208	
A^2	216.63	1	216.63	34.46	0.0000	**
B^2	82.11	1	82.11	13.06	0.0009	**
C^2	159.17	1	159.17	25.32	0.0000	**
Residuals	220.00	35	6.29			
Lack of Fit	15.70	5	3.14	0.46	0.8019	Not significant
Pure Error	204.30	30	6.81			
Cor Total	725.90	44				
R^2	0.9269					
R^2_{adj}	0.9015					

De acuerdo con lo anterior, el modelo ajustado para el rendimiento total de extracción por maceración fue:

$$\begin{aligned}\hat{y}_{\text{masa}} = & 25,6140 + 1,8913 x_2 + 5,2993 x_1^2 - 1,8485 x_2^2 - 3,6742 x_3^2 \\ & + 1,8058 x_1 x_2 + 2,4494 x_1 x_3.\end{aligned}\quad (5.1)$$

El modelo completo puede verse en el Anexo A.2.

La optimización del modelo indicó que el máximo rendimiento total de extracción dentro del dominio experimental se obtuvo a $t = 60$ min, $T = 60$ °C y $C = 60$ % v/v de etanol, con un valor predicho de 33,17%.

La Tabla 5.7 resume el ANOVA del modelo cuadrático ajustado para $\hat{y}_{\text{TPC}}$. El modelo fue altamente representativo y explicó una elevada proporción de la variabilidad experimental, con $R^2 = 0,9622$ y $R^2_{\text{adj}} = 0,9525$. La temperatura presentó el efecto lineal más importante sobre la respuesta, seguida por la concentración de etanol y el tiempo. Asimismo, resultaron significativos los términos de interacción $x_1 x_3$ y $x_2 x_3$, además de los tres términos cuadráticos, lo que indica que la respuesta no siguió un comportamiento estrictamente lineal dentro de la región experimental evaluada, mientras que la falta de ajuste resultó significativa.

Tabla 5.7: Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales extraídos por maceración hidroetanólica.

Variable	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	P-value	Significant
Model	960.01	9	106.67	98.96	0.0001	**
A-Temperature	487.40	1	487.40	452.20	0.0000	**
B-Time	11.17	1	11.17	10.36	0.0028	**
C-EtOH	37.87	1	37.87	35.13	0.0000	**
AB	0.16	1	0.16	0.15	0.7023	
AC	38.57	1	38.57	35.79	0.0001	**
BC	4.63	1	4.63	4.29	0.0457	**
A^2	66.36	1	66.36	61.57	0.0000	**
B^2	5.78	1	5.78	5.37	0.0265	**
C^2	318.85	1	318.85	295.82	0.0000	**
Residuals	37.72	35	1.08			
Lack of Fit	25.37	5	5.07	12.32	0.0000	**
Pure Error	12.36	30	0.41			
Cor Total	997.74	44				
R^2	0.9622					
R^2_{adj}	0.9525					

El modelo cuadrático para el contenido de polifenoles totales presentó falta de ajuste. En consecuencia, desde un punto de vista estrictamente estadístico, el modelo no reproduce de manera exacta toda la estructura de variación sistemática presente en los datos dentro del dominio experimental evaluado.

No obstante, el modelo se conservó como una herramienta empírica útil para el análisis e interpretación del sistema, debido a que la regresión global resultó altamente significativa ($F = 98,96$; $p < 0,0001$) y explicó una fracción muy alta de la variabilidad experimental ($R^2 = 0,9622$; $R^2_{aj} = 0,9525$). Además, el modelo capturó de manera consistente los efectos dominantes del proceso, particularmente los efectos lineales de la temperatura, el tiempo, así como la curvatura asociada principalmente a la concentración de etanol. Esto indica que, aunque la superficie cuadrática no describe perfectamente la respuesta en todos los puntos del diseño, sí representa adecuadamente las tendencias globales del sistema y la dirección de los principales cambios en TPC dentro de la región estudiada.

La significancia de la falta de ajuste sugiere que persiste una componente sistemática no explicada por el polinomio de segundo orden, lo que puede atribuirse a la presencia de una curvatura más compleja que la representable por el modelo cuadrático o a un comportamiento local no lineal en ciertas combinaciones de factores. En este conjunto de datos, las mayores discrepancias entre valores

medios observados y valores predichos se concentraron en algunos puntos axiales y de esquina, lo que refuerza la idea de que el modelo debe entenderse como una aproximación local y no como una representación exacta del fenómeno.

Por lo anterior, el modelo puede utilizarse válidamente con fines descriptivos, comparativos y de optimización preliminar dentro del dominio experimental evaluado, especialmente para identificar tendencias, visualizar superficies de respuesta y localizar regiones de operación favorables. Sin embargo, sus predicciones no deben extrapolarse fuera del espacio experimental.

Dado que la interacción x_1x_2 no resultó significativa, el modelo ajustado para el contenido de polifenoles extraídos por maceración fue:

$$\begin{aligned}\hat{y}_{\text{TPC}} = & 13,5407 + 4,0307 x_1 + 0,6102 x_2 - 1,1235 x_3 + 2,9331 x_1^2 \\ & - 0,8659 x_2^2 - 6,4290 x_3^2 - 1,2677 x_1x_3 - 0,4390 x_2x_3.\end{aligned}\tag{5.2}$$

El modelo completo puede verse en el Anexo A.3.

La optimización numérica del modelo indicó que el máximo contenido de polifenoles totales dentro del dominio experimental se alcanzó a $t = 60$ min, $T = 60$ °C y $C = 40$ % v/v de etanol, con una respuesta predicha de 21,51 mg GAE/g DW.

La diferencia entre ambas condiciones óptimas indica que la condición que maximiza la recuperación de polifenoles no coincide necesariamente con la que maximiza la masa total extraída. En ambos casos, la temperatura y el tiempo favorecieron la extracción dentro del rango estudiado, lo que es consistente con una mejora de la transferencia de masa, una menor viscosidad del solvente y un mayor tiempo de contacto entre la matriz y la fase líquida. Sin embargo, la concentración de etanol mostró un comportamiento curvo y fue la variable que determinó con mayor claridad la separación entre ambos puntos óptimos.

Para el rendimiento total de extracción, el desplazamiento del óptimo hacia 60 % v/v de etanol indica una mayor recuperación global de solutos del orujo, incluyendo no solo compuestos fenólicos, sino también otros constituyentes solubles o parcialmente solubles, como azúcares, ácidos orgánicos, vitamina C y fracciones de pared celular [43, 61, 65]. En cambio, para el contenido de polifenoles totales, el máximo a 40 % v/v de etanol sugiere que una mezcla hidroetanólica intermedia proporcionó el balance más favorable entre la hidratación de la matriz y la capacidad del solvente para solubilizar la fracción fenólica medida por el reactivo de Folin-Ciocalteu. En consecuencia, la condición de 40 % v/v de etanol resulta más adecuada cuando el objetivo es priorizar la recuperación de polifenoles, mientras que 60 % v/v favorece la obtención de un extracto más abundante, aunque no necesariamente más selectivo hacia la fracción fenólica.

A partir del contenido total de polifenoles extraíbles determinado mediante extracción metanólica ácida ($TPC_{\text{total}} = 51,42$ mg GAE/g DW), la condición óptima predicha para maceración corresponde a una recuperación aproximada de 42 % del contenido total de polifenoles extraíbles. De forma

complementaria, el rendimiento total máximo predicho indica una extracción de alrededor de 33 % de la masa inicial del orujo.

Cabe señalar que el valor de $TPC_{total} = 51,42$ mg GAE/g DW se encuentra en el mismo orden de magnitud que antecedentes reportados para matrices y subproductos de arándano. Bas-Bellver et al. reportaron 51,30 mg GAE/g DW para orujo de arándano liofilizado, mientras que Huang et al. recopilaban valores comparables para matrices derivadas de arándano, incluyendo 51,69 mg GAE/g DW para pericarpio de arándano de arbusto alto [66, 67].

La Figura 5.1 presenta el cubo de respuesta para el rendimiento total de extracción, en función del tiempo, la temperatura y la concentración de etanol. De manera complementaria, la Figura 5.2 muestra el cubo de respuesta correspondiente al contenido de polifenoles totales. En ambas figuras se indican las condiciones óptimas estimadas por el modelo: 60 min, 60 °C y 60 % v/v de etanol para $\hat{y}_{masa}$, y 60 min, 60 °C y 40 % v/v de etanol para $\hat{y}_{TPC}$, respectivamente.

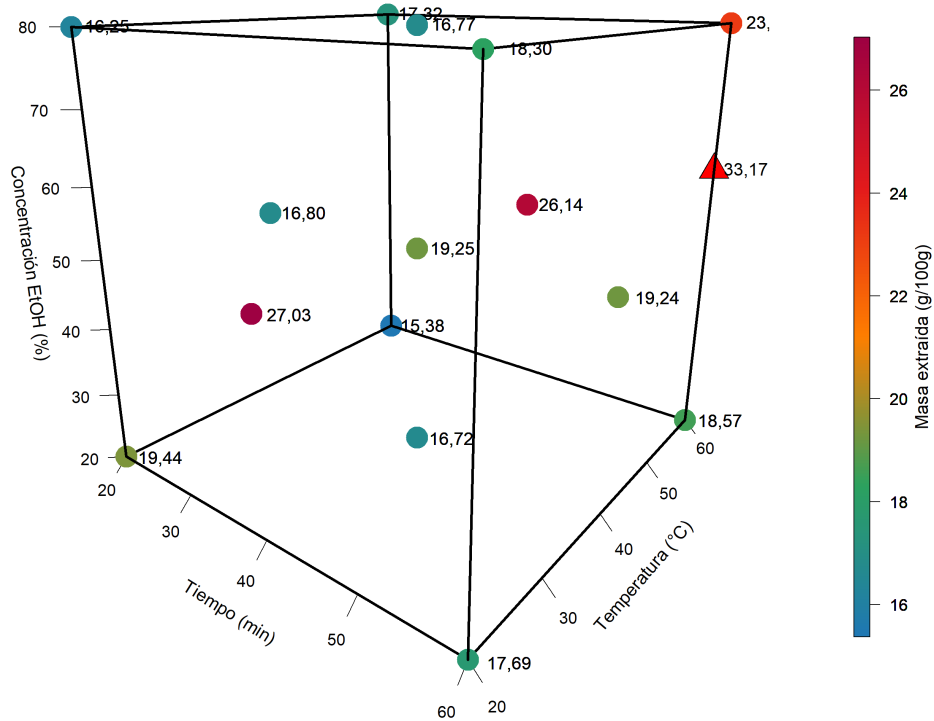


Figura 5.1: Cubo de respuesta para el rendimiento total de extracción (%) mediante maceración hidroetanólica, el triángulo rojo indica el punto óptimo.

