



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

**Aprovechamiento integral de la grosella negra como fuente de  
compuestos bioactivos para el desarrollo de productos deshidratados**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos

Aires en el área Química Industrial

**Lic. Maite Gagneten**

Directora de tesis: Dra. Carolina C. Schebor

Co-directora de tesis: Dra. Daniela M. Salvatori

Consejera de estudios: Dra. Andrea B. Nieto

Lugar de trabajo: ITAPROQ (CONICET-Universidad de Buenos Aires)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2020

# **Aprovechamiento integral de la grosella negra como fuente de compuestos bioactivos para el desarrollo de productos deshidratados**

## **Resumen**

El objetivo de este trabajo fue lograr un aprovechamiento integral de la grosella negra con el fin de agregar valor a su producción y reducir los desperdicios comúnmente generados por la industria de jugos y concentrados. Por un lado se trabajó sobre el proceso de obtención de jugo, llevándose a cabo una optimización de la extracción de compuestos bioactivos de la fruta mediante el uso de la tecnología de campo eléctrico pulsado seguido de un prensado en frío. El jugo obtenido se deshidrató por secado por aspersión para obtener un ingrediente en polvo. La tecnología de campo eléctrico pulsado favoreció significativamente la liberación de compuestos antioxidantes del tejido vegetal. Un análisis por espectrometría FT-IR y Raman no mostró alteraciones en la estructura química de estos compuestos como consecuencia del tratamiento aplicado. Por otro lado, el residuo remanente luego del prensado en frío se liofilizó para desarrollar un ingrediente rico en fibra y compuestos fenólicos, para adicionar a galletitas de chocolate libres de gluten. Se observó que las galletitas adicionadas con el ingrediente liofilizado presentaron casi 2,5 veces más fibra dietaria total que las galletitas control, alcanzándose un contenido que permitiría al alimento llevar la declaración “fuente de fibra”. Además, el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante se incrementaron más de un 60%. Finalmente, el análisis sensorial con consumidores demostró que la galletita adicionada con el ingrediente de grosella negra presentó una elevada aceptabilidad global por parte de los consumidores.

**Palabras clave:** grosella negra, electroporación, deshidratación, compuestos fenólicos, fibra dietaria, galletitas libres de gluten.

# **Integral use of blackcurrant as a source of bioactive compounds for the development of dehydrated products**

## **Abstract**

The objective of this work was to achieve an integral use of blackcurrant in order to add value to its production and reduce the waste commonly generated by the juice industry. On one hand, the juice extraction process was assessed by means of optimizing the extraction of bioactive compounds using pulsed electric field technology, followed by cold pressing. The obtained juice was dehydrated by spray-drying to obtain a powdered ingredient. Pulsed electric field technology significantly favored the release of antioxidant compounds from fruit tissue. An analysis by FT-IR and Raman spectrometry did not show alterations in the chemical structure of these compounds as a consequence of the PEF treatment. On the other hand, the residue obtained after cold pressing was lyophilized to develop an ingredient rich in fiber and phenolic compounds, to be added to gluten-free chocolate cookies. It was observed that the cookies added with the freeze-dried ingredient had almost 2.5 times more total dietary fiber than the control cookies, reaching a content that would allow the food to carry the declaration "source of fiber". Furthermore, the content of bioactive compounds and antioxidant activity increased more than 60%. Finally, the sensory analysis with consumers showed that the cookie added with the blackcurrant ingredient presented a high global acceptability by consumers.

**Keywords:** blackcurrant, dehydration, phenolic compounds, dietary fiber, gluten free cookies.

## **Agradecimientos**

Agradezco la oportunidad de haber podido realizar este trabajo de tesis doctoral a todas las personas que lo hicieron posible y que me acompañaron de una u otra manera a lo largo de este camino de aprendizaje, formación y crecimiento personal y profesional.

A mi directora Carolina Schebor por su constante dedicación y guía en el trabajo de investigación y escritura. Por su confianza en mí y su calidez humana. A mi codirectora Daniela Salvatori por su indispensable aporte científico y mirada crítica.

A las instituciones que hicieron posible el desarrollo del presente trabajo. A ANPCyT y CONICET por el otorgamiento de las becas de formación. Al Departamento de Industrias y el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y al Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos por aportar sus instalaciones.

A Pilar Buera y todos los investigadores, formados y en formación, del grupo de investigación del Laboratorio de Propiedades y Conservación de Biomoléculas, por permitirme ser parte del equipo. Gracias Florencia, Patricio, Graciela, Cristina, Silvio y Verónica por su consejo, ayuda y ejemplo. A Paula y a Nahuel por compartir su curiosidad científica y mostrarme caminos alternativos de la investigación.

Gracias a mis compañeros de ruta y amigos Tatiana, Rocío, Guido, Gastón, Leonardo, Diego, Hernando, Agustina y Milagros, por su compañía diaria, por el sostén, los ánimos, las risas y los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. A Silvio, que me acompañó y apoyó durante este recorrido.

A mi abuela por transmitir a sus nietas y nietos una mentalidad curiosa y ávida de conocimiento. A mi abuelo, por su alegría e incondicionalidad.

A mis papás por promover y alentar constantemente mi formación como persona y profesional y, junto a mis hermanas, por estar siempre, por acompañarme y escucharme.

Gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Grosella negra ( <i>Ribes nigrum</i> L.).....	4
1.1.1. Generalidades.....	4
1.1.2. Composición química y propiedades funcionales .....	6
1.1.2.a. Compuestos fenólicos.....	8
1.1.2.b. Fibra dietaria .....	11
1.1.3. Producción de grosella negra .....	14
1.1.3.a. Producción mundial .....	14
1.1.3.b. Producción nacional .....	14
1.2. Procesos de extracción .....	15
1.2.1. Tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF).....	16
1.2.1.a. Extracción asistida por PEF .....	19
1.3. Procesos de deshidratación .....	21
1.3.1. Secado por aspersion .....	21
1.3.2. Liofilización .....	24
1.3.3. Secado convectivo .....	27
1.3.4. Propiedades físicas y aspectos de calidad de productos deshidratados ..	28
1.4. Pérdidas y desperdicios de alimentos .....	30
1.4.1. Pérdidas y desperdicios de frutas y hortalizas en Argentina y Latinoamérica .....	32
1.5. El gluten y la enfermedad celíaca .....	33
1.5.1. Enfermedad celíaca.....	33
1.5.2. El gluten en los alimentos .....	34
1.5.3. Productos libres de gluten.....	35
1.5.4. Productos libres de gluten en el mercado argentino.....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
2.1. Objetivo General.....	40

2.2. Objetivos específicos.....	40
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
<b>PARTE I: Caracterización de la materia prima</b>	
3.1. Materiales .....	43
3.2. Análisis físicoquímicos .....	43
3.2.1. Contenido de agua.....	43
3.2.2. Sólidos solubles, acidez total y pH .....	43
3.2.3. Análisis de propiedades funcionales .....	44
3.2.3.a. Extracción .....	44
3.2.3.b. Contenido de polifenoles totales .....	44
3.2.3.c. Contenido de antocianinas monoméricas totales.....	45
3.2.3.d. Actividad antioxidante.....	45
<b>PARTE II: Aprovechamiento optimizado del jugo de grosella negra</b>	
3.3. Materiales .....	47
3.4. Estudio y optimización del tratamiento por campo eléctrico pulsado (PEF)....	48
3.4.1. Tratamientos PEF.....	48
3.4.2. Optimización del tratamiento PEF .....	50
3.4.3. Efecto de la temperatura en el tratamiento PEF .....	53
3.5. Obtención del jugo y análisis de sus propiedades físicoquímicas y funcionales.....	53
3.5.1. Sólidos solubles, acidez total y pH .....	54
3.5.2. Contenido de polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales y actividad antioxidante .....	54
3.5.3. Liofilización del jugo para fines analíticos.....	54
3.5.4. Estudio del efecto del tratamiento PEF por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y análisis multivariado .....	54
3.5.5. Estudio del efecto del tratamiento PEF por espectrometría Raman .....	54
3.5.6. Estudio del efecto del tratamiento PEF sobre los compuestos fenólicos del jugo por HPLC-DAD .....	54

3.6. Obtención del ingrediente deshidratado a partir del jugo de grosella negra por secado por aspersión .....	57
3.6.1. Pretratamiento de campo eléctrico pulsado y prensado en frío .....	57
3.6.2. Deshidratación por secado por aspersión .....	57
3.7. Caracterización del polvo de grosella negra.....	58
3.7.1. Análisis fisicoquímicos .....	58
3.7.1.a. Contenido de agua y actividad de agua.....	59
3.7.1.b. Cohesividad y fluidez del polvo .....	59
3.7.1.c. Solubilidad .....	60
3.7.1.d. Higroscopicidad .....	60
3.7.1.e. Color .....	60
3.7.2. Análisis de propiedades funcionales: CPT, AMT y AA .....	61
3.8. Diseño experimental y análisis estadístico .....	61

### **PARTE III: Aprovechamiento del residuo de grosella negra**

3.9. Materiales .....	62
3.10. Obtención del polvo a partir del residuo del prensado de grosella .....	63
3.11. Elaboración de galletitas de chocolate libres de gluten con agregado de PL.....	63
3.12. Estudio y caracterización del ingrediente PL y de las galletitas.....	64
3.12.1. Análisis fisicoquímicos y de microestructura.....	65
3.12.1.a. Contenido de agua y actividad de agua.....	65
3.12.1.b. Acidez total y pH .....	65
3.12.1.c. Color .....	65
3.12.1.d. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	65
3.12.2. Análisis de propiedades funcionales .....	66
3.12.2.a. Contenido de fibra.....	66
3.12.2.b. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante .....	66
3.12.3. Composición centesimal.....	67
3.12.3.a. Contenido de proteína bruta .....	67
3.12.3.b. Contenido de lípidos .....	67

3.12.3.c. Cenizas .....	68
3.12.3.d. Minerales.....	68
3.12.4. Caracterización adicional de las galletitas.....	69
3.12.4.a. Dimensiones .....	69
3.12.4.b. Presencia de gluten .....	69
3.12.4.c. Análisis de textura .....	69
3.12.4.d. Digestión <i>in vitro</i> .....	71
3.12.4.e. Análisis sensorial.....	73
3.13. Análisis estadístico.....	74
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>

#### **PARTE I: Caracterización de la materia prima**

4.1. Caracterización de los frutos de grosella negra congelados.....	77
--	----

#### **PARTE II: Aprovechamiento optimizado del jugo de grosella negra**

4.2. Estudio y optimización de la extracción asistida por campo eléctrico pulsado.....	79
4.2.1. Caracterización del extracto óptimo.....	86
4.2.2. Efecto de la temperatura en el tratamiento PEF .....	88
4.2.3. Estudio del efecto del tratamiento PEF mediante técnicas de espectroscopía Raman y FT-IR .....	91
4.2.4. Estudio del efecto del tratamiento PEF sobre los compuestos fenólicos del jugo por HPLC-DAD .....	97
4.2.5. Integración de resultados por análisis de componentes principales .....	102
4.3. Obtención y caracterización del ingrediente deshidratado.....	104

#### **PARTE III: Aprovechamiento del jugo residuo de grosella negra**

4.4. Caracterización del polvo liofilizado del residuo de grosella negra (PL).....	107
4.5. Formulación y caracterización fisicoquímica de galletitas de chocolate libres de gluten adicionadas con PL.....	111
4.6. Análisis de las propiedades texturales y estudio de los atributos sensoriales de galletitas de chocolate libres de gluten adicionadas con PL.....	119