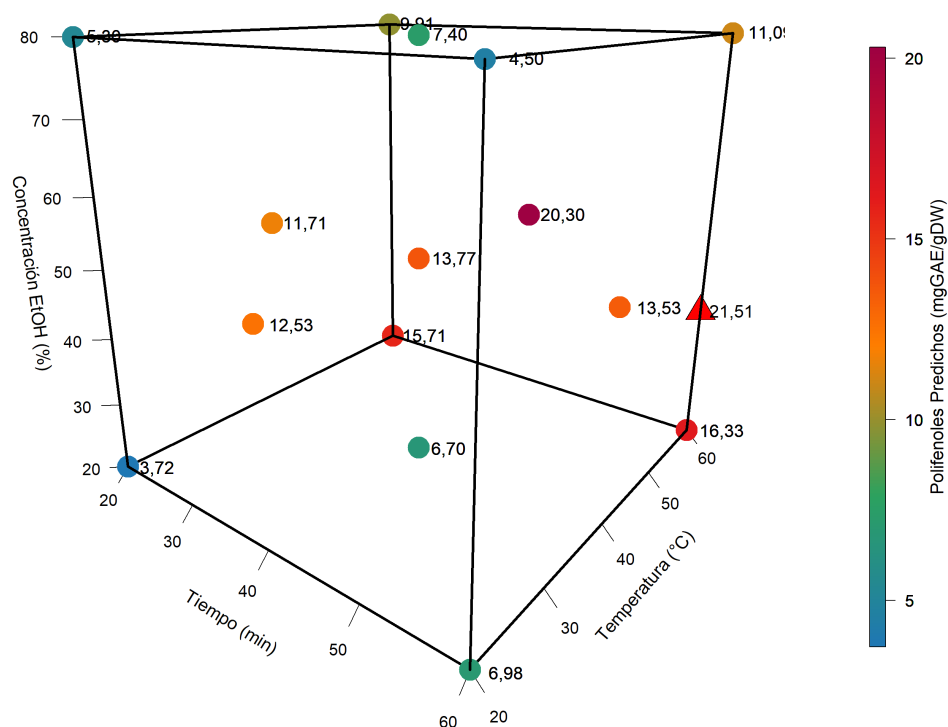


Figura 5.2: Cubo de respuesta para el contenido de polifenoles (mg GAE/g DW) obtenidos en la maceración hidroetanólica, el triángulo rojo indica el punto óptimo.

Con el fin de visualizar con mayor detalle el efecto simultáneo del tiempo y de la concentración de etanol a una temperatura fija de 60 °C, se construyeron las superficies de respuesta mostradas en las Figuras 5.3 y 5.4. En ambas respuestas se observa que el aumento de la temperatura y del tiempo dentro del rango evaluado favoreció la extracción, mientras que el efecto de la concentración de etanol no fue monótono, sino que presentó curvatura.

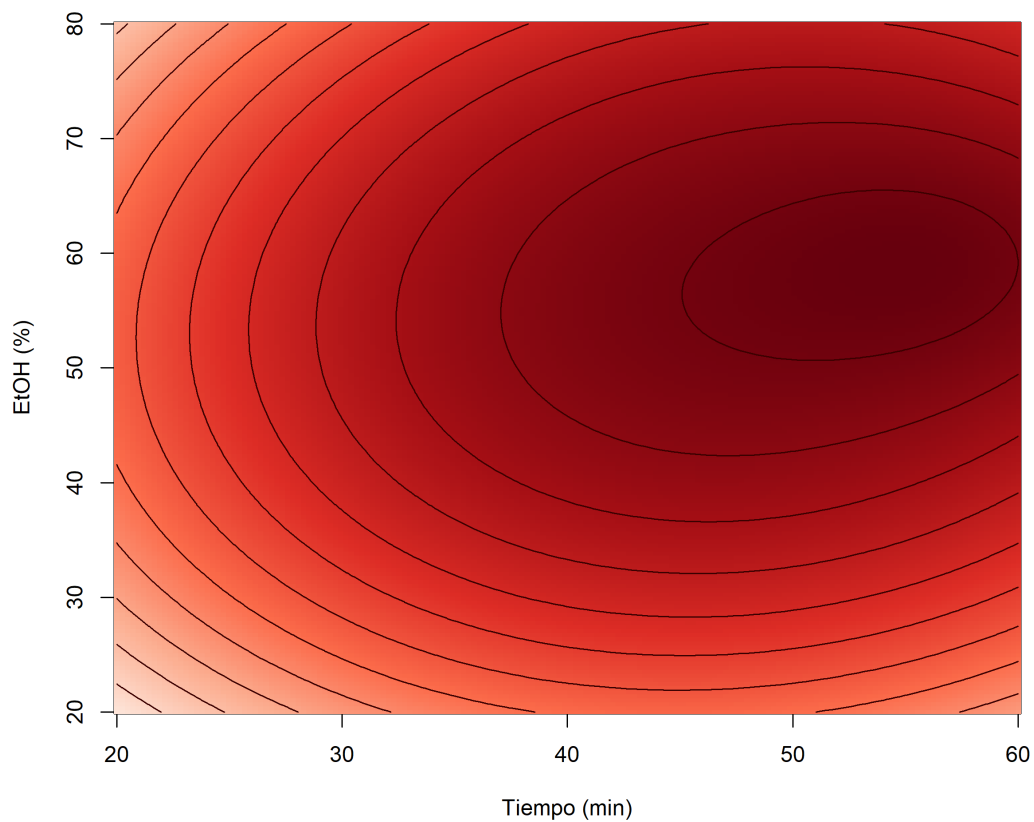


Figura 5.3: Superficie de respuesta para el rendimiento total de extracción a 60 °C, en función del tiempo y de la concentración de etanol.

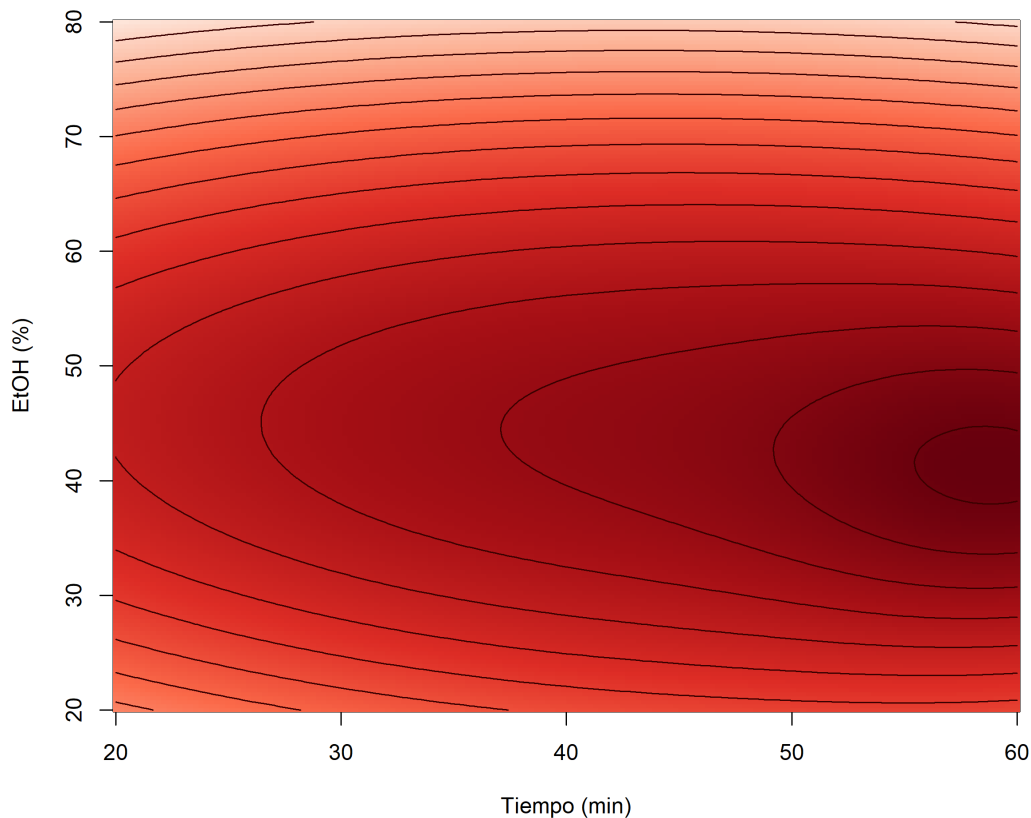


Figura 5.4: Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales extraídos a 60 °C, en función del tiempo y de la concentración de etanol.