4.6.1. Análisis de textura .....	119
4.6.1.a. Propiedades mecánicas (análisis instrumental).....	119
4.6.1.b. Análisis de textura por imagen.....	122
4.6.2. Análisis sensorial.....	128
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>136</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>
<b>7. ANEXO .....</b>	<b>160</b>

## NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

### Nomenclatura y abreviaciones específicas

$\Delta F_{\text{máx}}$	Distancia correspondiente a la fuerza máxima
%HR	Porcentaje de humedad relativa
$\Delta E^*_{00}$	Variación global del color en el espacio CIELAB
AA	Actividad antioxidante
ABTS <sup>+</sup>	Radical 2,20-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]
ACELA	Asistencia al celíaco de Argentina
AMT	Antocianinas monoméricas totales
ASM	Energía o asimetría
$a_w$	Actividad de agua
b.s.	Base seca
CAA	Código Alimentario Argentino
CAPALIGLU	Cámara de Productores de Alimentos Libres de Gluten y Afines
CDC	Cámara digital
CI	Índice de compresión de Carr
CON	Contraste
COR	Correlación
CPT	Compuestos polifenoles totales
DE	Equivalentes de dextrosa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ENT	Entropía
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FAO	Food and Agricultural Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FDI	Fibra dietaria insoluble
FDS	Fibra dietaria soluble
FDT	Fibra dietaria total
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
$F_{\text{máx}}$	Fuerza máxima
FSS	Fluido salival simulado
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
Galletita GN	Galletita adicionada con ingrediente de grosella negra
GLCM	Matriz de co-ocurrencia de grises

H	Índice de Hausner
HOM	Homogeneidad
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IQF	Congelado rápido individual
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
PEF	Campo eléctrico pulsado
PL	Polvo de grosella negra obtenido por liofilización a partir del residuo
PS	Polvo de grosella negra obtenido por secado por aspersión a partir del jugo
RLM	Regresiones lineales múltiples
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SEM	Microscopía electrónica de barrido
T	Temperatura
T.A.C.C.	Trigo, Avena, Cebada y Centeno
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea

---

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

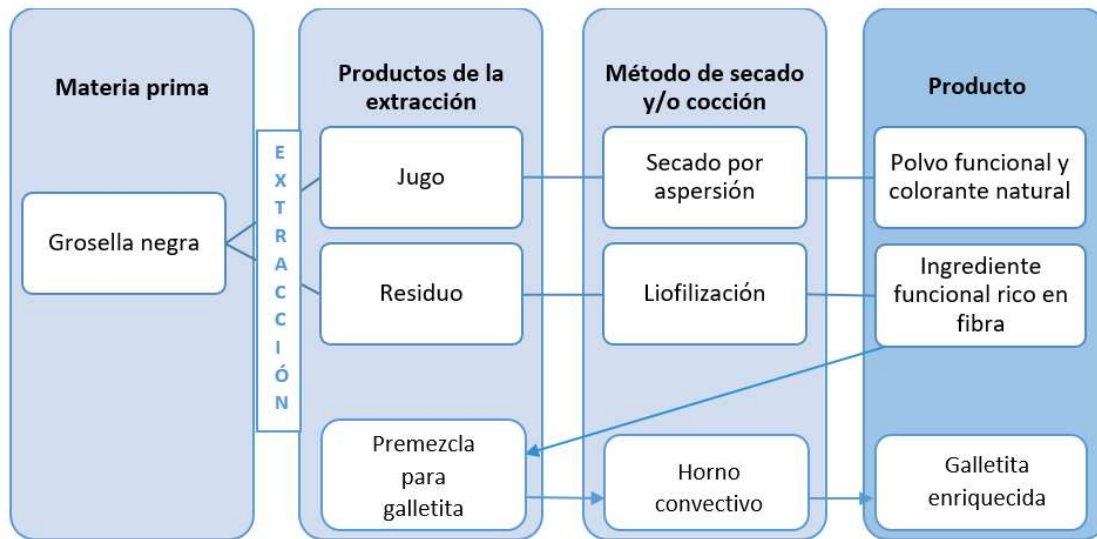
La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) informa periódicamente sobre la importancia de consumir frutas y hortalizas y sobre la prevalencia de malnutrición por deficiencias nutricionales específicas de fibra, minerales y vitaminas. En las Guías Alimentarias para la Población Argentina (GAPA) elaboradas por el Ministerio de Salud de la Nación en el año 2016 se recomienda un consumo de 700 g de frutas y verduras (400 g de hortalizas no feculentas y 300 g de frutas) por día. Aunque en la última Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares (ENGHo) realizada en el año 2012 se detectó que el consumo promedio sólo alcanzaba a cubrir el 32,5% del consumo diario recomendado en nuestro país (Giacobone y col., 2018).

El cultivo de frutas finas se realiza en forma de producciones intensivas, que generan alta rentabilidad en pequeñas superficies y que por consiguiente movilizan las economías locales y regionales (Bruzone, 2009). Desde el año 2003 a la actualidad se ha observado un importante crecimiento tanto en la producción como en las exportaciones de frutas finas en nuestro país. Sin embargo, el sector de las grosellas en particular se ha visto relegado en relación al crecimiento de otras frutas finas (como el arándano y la frutilla) debido al bajo volumen de producción y la falta de tecnología y logística de transporte necesarios para la comercialización de estas frutas tan percederas. Por este motivo, la exportación de estas frutas se ha visto limitada y la mayor parte de la producción se destina a la industria local, comercializándose en forma congelada tanto por congelado rápido individual (IQF) como en bloque para la producción de conservas para la producción de confituras, salsas, jugos concentrados y licores (Agrositio, 2017; Bruzone, 2009; Programa de agronegocios y alimentos, 2010).

Por otro lado, reducir las pérdidas y desperdicios de alimentos a lo largo de toda la cadena de producción, distribución, comercialización y consumo se ha vuelto una de las iniciativas clave de organismos como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Por todo lo anteriormente expuesto, este trabajo se enfocó en encontrar alternativas para el uso de la grosella negra con el fin de aumentar sus posibilidades de consumo y proponer un mejor aprovechamiento del fruto, buscando agregarle valor a su producción y reducir los desperdicios en su cadena alimentaria. Con este fin se partió de la fruta como

fuelle de fibra, compuestos antioxidantes y pigmentos, se realizó una extracción del jugo y también se obtuvo un residuo. Ambos se secaron usando diferentes métodos para obtener productos de mayor vida útil: un polvo con propiedades funcionales y colorantes, y un ingrediente rico en fibra y compuestos antioxidantes. Éste último ingrediente se incorporó a la formulación de galletitas libres de gluten, logrando enriquecerlas en fibra y compuestos bioactivos. En la **Figura 1.1** se muestra un esquema general de este trabajo de tesis.



**Figura 1.1.** Esquema general del trabajo realizado en esta tesis.

## 1.1. Grosella negra (*Ribes nigrum* L.)

### 1.1.1. Generalidades

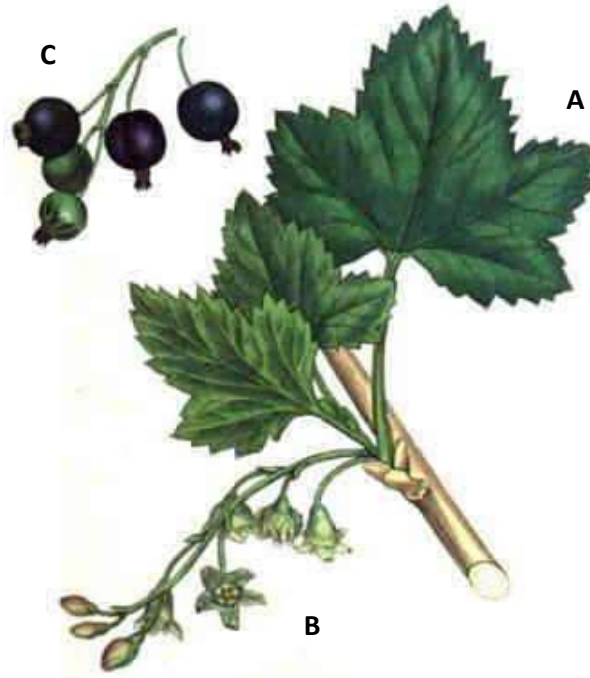
La grosella negra (*Ribes nigrum* L.), también conocida como casis, es una fruta del grupo de las *berries*. Estas frutas se caracterizan por su tamaño pequeño, sabor ácido y gran perecibilidad. Dentro del grupo de las *berries* se agrupan otras grosellas, frambuesas, frutillas, arándanos y moras, que, junto con las *cherries* (cerezas y guindas), constituyen las llamadas frutas finas, denominadas así a modo de clasificación comercial (Bruzone, 2009).

En la **Tabla 1.1** se muestra la clasificación botánica de la grosella negra.

**Tabla 1.1.** Clasificación botánica de la grosella negra (Vagiri, 2012).

<b>Reino</b>	Plantae	<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida	<b>Orden</b>	Saxifragales
<b>Familia</b>	Grossulariaceae	<b>Género</b>	Ribes
<b>Sub-género</b>	Coreosma	<b>Especie</b>	<i>Ribes nigrum</i> L.

La especie es originaria del centro y este de Europa y del norte de Asia (Gopalan y col., 2012). La planta es un arbusto perenne y longevo que crece entre 1,2 - 2,0 metros de altura. Tiene una raíz fibrosa en forma de plato, poco profunda. Sus hojas son color verde oscuro, aromáticas, alargadas y están formadas por cinco lóbulos, puntas agudas y bordes dentados (**Figura 1.2 A**). Presenta unas flores pequeñas, agrupadas como las que se muestran en la **Figura 1.2 B** y sus frutos crecen en racimos como puede observarse en la **Figura 1.2 C** (Caminti, 2013).



**Figura 1.2.** Esquema de las hojas (A), flores (B) y frutos (C) de la planta de grosella negra.

Los frutos de grosella negra tienen una cáscara bien oscura y brillante y están coronados por un remanente de cáliz. Su diámetro promedio aproximado es de 12 mm (**Figura 1.3**). Su pulpa es también de color oscuro y muy carnosa y en ella se encuentran una gran cantidad de semillas pequeñas (**Figura 1.3**) (Gopalan y col., 2012; Vagiri, 2012).



**Figura 1.3.** Imágenes de frutos de grosella negra.



La planta crece en suelos parcialmente arcillosos con un pH entre 5,5 y 6,5, una profundidad promedio de 1 metro y con buen drenaje que garantice una buena hidratación permanente. Además, requiere un alto aporte de materia orgánica y no tolera suelos salinos y/o alcalinos (Caminti, 2013). El grosellero es muy resistente a las bajas temperaturas, pero muy sensible a temperaturas superiores a 30 °C, las cuales producen daños a nivel de las hojas y los frutos. Generalmente requieren entre 120 - 140 días libres de heladas para cumplir su ciclo vegetativo, y entre 70 - 90 días para la maduración de sus frutos. Una vez cosechados, su vida útil en fresco es de aproximadamente 3 días.

### 1.1.2. Composición química y propiedades funcionales

La grosella negra es un fruto muy ácido, cuyo pH oscila entre 2,5 y 3,0 y cuya acidez varía entre 3,0 - 3,15 mg ácido cítrico/100 g fruta (Rubinskiene y col., 2005). Esta fruta posee un contenido de agua de alrededor de 75% que varía según el estado de desarrollo y la variedad de la fruta. De los sólidos solubles totales, la mayoría son azúcares. Además, presenta una cantidad importante de micronutrientes como vitamina C y potasio (Bruzzone, 2009; Nile y Park, 2014). En la **Tabla 1.2** se muestra la composición nutricional de la grosella negra fresca de acuerdo a varias fuentes bibliográficas.