Considerando que el objetivo general de este trabajo fue revalorizar el orujo de arándano mediante la recuperación de compuestos bioactivos por extracción asistida por ultrasonido, se priorizó maximizar el contenido de polifenoles totales extraídos como criterio principal de optimización. Esto se fundamenta en que los polifenoles, y en particular las antocianinas, constituyen la fracción bioactiva de mayor funcionalidad en el arándano. En consecuencia, las condiciones de operación se orientaron a maximizar la recuperación de polifenoles totales por sobre el rendimiento total del extracto, al considerarse que esta respuesta se vincula de manera más directa con el objetivo de revalorización del orujo de arándano [68–70].

5.2.2 Extracción asistida por ultrasonido

Una vez definida la composición hidroetanólica de trabajo a partir de la maceración hidroetanólica, se evaluó el efecto de la potencia ultrasónica (P) y del tiempo de sonificación (t) sobre dos respuestas: el rendimiento de extracción, $\hat{y}_{\text{masa}}$, y el contenido de polifenoles totales, $\hat{y}_{\text{TPC}}$. Para ello se ajustaron modelos de superficie de respuesta de segundo orden en variables codificadas, con el propósito de describir el comportamiento de ambas respuestas dentro del dominio experimental y localizar la

condición de operación óptima.

La Tabla 5.8 presenta el ANOVA del modelo cuadrático ajustado para el rendimiento de extracción por UAE. El modelo global resultó significativo ($p = 0,0069$), con valores de $R^2 = 0,7998$ y $R^2_{\text{adj}} = 0,7547$, lo que indica que el modelo logró describir de buena forma la tendencia general de la respuesta dentro del dominio experimental estudiado. Los términos lineales correspondientes a la potencia ultrasónica y al tiempo de sonificación fueron significativos, ambos con efecto positivo sobre y_{masa} , mientras que la interacción y los términos cuadráticos no mostraron significancia estadística. La falta de ajuste tampoco fue significativa, por lo que el modelo puede considerarse adecuado para describir la respuesta en el intervalo analizado.

Tabla 5.8: Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el rendimiento de extracción por UAE.

Variable	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	P-value	Significant
Model	20.78	5	4.16	5.59	0.0069	**
A-Power	10.51	1	10.51	14.14	0.0027	**
B-Time	10.15	1	10.15	13.67	0.0031	**
AB	0.04	1	0.04	0.05	0.8262	
A^2	0.00	1	0.00	0.00	0.9768	
B^2	0.08	1	0.08	0.11	0.7502	
Residuals	8.91	12	0.74			
Lack of Fit	1.32	3	0.44	0.52	0.6788	Not significant
Pure Error	7.60	9	0.84			
Cor Total	29.69	17				
R^2	0.7998					
R^2_{adj}	0.7547					

Dado que sólo los efectos lineales de la potencia ultrasónica y del tiempo de sonificación resultaron estadísticamente significativos, se ajustó un modelo reducido conservando exclusivamente dichos términos. De esta forma, el modelo ajustado resultante fue:

$$\hat{y}_{\text{masa}} = 40,8561 + 0,9357 x_1 + 0,9199 x_2 \quad (5.3)$$

El modelo completo puede verse en el Anexo A.4.

Este comportamiento indica que, dentro del dominio experimental evaluado, el rendimiento de extracción aumentó principalmente de manera lineal con la potencia ultrasónica y con el tiempo de sonificación. Es decir, al incrementar ambos factores desde sus niveles bajos hacia sus niveles altos, se favoreció la recuperación de sólidos desde la matriz de orujo de arándano.

La optimización del modelo indicó que el máximo dentro del dominio experimental se obtiene

en $x_1 = +1$ y $x_2 = +1$, es decir, a $P = 70$ W y $t = 60$ min. Evaluando el modelo completo en dicho punto, el rendimiento de extracción predicho fue:

$$\hat{y}_{\text{masa}}^* = 45,23\% \quad (5.4)$$

Este resultado fue coherente con la tendencia experimental observada, ya que la condición correspondiente al experimento 1 (70 W, 60 min) presentó un rendimiento promedio experimental de 45,04%, constituyendo uno de los valores más altos del diseño. En términos comparativos, las condiciones de menor severidad, particularmente 30 W y 20 min, mostraron los menores rendimientos, cercanos a 39,45%. En conjunto, estos resultados confirman que el aumento simultáneo de la potencia ultrasónica y del tiempo de sonificación favorece la transferencia de materia durante la extracción asistida por ultrasonido, incrementando y_{masa} en el dominio experimental estudiado.

La Tabla 5.9 presenta la ANOVA correspondiente al modelo cuadrático ajustado para el contenido de polifenoles totales. Los valores de $R^2 = 0,8740$ y $R_{\text{adj}}^2 = 0,8214$ indican que el modelo fue representativo en el dominio experimental estudiado. Los términos lineales asociados a la potencia y al tiempo fueron significativos, mientras que la interacción x_1x_2 y los términos cuadráticos no mostraron significancia estadística. Adicionalmente, la falta de ajuste no fue significativa, lo que indica que el modelo describe adecuadamente la respuesta dentro del rango experimental estudiado.

Tabla 5.9: Tabla ANOVA del modelo de superficie de respuesta para el contenido de polifenoles extraídos por UAE.

Variable	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	P-value	Significant
Model	44.54	5	8.91	16.64	0.0000	**
A-Power	27.20	1	27.20	50.81	0.0000	**
B-Time	14.90	1	14.90	27.84	0.0002	**
AB	0.49	1	0.49	0.91	0.3577	
A^2	0.90	1	0.90	1.69	0.2184	
B^2	1.05	1	1.05	1.96	0.1872	
Residuals	6.42	12	0.54			
Lack of Fit	0.26	3	0.09	0.13	0.9409	Not significant
Pure Error	6.16	9	0.68			
Cor Total	50.96	17				
R^2	0.8740					
R_{adj}^2	0.8214					

De esta forma, el modelo ajustado para el contenido de polifenoles extraídos mediante UAE es el siguiente:

$$\hat{y}_{\text{TPC}} = 35,4997 + 1,5055 x_1 + 1,1143 x_2. \quad (5.5)$$

El modelo completo puede verse en el Anexo A.5.

La optimización del modelo indicó que el máximo dentro del dominio experimental se alcanza en el borde $x_1 = +1$ y $x_2 = +1$, equivalente a $P = 70$ W y $t = 60$ min, con una respuesta predicha de

$$\hat{y}_{\text{TPC}}^* = 38,74 \text{ mg GAE/g DW}. \quad (5.6)$$

Considerando como referencia el contenido máximo real extraíble determinado experimentalmente, $TPC_{\text{max,real}} = 51,42$ mg GAE/g DW, la recuperación relativa asociada al óptimo predicho fue

$$R_{\text{TPC}}(\%) = \frac{\hat{y}_{\text{TPC}}^*}{TPC_{\text{max,real}}} \cdot 100 = \frac{38,74}{51,42} \cdot 100 = 75,34\%. \quad (5.7)$$

En ambos casos, los modelos indicaron que las respuestas aumentaron con la potencia ultrasónica y con el tiempo de sonificación dentro del rango evaluado, es decir, se mostró una tendencia ascendente hacia el borde superior del dominio. Esto significa que, entre 30 y 70 W y entre 20 y 60 min, el incremento de energía suministrada al sistema siguió favoreciendo la transferencia de masa y la liberación de solutos desde la matriz.

Las Figuras 5.5 y 5.6 muestran dichas superficies de respuesta. Dado que en UAE se estudiaron solo dos variables, la representación superficial permite visualizar directamente el comportamiento del sistema y la tendencia ascendente de ambas respuestas hacia el borde superior del dominio experimental.

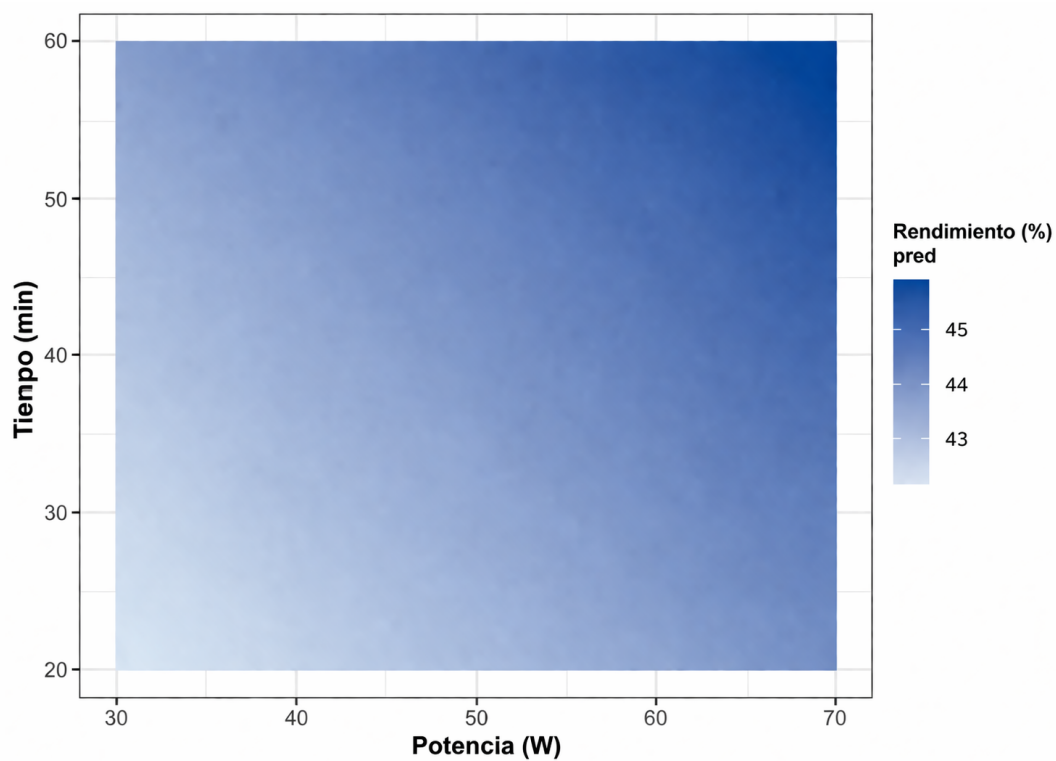


Figura 5.5: Superficie de respuesta para el rendimiento total en función del tiempo y de la potencia ultrasónica en UAE.

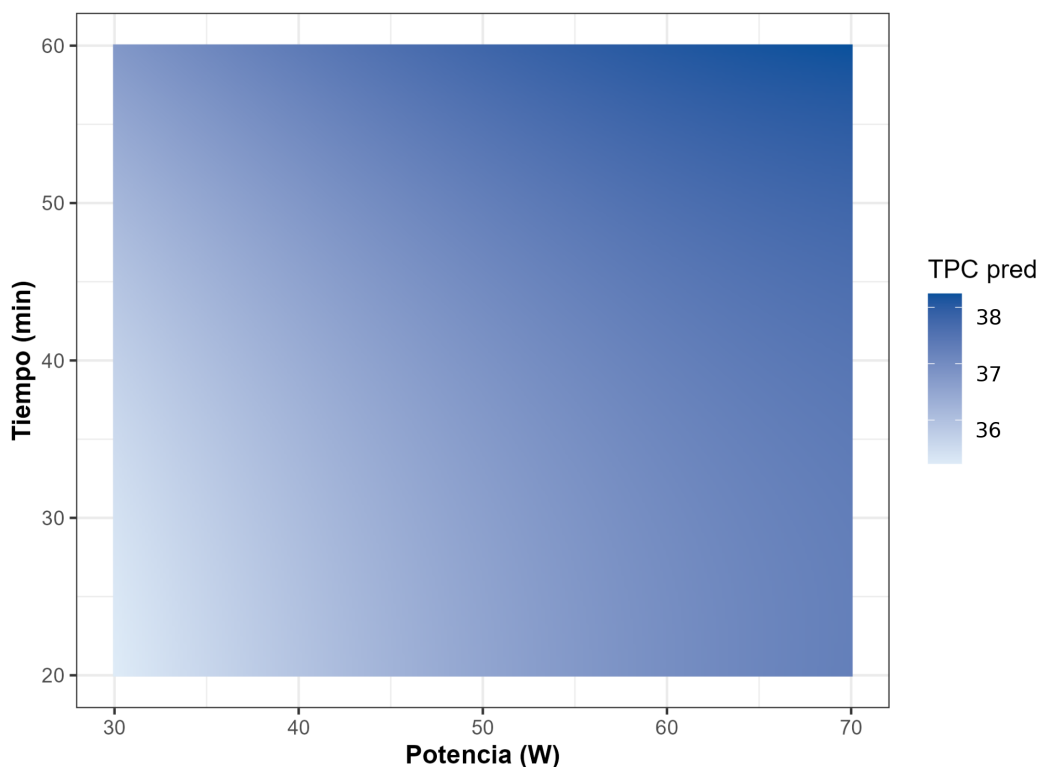


Figura 5.6: Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales en función del tiempo y de la potencia ultrasónica en UAE.

De esta forma, los resultados de UAE muestran que tanto el rendimiento total de extracción como el contenido de polifenoles totales aumentaron al incrementar la potencia y el tiempo dentro del rango estudiado, y que ambos máximos quedaron ubicados en 70 W y 60 min. Esto es consistente con la idea de que, en las condiciones evaluadas, el ultrasonido actuó principalmente intensificando la transferencia de masa, sin que se manifestara todavía una disminución de la respuesta por exceso de tratamiento. En comparación con la maceración, la UAE permitió alcanzar una recuperación fenólica considerablemente mayor y, al mismo tiempo, un mayor rendimiento total de extracto, lo que confirma su utilidad como estrategia de intensificación del proceso.

5.3 Análisis cromatográfico del perfil de antocianinas en extractos obtenidos por UAE

Los dos cromatogramas analizados correspondieron a corridas independientes de extractos obtenido por UAE. En ambas corridas se observó una región cromatográfica principal entre aproximadamente 11 y 23 min, en la cual se concentraron las señales de mayor relevancia asociadas al perfil antociánico del extracto. Asimismo, en ambas corridas se registró una señal intensa en tiempos tempranos,

cercana a 3,13 min, la cual no fue asignada inequívocamente a un compuesto específico en los reportes cromatográficos y, por tanto, no fue considerada dentro de la interpretación principal de las antocianinas identificadas.

En términos generales, los cromatogramas mostraron una buena concordancia en la ubicación de los picos principales. En particular, se asignaron señales correspondientes a delfinidina 3-galactósido, cianidina 3-galactósido, petunidina 3-glucósido y malvidina 3-galactósido. La detección de estos compuestos es consistente con lo esperado para matrices derivadas de arándano, ya que la literatura describe que el perfil antociánico de estos frutos y sus subproductos está constituido principalmente por glicósidos de delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina [71–73]. En este contexto, la presencia de petunidina 3-glucósido y malvidina 3-galactósido resulta especialmente plausible, dado que ambas han sido reportadas como componentes relevantes del perfil de antocianinas en arándano y orujo de arándano [71, 73].

Las diferencias observadas entre ambas corridas se localizaron principalmente en picos menores y en la asignación de algunas señales secundarias, especialmente en la región de tiempos tempranos. Estas diferencias se interpretan principalmente como variaciones asociadas a la inyección, a la integración cromatográfica o al procesamiento de los datos, más que como cambios reales en la composición del extracto. En contraste, la persistencia de las señales principales en tiempos de retención muy similares entre ambas corridas respalda la consistencia del perfil cromatográfico obtenido.

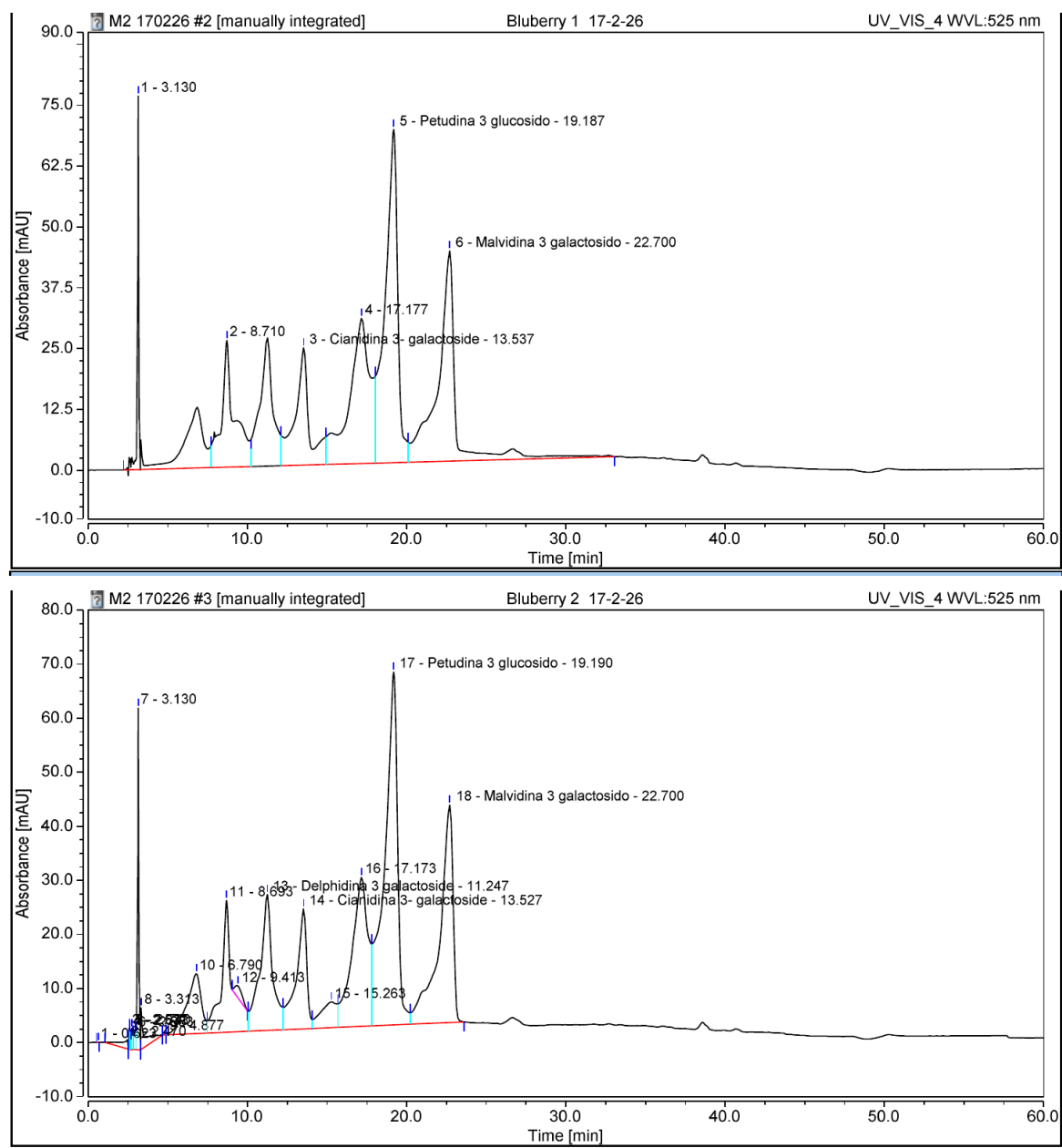


Figura 5.7: Cromatogramas HPLC-DAD correspondientes a las muestras de extractos obtenidos por UAE.