**Tabla 1.2.** Composición nutricional de la grosella negra  
(Bruzzone, 2009; Vagiri, 2013; Nile y Park, 2014).

Componente	Cantidad
Agua	75 g/100 g
Proteínas	1,40 g/100 g
Carbohidratos	14 g/100 g
Lípidos	0,20 - 0,40 g/100 g
Fibra Total	4,0 g/100 g
Sodio	1,7 - 2,5 mg/100 g
Potasio	300 - 320 mg/100 g
Calcio	35-45 mg/100 g
Hierro	1,3 - 2,5 mg/100 g
Vitamina C	40 - 181 mg/100 g

La grosella negra es escasamente consumida como fruta fresca debido a su elevada acidez y astringencia. Sin embargo, es muy apreciada por su muy alto contenido de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud, por el cual ha ganado la etiqueta de “superfruta” (Allwood y col., 2019). Es conocido que las frutas del género *Ribes* presentan altísimos niveles de actividad antioxidante asociada a su elevado contenido de compuestos con esta capacidad. Esta propiedad ha suscitado un gran interés por parte de la comunidad científica hacia este grupo de frutos (Vagiri, 2012; Gopalan y col., 2012). Diversos ensayos *in vitro*, *in vivo* y clínicos han demostrado los efectos beneficiosos que el consumo de grosella negra, su jugo o el extracto de sus distintas partes presentan para la salud. Entre estos se encuentran propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas sobre los sistemas cardiovascular, nervioso, pulmonar, renal, ocular y esquelético, e incluso efectos anticancerígenos (Gopalan y col., 2012).

Los compuestos bioactivos se pueden definir como compuestos esenciales (como vitaminas) y no esenciales (como compuestos fenólicos) que existen en la naturaleza y que han demostrado tener un efecto en la salud humana (Rodríguez-Amaya, 2016). Aquellos alimentos que contienen este tipo de componentes se consideran *funcionales*, respondiendo a la definición de *alimento funcional* como todo aquel alimento o ingrediente que aporte beneficios para la salud más allá de los que aportan sus nutrientes tradicionales.

Numerosos compuestos bioactivos, también llamados fitoquímicos, se han ido encontrando en alimentos vegetales a lo largo de los años. Entre ellos se pueden mencionar los carotenoides, tocotrienoles, compuestos fenólicos y carbohidratos no digeribles. Actualmente se considera que el efecto protector contra enfermedades de este tipo de compuestos no se debe a un único componente o familia de componentes, sino que es el resultado del efecto combinado de los diversos componentes presentes en el alimento (Rodríguez-Amaya, 2016).

La grosella negra, como la mayoría de las *berries*, se caracteriza por tener una gran diversidad de constituyentes bioactivos tales como ácidos orgánicos, taninos, antocianinas y flavonoides, así como también minerales, vitaminas y fibra (Jiménez-García y col., 2013; Gopalan y col., 2012).

### 1.1.2.a. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes mayormente en alimentos de origen vegetal. En la planta cumplen una función importante en los mecanismos de defensa y adaptación de la misma frente a ciertas condiciones de estrés como sequías, temperaturas extremas, radiación UV, patógenos y plagas (Szajdek y Borowska, 2008). Su estructura puede variar desde anillos aromáticos hidroxilados simples hasta moléculas poliméricas más complejas (Harborne y Williams, 1995).

La **Figura 1.4** muestra la clasificación de los compuestos fenólicos presentes en las grosellas negras. El alto contenido de moléculas como las antocianinas, ácidos fenólicos, taninos, lignanos y estilbenos contribuyen a su color, astringencia y amargor (Vagiri, 2012).



**Figura 1.4.** Compuestos fenólicos presentes en las grosellas negra.

El contenido de compuestos fenólicos en las *berries* depende de diversos factores como la especie, el cultivar, el manejo agronómico, el clima, la etapa de maduración, las condiciones de almacenamiento y el manejo post-cosecha (Castrejón y col., 2008; Nile y Park, 2014). La grosella negra se caracteriza por tener elevados niveles de estos

compuestos que van desde 500 a 1350 mg/100g de fruta fresca (Anttonen y Karjalainen, 2006). Entre estos compuestos se destacan las antocianinas, las cuales le aportan a la fruta, así como a los alimentos en los que se las incorpora, su color característico.

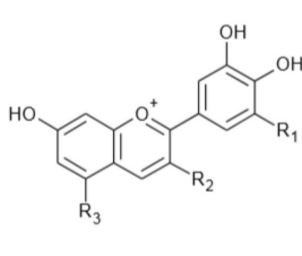
### Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos del grupo de los flavonoides, que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y vegetales aportando su color a *berries*, repollo morado, berenjena y diferentes flores, entre otros. El contenido de antocianinas en la grosella negra varía entre 116 y 288 mg/100 g de fruta fresca, aunque esta cantidad depende del cultivar, el momento de maduración, condiciones climáticas, entre otras variables (Nour y col., 2011; Gopalan y col., 2012).

### **Estructura**

Las antocianinas se encuentran en la naturaleza en forma de glicósido, unidos covalentemente a azúcares. La estructura de la antocianina sin el carbohidrato se denomina antocianidina (Fennema, 2000). En la **Tabla 1.3** se muestran las principales antocianinas encontradas en la grosella negra de acuerdo a Vagiri (2012).