Con el fin de resumir las principales señales cromatográficas de interés, en la Tabla 5.10 se presentan los tiempos de retención y las áreas relativas de los picos asignados a antocianinas en ambas corridas, junto con un pico relevante no asignado observado de forma consistente en la región media del cromatograma.

Tabla 5.10: Principales señales cromatográficas observadas en las muestras de extractos obtenidos por UAE.

Compuesto o señal	TR corrida 1 (min)	Área relativa corrida 1 (%)	TR corrida 2 (min)	Área relativa corrida 2 (%)
Pico temprano no asignado	3,130	9,61	3,130	1,99
Delphinidina 3-galactósido	—	—	11,247	10,38
Cianidina 3-galactósido	13,537	10,48	13,527	7,73
Pico relevante no asignado	17,177	19,31	17,173	14,58
Petunidina 3-glucósido	19,187	26,51	19,190	27,86
Malvidina 3-galactósido	22,700	23,56	22,700	18,04

La ampliación de la imagen de la región cromatográfica principal permite visualizar con mayor claridad la zona en la cual se concentraron las señales de interés. En esta región se observa que la petunidina 3-glucósido y la malvidina 3-galactósido correspondieron a las señales más intensas entre los compuestos asignados en ambas corridas, mientras que la cianidina 3-galactósido mostró una contribución intermedia y la delphinidina 3-galactósido fue asignada en una de las corridas. Esta distribución es compatible con la variabilidad normalmente descrita para el perfil antociánico del arándano, el cual depende del cultivo, del estado de madurez y de las condiciones de procesamiento [71–73].

En cuanto a las señales no asignadas observadas en ambas corridas, su presencia puede explicarse tanto por la complejidad química del orujo de arándano como por las limitaciones propias de un análisis basado en HPLC-DAD, el cual depende de la disponibilidad de estándares analíticos para la identificación. En las condiciones instrumentales utilizadas, la detección a 525 nm resulta adecuada para seguir compuestos antociánicos, ya que esta región del espectro se asocia al catión flavilio; sin embargo, la literatura indica que la identificación inequívoca de antocianinas requiere complementar el tiempo de retención con el espectro UV–Vis completo y, de ser posible, con confirmación por espectrometría de masas [54, 57]. Por ello, el hecho de que se identifiquen solo algunas señales principales no implica necesariamente que los picos restantes carezcan de naturaleza fenólica o pigmentaria, sino más bien que no pudieron asociarse a los estándares contemplados en el estudio.

En el caso particular del arándano, se ha descrito que su perfil antociánico no se limita a unos pocos glicósidos, sino que comprende diversas formas derivadas de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, incluyendo galactósidos, glucósidos y arabinósidos, además de compuestos minoritarios y derivados detectables solo mediante metodologías más confirmatorias [43, 57, 73]. En consecuencia, los picos no asignados presentes en la región intermedia del cromatograma podrían corresponder razonablemente a antocianinas minoritarias o a derivados estructurales no

contemplados dentro del conjunto de estándares utilizados. Esta interpretación resulta coherente con la persistencia de una señal no asignada alrededor de 17,17 min en ambas corridas, lo que sugiere que no se trataría simplemente de ruido instrumental, sino de un componente reproducible del extracto.

Por otra parte, el arándano y su orujo contienen, además de antocianinas, otros compuestos fenólicos relevantes, entre ellos ácidos fenólicos y flavonoles, los cuales forman parte de la matriz polifenólica global del subproducto [43, 46, 47]. En este contexto, no puede descartarse que algunas señales no asignadas correspondan a compuestos no antociánicos o a coeluciones de especies fenólicas presentes en baja concentración. No obstante, esta posibilidad debe interpretarse con cautela, ya que la adquisición a 525 nm favorece principalmente a pigmentos antociánicos y reduce la respuesta relativa de otros fenoles, los cuales suelen monitorearse con mayor sensibilidad a otras longitudes de onda. Así, los picos muy tempranos, como la señal observada a 3,13 min y las señales menores en torno a 8,70 min, podrían asociarse a compuestos más polares, a componentes de matriz, a productos de transformación o a señales parcialmente resueltas cuya identidad no puede establecerse con certeza solo con el cromatograma obtenido.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que los picos no asignados observados en los extractos obtenidos por UAE no deben interpretarse exclusivamente como errores de integración, sino como evidencia de que el extracto presenta una composición más compleja que la descrita por las asignaciones limitadas a los estándares disponibles. Por ello, la interpretación más prudente es considerarlos como señales de compuestos de naturaleza fenólica o pigmentaria probable, posiblemente correspondientes a antocianinas minoritarias, derivados antociánicos o, en algunos casos, otros polifenoles de la matriz [43, 54, 57].

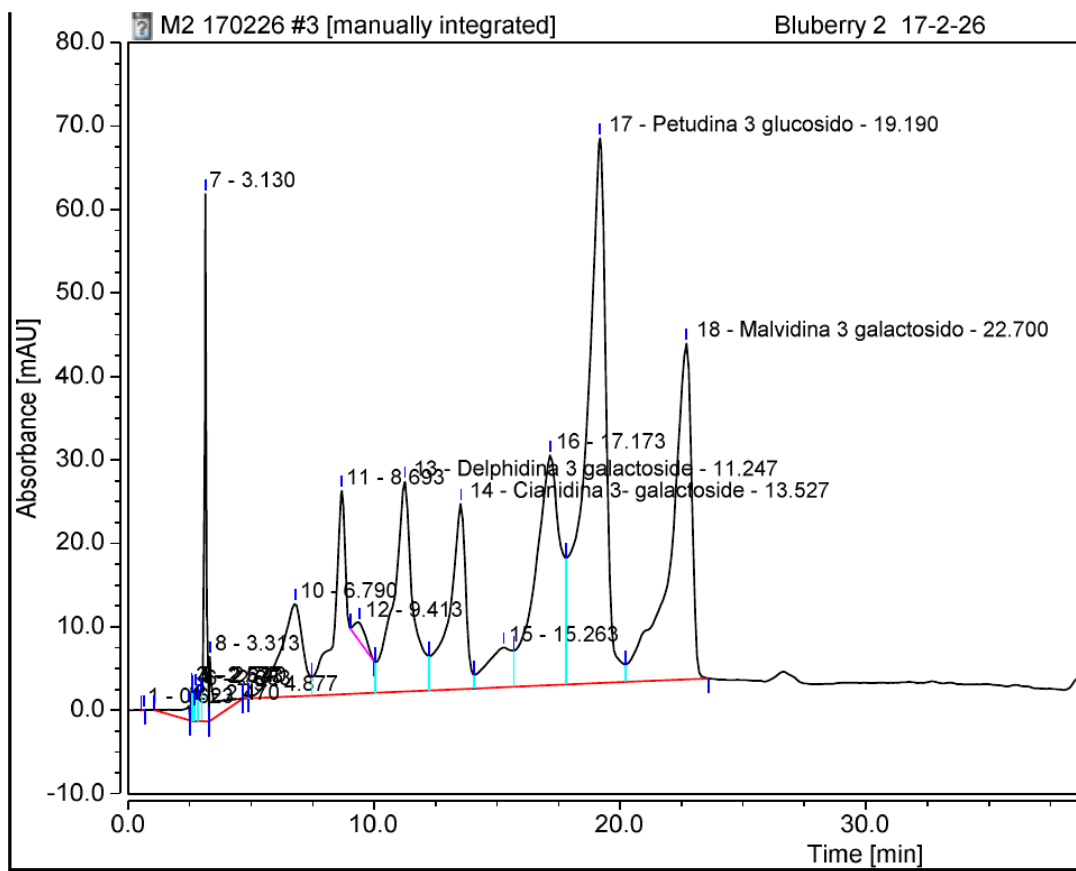
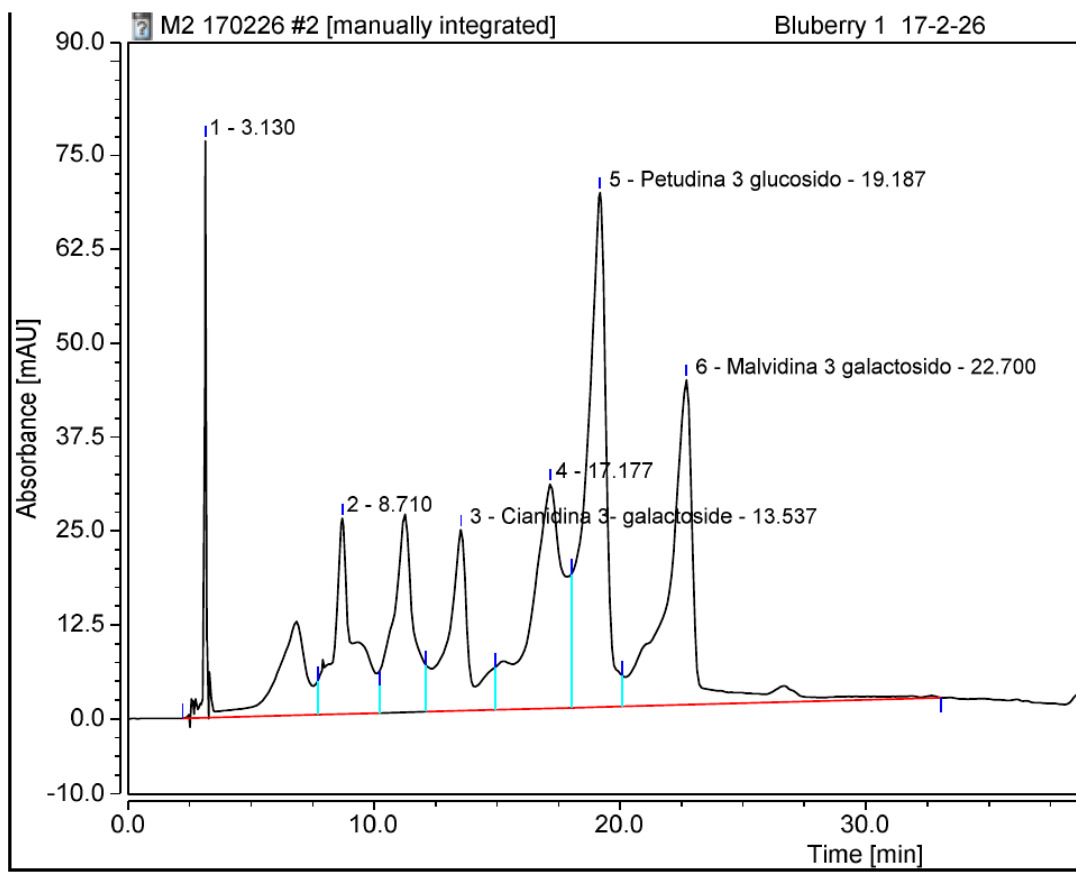


Figura 5.8: Imagen ampliada de la región cromatográfica principal.