**Tabla 1.3.** Principales antocianinas encontradas en la grosella negra (Vagiri, 2012).



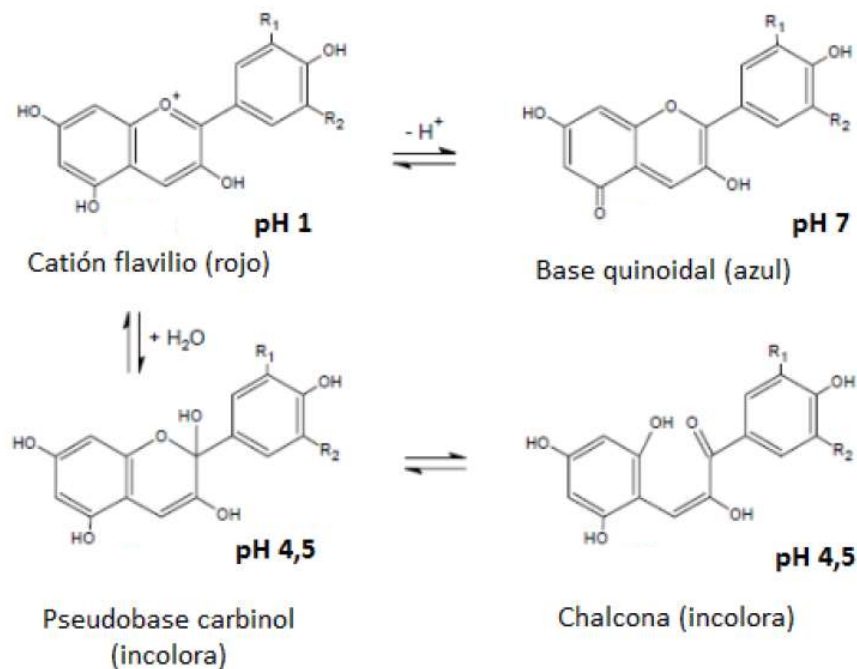
Antocianinas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
cianidina-3-O-β-glucósido	H	O-glucosa	OH
cianidina-3-O-β-rutinósido	H	O-rutinosa	OH
delfinidina-3-O-β-glucósido	OH	O-glucosa	OH
delfinidina-3-O-β-rutinósido	OH	O-rutinosa	OH

### **Estabilidad**

La estabilidad de las antocianinas depende principalmente del pH del medio, de su estructura, del entorno y de la matriz alimentaria en la que se encuentren. Estos compuestos son relativamente inestables, pero en condiciones ácidas su estabilidad es mayor (Fennema, 2000).

Al extraerlas del tejido vegetal, así como durante el procesado y almacenamiento del alimento, las antocianinas pueden degradarse si no se conocen y controlan los factores involucrados en estos procesos. Entre los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas se encuentran: el pH, la temperatura, la luz, la concentración de oxígeno y la concentración de azúcares (Fennema, 2000; Skrede y col., 2000).

*pH*: las antocianinas pueden existir en cuatro formas estructurales distintas según el pH. A valores de pH altos (mayores que 7) se encuentran en la forma de base quinoidal, de color azul; a valores de pH bajos (alrededor de 1) se encuentran en la forma de catión flavilio de color rojo; y a valores de pH alrededor de 4,5 pueden encontrarse como pseudobase carbinol o chalcona, ambas formas incoloras. En la **Figura 1.5** se muestra el equilibrio entre las diferentes estructuras de las antocianinas.



**Figura 1.5.** Equilibrio entre las diferentes estructuras de las antocianinas en función del pH (Fennema, 2000).

En general a valores de pH menores a 2 todas las antocianinas se encuentran en forma de catión flavilio de color rojo intenso. Al subir el pH, la molécula se desprotona y se adiciona una molécula de agua, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol y la forma chalcona, las cuales son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 predomina la base quinoidal de color azul que se degrada rápidamente por oxidación con el aire.

*Temperatura:* las altas temperaturas pueden desplazar el equilibrio hacia la forma de chalcona, con la consiguiente pérdida de color. Como consecuencia de la exposición a altas temperaturas también puede ocurrir la formación de compuestos poliméricos de color pardo (Sari y col., 2012).

*Luz:* la exposición a la luz puede provocar la pérdida de color de las antocianinas (Contreras-Lopez y col., 2014) y magnificar el efecto de la temperatura (Jenshi roobha y col., 2011).

*Concentración de oxígeno:* debido a su estructura insaturada, las antocianinas son susceptibles a la oxidación por oxígeno molecular. Por lo tanto, es posible minimizar el deterioro de las antocianinas disminuyendo o eliminando el oxígeno en contacto con las mismas (Mazza y Miniati, 1993).

*Concentración de azúcares:* altas concentraciones de azúcares contribuyen a la estabilidad de las antocianinas debido a la disminución de la actividad de agua. En cambio, en bajas concentraciones, los azúcares o sus productos de degradación pueden acelerar las reacciones de deterioro (Fennema, 2000).

Existen otros factores que pueden inestabilizar a las antocianinas como la presencia de enzimas y ácido ascórbico, los cuales pueden estar presentes como compuestos nativos del vegetal o ser adicionados extrínsecamente al alimento.

### ***Copigmentación***

El fenómeno de copigmentación consiste en la asociación de moléculas de antocianinas entre sí o con otras moléculas denominadas copigmentos. Estas asociaciones se dan por interacciones débiles del tipo hidrofóbico, van der Waals o iónicas del estado

ion favilio o base quinoidal de las antocianinas, y tiene como consecuencia un aumento de la estabilidad de la mismas (Kammerer, 2016). Distintos compuestos pueden actuar como copigmentos: ácidos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, nucleótidos, polisacáridos, metales, entre otros (Kammerer, 2016). Como resultado de la copigmentación se observa un aumento de la absorción de luz, es decir, una intensificación del color, lo cual se conoce con el nombre de efecto hipercrómico, y un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia, denominado efecto batocrómico (Morata y col., 2019). Algunos autores postulan que la copigmentación es un paso previo a la formación de uniones más estables de las antocianinas con estos compuestos (Franceschinis, 2016).