Desde el punto de vista funcional, las antocianinas detectadas corresponden a compuestos de alto interés bioactivo. En términos generales, las antocianinas de arándano se han asociado con actividad antioxidante, antiinflamatoria y efectos favorables sobre la salud cardiovascular y el metabolismo de glucosa y lípidos [72]. Adicionalmente, se ha reportado que antocianinas individuales de blueberry, entre ellas delfinidina 3-O-galactósido, petunidina 3-O-glucósido y malvidina 3-O-galactósido, presentan capacidad antioxidante y potencial hipoglucemiante e hipolipidemiante [74]. En particular, la malvidina y sus glicósidos han sido ampliamente destacados por su actividad antioxidante y antiinflamatoria, así como por su posible contribución a la salud cardiometabólica [75]. En consecuencia, el perfil cromatográfico observado respalda que los extractos obtenidos por UAE contienen antocianinas de interés funcional y tecnológico, coherentes con la valorización del orujo de arándano como fuente de compuestos bioactivos.

Cabe señalar que los reportes cromatográficos no entregaron cuantificación absoluta individual de los compuestos. Por ello, la interpretación de estas corridas debe entenderse principalmente en términos de perfil cromatográfico y comparación relativa entre señales, más que como una cuantificación absoluta de cada antocianina individual.

Capítulo 6

Conclusiones y Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que el orujo de arándano constituye una matriz con potencial de valorización para la recuperación de compuestos bioactivos, particularmente polifenoles, mediante extracción con solventes hidroetanólicos y asistencia ultrasónica. El estudio confirmó que tanto la maceración convencional como la extracción asistida por ultrasonido permiten recuperar una fracción relevante de compuestos fenólicos desde este subproducto, lo que respalda su aprovechamiento como materia prima para la obtención de extractos de interés funcional y tecnológico.

En cuanto al objetivo principal del trabajo, los resultados indicaron que la recuperación de polifenoles totales debe priorizarse por sobre el rendimiento gravimétrico global cuando el propósito es revalorizar el orujo de arándano desde una perspectiva funcional. Esto se justifica porque los polifenoles, y en particular las antocianinas, constituyen la fracción bioactiva de mayor interés en esta matriz. Bajo este criterio, la condición de maceración seleccionada como base para la etapa posterior fue 60 min, 60 °C y 40% v/v de etanol, al corresponder a la mejor combinación experimental para maximizar el contenido de polifenoles extraídos dentro del dominio estudiado.

Respecto del primer objetivo específico, se logró evaluar experimentalmente el rendimiento total y el rendimiento de polifenoles de la extracción por maceración hidroetanólica del orujo de arándano. Los resultados mostraron que el contenido de polifenoles totales varió entre $3,72 \pm 0,39$ y $20,30 \pm 1,01$ mg GAE/g DW con un rendimiento del $7,23 \pm 0,76\%$ al $39,48 \pm 1,96\%$ respecto del TPC extraíble, mientras que el rendimiento total de extracción se ubicó entre $16,30 \pm 3,02\%$ y $28,65 \pm 3,73\%$. Estos valores fueron consistentes con antecedentes reportados para matrices comparables tipo berry, lo que permitió establecer que la maceración hidroetanólica constituye una estrategia convencional válida para recuperar compuestos fenólicos y extracto crudo desde el orujo de arándano, aunque con una capacidad de recuperación más acotada que la observada posteriormente para UAE.

En relación con el segundo objetivo específico, se desarrollaron modelos estadísticos de superficie

de respuesta para describir el efecto del tiempo de maceración, la temperatura y la concentración de etanol sobre el contenido de polifenoles totales y sobre el rendimiento total de extracción. En el caso del contenido de polifenoles totales, el modelo ajustado mostró una buena capacidad para representar la respuesta dentro de la región experimental estudiada, permitiendo identificar una condición óptima de 60 min, 60 °C y 40% v/v de etanol, con una predicción de 21,51 mg GAE/g DW. Para el rendimiento total de extracción, el modelo indicó un óptimo distinto, ubicado en 60 min, 60 °C y 60% v/v de etanol, con un valor predicho de 33,17 g/100 g DW. Esta diferencia entre ambos óptimos permitió demostrar que la condición que maximiza la recuperación de polifenoles no coincide necesariamente con la que maximiza la masa total extraída, lo que evidencia la importancia de considerar simultáneamente rendimiento y selectividad en la valorización de subproductos vegetales.

Respecto del tercer objetivo específico, se comprobó que la extracción asistida por ultrasonido intensificó de manera efectiva el proceso de recuperación de compuestos bioactivos desde el orujo de arándano. Los valores experimentales de TPC obtenidos mediante UAE variaron entre $32,65 \pm 0,93$ y $37,94 \pm 0,42$ mg GAE/g DW con rendimientos del $63,50 \pm 1,81\%$ y $73,78 \pm 0,82\%$ respecto del TPC extraíble, superando de forma consistente a los observados por maceración hidroetanólica. De igual forma, la masa extraída aumentó respecto del proceso convencional, con rendimientos de entre el $41,91 \pm 0,12\%$ y $45,07 \pm 0,08\%$. Los modelos de superficie de respuesta ajustados para UAE mostraron que tanto la potencia ultrasónica como el tiempo de sonicación ejercieron efectos positivos sobre ambas respuestas dentro del rango evaluado, sin evidenciar una curvatura significativa. La condición óptima predicha para UAE correspondió a 70 W y 60 min, con un contenido de polifenoles totales de 38,74 mg GAE/g DW y una recuperación relativa de 75,34% respecto del contenido total de polifenoles extraíbles de la matriz.

En conjunto, la comparación entre ambas estrategias permitió concluir que la UAE fue superior a la maceración hidroetanólica tanto en recuperación de polifenoles como en rendimiento total de extracto. Esta mejora es coherente con el efecto de intensificación asociado a la cavitación ultrasónica, la cual favorece la ruptura de la matriz, el acceso del solvente a los solutos y la transferencia de masa. Por ello, la extracción asistida por ultrasonido puede considerarse una alternativa tecnológicamente más eficiente para la valorización del orujo de arándano a escala laboratorio.

De manera complementaria, el análisis cromatográfico de los extractos obtenidos por UAE permitió verificar la presencia de un perfil antociánico compatible con matrices derivadas de arándano. En ambas corridas independientes se observaron señales principales en una región cromatográfica similar y se identificaron compuestos asignados a delfinidina 3-galactósido, cianidina 3-galactósido, petunidina 3-glucósido y malvidina 3-galactósido, destacando especialmente la importancia relativa de petunidina 3-glucósido y malvidina 3-galactósido entre los picos asignados. Aunque los reportes no permitieron cuantificar individualmente cada compuesto en términos absolutos, la consistencia

observada entre ambas corridas y la naturaleza de las antocianinas detectadas respaldan que la UAE no solo incrementó la recuperación global de polifenoles, sino que permitió obtener extractos con compuestos de interés funcional y tecnológico, reforzando el potencial de valorización del orujo de arándano como fuente de ingredientes bioactivos. Adicionalmente, la presencia de picos no asignados pone de manifiesto la complejidad composicional de los extractos obtenidos y sugiere la conveniencia de profundizar en su caracterización en estudios futuros. En este sentido, se recomienda complementar el análisis cromatográfico con metodologías de mayor poder confirmatorio, tales como el análisis del espectro UV-Vis completo y la comparación con estándares adicionales, con el fin de avanzar en la identificación de compuestos minoritarios, derivados antociánicos u otros polifenoles presentes en la matriz.

Finalmente, este trabajo permitió establecer una base experimental y metodológica para el aprovechamiento del orujo de arándano como fuente de compuestos bioactivos. No obstante, los resultados obtenidos corresponden a condiciones de laboratorio y deben interpretarse dentro de ese alcance. En futuras investigaciones, sería recomendable profundizar en la caracterización química de los extractos mediante técnicas cromatográficas, con el fin de identificar individualmente antocianinas y otros polifenoles presentes. Del mismo modo, sería pertinente evaluar la actividad antioxidante y la estabilidad de los extractos obtenidos bajo distintas condiciones de almacenamiento, así como explorar la influencia de otras variables operacionales relevantes en UAE, tales como amplitud, temperatura efectiva del medio y relación sólido/líquido. Finalmente, para avanzar hacia una eventual aplicación tecnológica, se recomienda estudiar el escalamiento del proceso, su factibilidad económica y la incorporación de los extractos en alimentos funcionales, ingredientes antioxidantes o formulaciones nutracéuticas.

Referencias

- [1] Jaime Antonio Bravo Mina. Mercado de arándanos, sin nubarrones en el horizonte, October 2012. Publicado en octubre de 2012.
- [2] Adriana Valenzuela Palma. Boletín de fruta, febrero 2026, February 2026. Boletín del rubro frutas frescas y procesadas.
- [3] IPCC. Waste management. In Bert Metz, Ogunlade R. Davidson, Peter R. Bosch, Rutu Dave, and Leo A. Meyer, editors, *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007.
- [4] United Nations Environment Programme. Solid waste management, 2022. Consultado el 10 de marzo de 2026.
- [5] United Nations Environment Programme. A snapshot of the world's water quality: Towards a global assessment. Technical report, United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya, 2016.
- [6] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food wastage footprint: Impacts on natural resources. summary report. Technical report, FAO, Rome, 2013.
- [7] Tianyu Huang et al. Active ingredients of blueberry pomace. *Current Opinion in Food Science*, 56:101004, 2025.
- [8] Bakary S. B. Bamba, Jianguo Shi, Christophe Tranchant, Shu Xue, Charles F. Forney, and Li Lim. Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace (*Vaccinium* sp.). *Molecules*, 23(7):1685, 2018.
- [9] Anamarija Lončarić, Antun Jozinović, Josip Babić, Dragana Mišić, Ante Ivanković, Mira Ivanković, and Zoran Babić. Green extraction methods for extraction of polyphenolic compounds from grape by-products. *Foods*, 9(11):1629, 2020.

- [10] Norma Medina-Torres, Teresa Ayora-Talavera, Héctor Espinosa-Andrews, Martha E. Sosa-Morales, and Adrián Sánchez-Contreras. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable matrices. *Agronomy*, 7(3):47, 2017.
- [11] A. S. Naik, R. Vadivambal, and D. S. Jayas. Ultrasound treatment: A cohort review on bioactive compounds, stability and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70:105353, 2021.
- [12] Ling Ouyang et al. Ultrasound-assisted green natural deep eutectic solvent extraction of flavonoids from wild blueberries. *Foods*, 14(19):3325, 2025.
- [13] J. Felipe Osorio-Tobón. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12):4299–4315, 2020.
- [14] Adithya Sridhar, Muthamilselvi Ponnuchamy, Ponnusamy Senthil Kumar, Ashish Kapoor, Dai-Viet N. Vo, and Sivaraman Prabhakar. Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4):3409–3443, 2021.
- [15] X. Zhang, Y. Chen, L. Wang, et al. Recovering high value-added anthocyanins from blueberry pomace with ultrasound-assisted extraction. *Current Research in Food Science*, 5:311–320, 2022.
- [16] Norma Medina-Torres et al. Ultrasound-assisted extraction optimization of phenolic compounds from citrus wastes by response surface methodology. *Molecules*, 24(19):3541, 2019.
- [17] Sandra Pedisić, Zoran Zorić, Maja Repajić, Branka Levaj, Ana Dobrinčić, Sandra Balbino, Zrinka Čošić, Verica Dragović-Uzelac, and Ivona Elez Garofulić. Valorization of berry fruit by-products: Bioactive compounds, extraction, health benefits, encapsulation and food applications. *Foods*, 14(8):1354, 2025.
- [18] Tianyu Huang, Yu Zhang, Linxiang Qiao, Donglan Luo, Liangjie Ba, Su Xu, Lingshuai Meng, Sen Cao, Tao Wang, and Xiaohong Kou. Active ingredients of blueberry pomace: A comprehensive review of isolation, identification, health benefits and food applications. *Food Chemistry: X*, 27:102459, 2025.
- [19] Kshitiz Kumar, Shivmurti Srivastav, and Vijay Singh Sharanagat. Ultrasound assisted extraction (uae) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70:105325, 2020.
- [20] Bo He, Ling-Li Zhang, Xue-Yang Yue, Jin Liang, Jun Jiang, Xue-Ling Gao, and Peng-Xiang Yue. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204:70–76, 2016.

- [21] M. José Jara-Palacios, Adela Santisteban, Belén Gordillo, Dolores Hernanz, Francisco J. Heredia, and M. Luisa Escudero-Gilete. Comparative study of red berry pomaces (blueberry, red raspberry, red currant and blackberry) as source of antioxidants and pigments. *European Food Research and Technology*, 245(1):1–9, 2019.
- [22] Iga Piasecka, Artur Wiktor, and Agata Górka. Alternative methods of bioactive compounds and oils extraction from berry fruit by-products—a review. *Applied Sciences*, 12(3):1734, 2022.
- [23] Liza Laroze, Carmen Soto, and María Elvira Zúñiga. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6), 2010.
- [24] Suelen Siqueira dos Santos, Carolina Moser Paraíso, Letícia Misturini Rodrigues, and Grasielle Scaramal Madrona. Agro-industrial waste as a source of bioactive compounds: Ultrasound-assisted extraction from blueberry (*Vaccinium myrtillus*) and raspberry (*Rubus idaeus*) pomace. *Acta Scientiarum. Technology*, 43:e55567, 2021.
- [25] L. Klavins, J. Kviesis, and M. Klavins. Comparison of methods of extraction of phenolic compounds from american cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.) press residues. *Agronomy Research*, 15(Special Issue 2):1316–1329, 2017.
- [26] L. Klavins, J. Kviesis, I. Nakurte, and M. Klavins. Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: Extraction optimisation and analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 93:583–591, 2018.
- [27] Iga Piasecka, Rita Brzezińska, Stanisław Kalisz, Artur Wiktor, and Agata Górka. Response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted antioxidants extraction from blackberry, chokeberry and raspberry pomaces. *Plants*, 13(8):1120, 2024.
- [28] Doha Khalaf, Delphine Pradal, and Krasimir Dimitrov. Multi-criteria optimization including environmental impacts of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from blackcurrant pomace by-product. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 204:109935, 2024.
- [29] Bartosz Kruszewski and Emanuele Boselli. Blackcurrant pomace as a rich source of anthocyanins: Ultrasound-assisted extraction under different parameters. *Applied Sciences*, 14(2):821, 2024.
- [30] Douglas C. Montgomery. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 9 edition, 2017.

- [31] Raymond H. Myers, Douglas C. Montgomery, and Christine M. Anderson-Cook. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 4 edition, 2016.
- [32] Centro de Biotecnología de Sistemas, Universidad Andrés Bello. Extractos naturales de arándanos, topinambur y miel para la salud digestiva. Ficha institucional / material de difusión, 2022.
- [33] Noticias UNAB. Suplemento alimenticio desarrollado por csb unab destaca en catálogo de innovación alimentaria 2024, October 2024. Consultado el 19 de enero de 2026.
- [34] Arantruf. Polvo de arándanos fermentados: Descripción del producto y proceso de obtención del orujo. <https://arantruf.cl>, 2025. Consultado en 2025.
- [35] J. Xu et al. The effect of low-temperature storage on the activity of polyphenol oxidase and peroxidase in mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 69(3):339–346, 2005.
- [36] Nur A. F. Zawawi et al. Thermal, high pressure, and ultrasound inactivation of polyphenol oxidase in foods: A review. *Applied Sciences*, 12(4):1864, 2022.
- [37] Laura Lavefve et al. Changes in polyphenolics during storage of products and implications for shelf life. *Frontiers in Nutrition*, 7:116, 2020.
- [38] Laura Neri et al. Antioxidant activity in frozen plant foods: Effect of freezing and frozen storage. *Foods*, 9(11):1704, 2020.
- [39] RADWAG. Manual de instrucciones del analizador de humedad de la serie pmc, July 2013. Número de instrucción: LMI-51-08/07/13/ES. RADWAG, Radom, Polonia.
- [40] Diego F. Tirado Armesto, Piedad Margarita Montero Castillo, and Diofanor Acevedo Correa. Estudio comparativo de métodos empleados para la determinación de humedad de varias matrices alimentarias. *Información Tecnológica*, 26(2):3–10, 2015.
- [41] Joana Schuelter Boeing, Erica Oliveira Barizão, Beatriz Costa e Silva, Paula Fernandes Montanher, Vitor de Cinque Almeida, and Jesuí Vergílio Visentainer. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8(1):48, 2014.
- [42] Yessenia Valeria Reinoso Rojas. *Optimización del proceso de extracción de antocianinas y polifenoles totales a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) mediante extracción con CO₂ supercrítico, solventes presurizados, ultrasonido y extracción convencional*. PhD thesis, Universidad de Chile, 2022.

- [43] Xinyu Bai, Lin Zhou, Li Zhou, et al. The research progress of extraction, purification and analysis methods of phenolic compounds from blueberry: A comprehensive review. *Molecules*, 28(8):3610, 2023.
- [44] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Soil water content: Gravimetric method. *FAO Field Measurement Manual*, 2023. Oven drying at 105 °C until constant mass.
- [45] Hielscher Ultrasonics GmbH. Operating manual ultrasonic processor up200st. <https://www.hielscher.com>, 2019. Manual técnico del procesador ultrasónico UP200St.
- [46] J. Lee and R. E. Wrolstad. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Journal of Food Science*, 69(7):C564–C573, 2004.
- [47] Susanne Struck, Merichel Plaza, Charlotta Turner, and Harald Rohm. Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6):1305–1318, 2016.
- [48] Ieva Jurevičiūtė, Milda Keršienė, Loreta Bašinskienė, Daiva Leskauskaitė, and Ina Jasutienė. Characterization of berry pomace powders as dietary fiber-rich food ingredients with functional properties. *Foods*, 11(5):716, 2022.
- [49] Vernon L. Singleton and Joseph A. Rossi. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3):144–158, 1965.
- [50] L. Gao and G. Mazza. Method for the determination of tannins in fruits as total phenolics and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11):1906–1910, 1993.
- [51] Andrew L. Waterhouse. Determination of total phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pages I1.1.1–I1.1.8. John Wiley & Sons, 2002.
- [52] Russell V. Lenth. Response-surface methods in r, using rsm. *Journal of Statistical Software*, 32(7):1–17, 2009.
- [53] Richard H. Byrd, Peihuang Lu, Jorge Nocedal, and Ciyu Zhu. A limited memory algorithm for bound constrained optimization. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 16(5):1190–1208, 1995.
- [54] Cara R. Welch, Qingli Wu, and James E. Simon. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*, 4(2):75–101, 2008.