### 1.1.2.b. Fibra dietaria

La fibra dietaria se define como oligosacáridos, polisacáridos, sus derivados hidrofílicos y lignina que no son digeridos por las enzimas del sistema digestivo humano para ser absorbidas en el tracto gastrointestinal superior (Rodríguez-Amaya, 2016).

La fibra presenta muchas funciones fisiológicas ampliamente reconocidas, tales como la modulación de la absorción de glucosa, la disminución de los niveles de colesterol, el mejoramiento de la biodisponibilidad de calcio, el mantenimiento de la salud gastrointestinal y del sistema inmune (Tunland y Meyer, 2002). El consumo de buenas cantidades de fibra está asociado a la reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares como hipertensión y riesgos de infartos, diabetes, obesidad y ciertas enfermedades gastrointestinales (Anderson y col., 2009; Slavin y Lloyd, 2012). Además, ayuda a mantener un balance en la flora intestinal, colaborando en la protección contra toxinas y bacterias patógenas y aumentando la absorción de nutrientes (Rodríguez-Amaya, 2016).

La creciente importancia de la fibra en la alimentación ha impulsado el crecimiento de un mercado con gran potencial para productos e ingredientes ricos en fibra, así como la investigación sobre nuevas fuentes de este nutriente. En este sentido los residuos de cereales, frutas y vegetales están ganando cada vez más atención como fuentes novedosas y económicas de fibra dietaria e ingredientes funcionales (Redondo-Cuenca y col., 2016).

Asimismo, ciertas propiedades fisicoquímicas de la fibra, como su capacidad de retención de agua, de formación de geles y viscosidad, además de proveer funciones fisiológicas en el organismo, contribuyen a mejorar las propiedades texturales y reológicas de los alimentos (Mudgil y Barak, 2013).

La clasificación tradicional de la fibra dietaria se ha hecho en función de su solubilidad en agua dado que esta capacidad determina muchas de sus propiedades fisicoquímicas y efectos fisiológicos, así como también sus capacidades tecnológicas. En este sentido, los componentes de la fibra dietaria que presentan una gran capacidad de retención de agua pertenecen a la llamada fibra soluble (FDS), mientras que aquellos que tienen una menor capacidad de retención de agua se clasifican como fibra insoluble (FDI). Los alimentos sólidos pueden tener ambos tipos de fibra, pero la proporción de cada una de ellas es variable. En términos generales, la fibra soluble se caracteriza por su capacidad para aumentar la viscosidad, su susceptibilidad a ser fermentada por la microbiota colónica y su capacidad para reducir la respuesta glicémica y el colesterol. En cambio, la fibra insoluble presenta mayor porosidad, menor densidad y tiene la habilidad de aumentar el volumen fecal y mejorar el tránsito intestinal (Redondo-Cuenca y col., 2016).

### Fibra dietaria en grosella negra, *berries* y otras frutas

El contenido de fibra dietaria en las distintas frutas es muy variado. Puede ir desde 0,4 g /100g de fruta en el melón hasta 13 g /100g de fruta fresca en la guayaba (Li et al., 2002). Sin embargo, en casi todas ellas, la fracción insoluble suele representar un porcentaje mucho mayor que la fracción soluble. Entre las *berries*, por ejemplo, las frutillas tienen un contenido de fibra dietaria total de 2,0 g/100 g de fruta fresca, los arándanos de 2,9g/100 g de fruta fresca y en la frambuesa el contenido de fibra dietaria total es de 4,2 g/100 g fruta fresca. En las tres frutas mencionadas, la FDI representa más del 80% de la fibra dietaria total (Marlett y Cheung, 1997).

En particular, las grosellas tienen un contenido total de fibra alimentaria de alrededor de 4 g/100g (Bruzzone, 2009), siendo también la fracción insoluble la que se encuentra en mayor proporción. Un jugo de grosella negra puede aportar 0,6 g de fibra dietaria total cada 100 g, de la cual 0,2 g corresponden a fibra soluble y 0,4 g a fibra insoluble (Slavin y Lloyd, 2012).



### 1.1.3. Producción de grosella negra

#### 1.1.3.a. Producción mundial

La grosella negra es originaria del este y norte de Europa y América del Norte. En los países de estas regiones se la cultiva y consume en fresco, aunque su principal destino es la industria alimentaria para la elaboración de dulces y jugos, entre otros productos (Caminti, 2013).

De acuerdo a la Asociación Internacional de la Grosella Negra (International Blackcurrant Assosiation – IBA) la producción mundial anual de grosella negra en el 2018 fue de 52.156 hectáreas cultivadas y 210.005 toneladas. La producción de esta fruta se concentra principalmente en los países de Europa (91%), mientras que el resto se distribuye en países como China, Australia y Nueva Zelanda. Según los últimos datos de la IBA, Polonia es el principal productor (aproximadamente 28.000 hectáreas y 90.000 toneladas por año) seguido por Ucrania, Lituania y el Reino Unido. Otro productor importante es Rusia, aunque no se conocen los volúmenes de su producción.

#### 1.1.3.b. Producción nacional

Aunque en Argentina el desarrollo de las *berries* es reciente, el sector ha registrado una expansión moderada en los últimos diez años, mostrando un mejor posicionamiento en el mercado y un aumento en la producción y la superficie cultivada. El cultivo de estas frutas se caracteriza por producciones intensivas en cuanto a mano de obra y capital, que no requieren grandes extensiones de tierra, y como consecuencia movilizan las economías regionales (Bruzzone, 2009).