- [55] Carolina Fredes, Gad G. Yousef, Paz Robert, Mary H. Grace, Mary Ann Lila, Miguel Gómez, Marlene Gebauer, and Gloria Montenegro. Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13):2639–2648, 2014.
- [56] Carolina Fredes, Camila Becerra, Javier Parada, and Paz Robert. The microencapsulation of maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) juice by spray-drying and freeze-drying produces powders with similar anthocyanin stability and bioaccessibility. *Molecules*, 23(5):1227, 2018.
- [57] Rebecca E. Stein-Chisholm, John C. Beaulieu, Casey C. Grimm, and Steven W. Lloyd. Lc–ms/ms and uplc–uv evaluation of anthocyanins and anthocyanidins during rabbiteye blueberry juice processing. *Beverages*, 3(4):56, 2017.
- [58] Ana Bucic-Kojic, Mirela Planinic, Srecko Tomas, Mate Bilic, and Darko Velic. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1):236–242, 2007.
- [59] Weiwei Hu, Hui Gong, Lanqi Li, Shiguo Chen, and Xingqian Ye. Ultrasound treatment on stability of total and individual anthocyanin extraction from blueberry pomace: Optimization and comparison. *Molecules*, 24(14):2621, 2019.
- [60] Maiara Cristina Secco, Bruno Fischer, Ilizandra Aparecida Fernandes, Rogério Luis Cansian, Natalia Paroul, and Alexander Junges. Valorization of blueberry by-products (*Vaccinium* spp.): Antioxidants by pressurized liquid extraction (PLE) and kinetics models. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(2):1692–1704, 2022.
- [61] Arland T. Jr. Hotchkiss, Hoa K. Chau, Gary D. Strahan, et al. Structure and composition of blueberry fiber pectin and xyloglucan that bind anthocyanins during fruit puree processing. *Food Hydrocolloids*, 116:106572, 2021.
- [62] Poorva Sharma, Michael T. Nickerson, and Darren R. Korber. Valorization of berry pomace for extraction of polyphenol compounds and its co-encapsulation with probiotic bacteria. *Food Bioscience*, 61:105124, 2024.
- [63] Rodrigo Nicolás Pérez Arancibia. *Evaluación del efecto de extractos obtenidos desde frutos de Ugni molinae Turcz. sobre la agregación proteica asociada a enfermedades neurodegenerativas*. PhD thesis, Universidad de Chile, 2020.
- [64] Bo He, Ling-Li Zhang, Xiao-Yan Yue, Jing Liang, Juan Jiang, Xiao-Li Gao, and Pei-Xi Yue. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204:70–76, 2016.

- [65] N. Katsinas et al. A green and selective phenolic extraction process from olive leaves. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021.
- [66] Claudia Bas-Bellver, Cristina Andrés, Lucía Seguí, Cristina Barrera, Nuria Jiménez-Hernández, Alejandro Artacho, Noelia Betoret, and María José Gosalbes. Valorization of persimmon and blueberry byproducts to obtain functional powders: In vitro digestion and fermentation by gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(30):8080–8090, 2020.
- [67] Tianyu Huang, Yu Zhang, Linxiang Qiao, Donglan Luo, Liangjie Ba, Su Xu, Lingshuai Meng, Sen Cao, Tao Wang, and Xiaohong Kou. Active ingredients of blueberry pomace: A comprehensive review of isolation, identification, health benefits and food applications. *Food Chemistry: X*, 27:102459, 2025.
- [68] Wilhelmina Kalt, Aedin Cassidy, Luke R. Howard, Robert Krikorian, April J. Stull, Francois Tremblay, and Raul Zamora-Ros. Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 11(2):224–236, 2020.
- [69] Anna Michalska and Grzegorz Lysiak. Bioactive compounds of blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8):18642–18663, 2015.
- [70] Giorgio Capaldi, Clelia Aimone, Emanuela Calcio Gaudino, Kristina Radošević, Martina Bagović, Giorgio Grillo, and Giancarlo Cravotto. The green extraction of blueberry by-products: An evaluation of the bioactive potential of the anthocyanin/polyphenol fraction. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(20):11032, 2024.
- [71] Xuan Zhang, Songen Wang, Qixia Wu, Maurizio Battino, Francesca Giampieri, Weibin Bai, and Lingmin Tian. Recovering high value-added anthocyanins from blueberry pomace with ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry: X*, 16:100476, 2022.
- [72] Wenjuan Yang, Yuxi Guo, Meng Liu, Xuefeng Chen, Xuyang Xiao, Shengnan Wang, Pin Gong, Yangmin Ma, and Fuxin Chen. Structure and function of blueberry anthocyanins: A review of recent advances. *Journal of Functional Foods*, 88:104864, 2022.
- [73] A. E. Ribera, M. Reyes-Díaz, M. Alberdi, G. E. Zuñiga, and M. L. Mora. Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* l.) grown in southern chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4):509–536, 2010.

- [74] Chao-wei Zhu, Han Lü, Lan-lan Du, Jing Li, Han Chen, Hui-fang Zhao, Wen-long Wu, Jian Chen, and Wei-lin Li. Five blueberry anthocyanins and their antioxidant, hypoglycemic, and hypolipidemic effects in vitro. *Frontiers in Nutrition*, 10:1172982, 2023.
- [75] Anna Merecz-Sadowska, Przemysław Sitarek, Tomasz Kowalczyk, Karolina Zajdel, Mariusz Jecek, Paweł Nowak, and Radosław Zajdel. Food anthocyanins: Malvidin and its glycosides as promising antioxidant and anti-inflammatory agents with potential health benefits. *Nutrients*, 15(13):3016, 2023.

Apéndice A

Anexos

A.1 Antecedentes de Arantruf

Arantruf es una empresa familiar chilena fundada en 2007, ubicada en el Fundo Santa Raquelita, sector Bajo Meco, camino Lautaro–Curacautín, en la comuna de Lautaro, Región de La Araucanía, Chile. Su desarrollo productivo se ha vinculado principalmente al cultivo de arándanos orgánicos y a la producción de trufa negra del Périgord, en un entorno de carácter precordillerano. De acuerdo con los antecedentes disponibles de la empresa, dentro de su trayectoria productiva se incorporaron plantaciones de arándanos correspondientes a las variedades Brigitta y Legacy, ambas arándano de arbusto alto. En este marco, la empresa ha orientado su actividad hacia sistemas de producción con énfasis en la agricultura orgánica y en la diferenciación de materias primas de origen local.

Con el transcurso de los años, Arantruf ha ampliado su enfoque hacia estrategias de aprovechamiento de residuos y subproductos agrícolas, en concordancia con principios de sustentabilidad y valorización de biomasa. Esta evolución ha permitido articular la producción primaria con iniciativas de innovación orientadas al desarrollo de productos de mayor valor agregado, particularmente a partir del uso integral del arándano y de sus subproductos. En este contexto, la empresa constituye un caso de interés para el estudio de alternativas de diversificación e innovación agroalimentaria en el sur de Chile.

A.2 Modelo completo para el contenido de polifenoles totales por maceración hidroetanólica

El modelo completo ajustado para el contenido de polifenoles totales por maceración hidroetanólica fue el siguiente:

$$\begin{aligned}\hat{y}_{\text{TPC}} = & 13,5407 + 4,0307 x_1 + 0,6102 x_2 - 1,1235 x_3 + 2,9331 x_1^2 \\ & - 0,8659 x_2^2 - 6,4290 x_3^2 - 0,0817 x_1 x_2 - 1,2677 x_1 x_3 - 0,4390 x_2 x_3.\end{aligned}\quad (\text{A.1})$$

A.3 Modelo completo para el rendimiento total de extracción por maceración hidroetanólica

El modelo completo ajustado para el rendimiento total de extracción por maceración hidroetanólica fue el siguiente:

$$\begin{aligned}\hat{y}_{\text{masa}} = & 25,6140 + 0,0192 x_1 + 1,8913 x_2 - 0,0408 x_3 + 5,2993 x_1^2 - 1,8485 x_2^2 - 3,6742 x_3^2 \\ & + 1,8058 x_1 x_2 - 0,0814 x_2 x_3 + 2,4494 x_1 x_3.\end{aligned}\quad (\text{A.2})$$

A.4 Modelo completo para el rendimiento total de extracción por UAE

El modelo completo para el rendimiento total de extracción por extracción asistida por ultrasonido fue el siguiente:

$$\hat{y}_{\text{masa}} = 40,7540 + 0,9357 x_1 + 0,9199 x_2 + 0,0684 x_1 x_2 + 0,0128 x_1^2 + 0,1404 x_2^2 \quad (\text{A.3})$$

A.5 Modelo completo para el contenido de polifenoles totales por extracción asistida por ultrasonido

El modelo completo ajustado para el contenido de polifenoles totales por extracción asistida por ultrasonido fue el siguiente:

$$\hat{y}_{\text{TPC}} = 35,4997 + 1,5055 x_1 + 1,1143 x_2 - 0,2474 x_1 x_2 - 0,4751 x_1^2 + 0,5117 x_2^2. \quad (\text{A.4})$$