Dentro de esta producción, el sector de las grosellas negras es minoritario: en el año 2011 se estimó una producción anual de 36 hectáreas y 180 toneladas. La producción se encuentra casi exclusivamente en zona de la Patagonia, comprendiendo las zonas de la Comarca Andina del Paralelo 42°, el Valle Inferior del Río Chubut, el Alto Valle del Río Negro y Neuquén, y Santa Cruz (**Figura 1.6**). Su principal destino es la fruta congelada (95% de la producción) para lo cual se utiliza el método de congelado rápido individual (Individual Quick Freezing, IQF) para abastecer la industria alimentaria de dulces, jugos,

conservas, helados y cócteles de frutas para lácteos. Su comercialización en fresco es muy escasa y se da solo en la región andino-patagónica (Caminti, 2013; Bruzone, 2009). La ventana de producción en el país va desde diciembre a abril.



**Figura 1.6.** Regiones productoras de grosella en Argentina (indicadas en color verde).  
(Bruzone, 2009).

Existen numerosas variedades de grosella negra, pero en Argentina las variedades más cultivadas según la Agencia de Extensión Rural El Bolsón - INTA son la Noir de Bourgogne, Gian de Boskoop, Burga, Royal de Naples, Troll, Silvergieters Schwarze y Titania. Las distintas variedades difieren en origen, rendimiento, tamaño de fruto y tipo de polinización.

## 1.2. Procesos de extracción

La extracción de compuestos de diferentes tejidos biológicos tiene una larga historia en la producción de azúcar, jugos, vinos, pigmentos, hierbas, perfumes, aceites y más. Las técnicas tradicionales de extracción se basan en mecanismos de difusión, prensado en frío, extracción soxhlet, maceración y destilación. Sin embargo, estos métodos convencionales suelen presentar baja selectividad y consumir grandes cantidades de

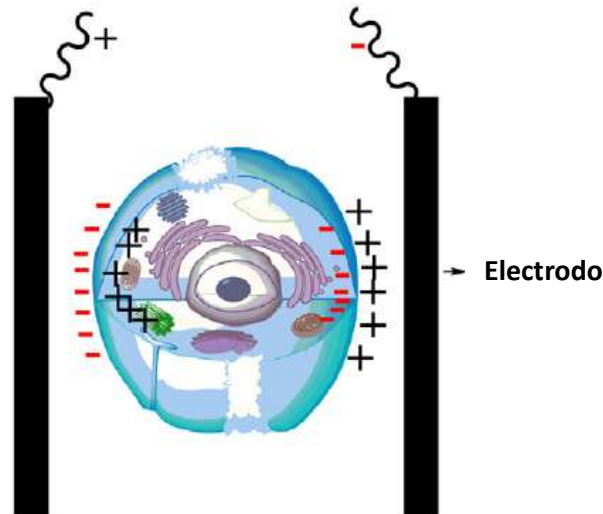
solvente, tiempo y/o energía (Vorobiev y Lebovka, 2017). En muchos casos la calidad del producto extraído se ve alterada como consecuencia de los pretratamientos aplicados para mejorar el rendimiento como molienda, maceración o calentamiento, e incluso, en muchos casos conlleva a una pérdida de nutrientes y compuestos de alto valor biológico (Vorobiev y Lebovka, 2010).

En los últimos años se han ido desarrollando métodos de extracción no convencionales como la extracción asistida por enzimas, con fluidos supercríticos, altas presiones, ultrasonido, microondas y campos eléctricos pulsados (Azmir y col., 2013).

### **1.2.1. Tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF)**

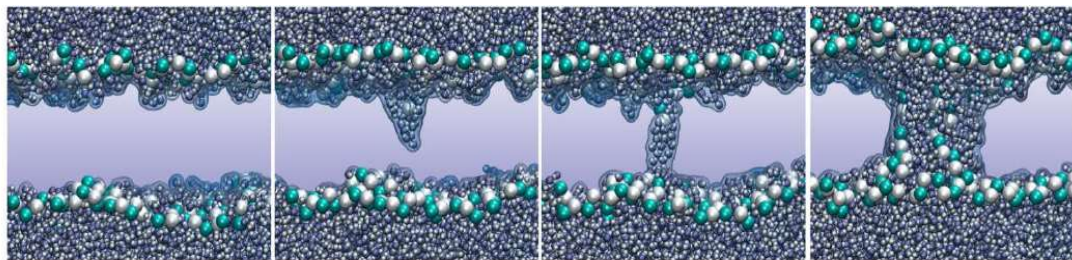
La tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF), consiste en la aplicación de pulsos eléctricos de muy corta duración (milisegundos o microsegundos) y muy alto campo eléctrico sobre un material biológico ubicado entre electrodos, lo que induce a un fenómeno llamado electroporación. Un sistema típico de electroporación consiste de un generador de alto voltaje, un generador de pulsos, un conjunto de electrodos y un sistema de monitoreo y control (Soliva-Fortuny, 2009).

El mecanismo de acción del proceso de electroporación aún no está completamente dilucidado. Existen diferentes modelos que intentan explicar el fenómeno a nivel celular. La teoría más aceptada consiste en considerar la membrana celular como un capacitor con una constante dieléctrica muy baja. A cada lado de la membrana (caras interna y externa) existen cargas de polaridad opuesta, lo cual crea naturalmente un potencial transmembrana. Al exponer la célula a un campo eléctrico ocurre una acumulación de cargas en el interior y exterior de la célula, aumentando el potencial transmembrana (**Figura 1.7**). Esto incrementa la presión de compresión sobre la membrana debido a la atracción de cargas opuestas a cada lado de la misma, provocando la disminución en su espesor, lo cual a su vez induce un incremento de la atracción electrostática (Poojary y col., 2020).



**Figura 1.7.** Representación esquemática de potencial transmembrana inducido por PEF.  
(Poojary y col., 2020).

Si esta electrocompresión supera la resistencia de la membrana, se genera una ruptura local de la misma con la consiguiente formación de un pasaje acuoso o poro. La **Figura 1.8** muestra un modelo del fenómeno de la formación de poros acuosos por simulación dinámica molecular (Tarek, 2018).

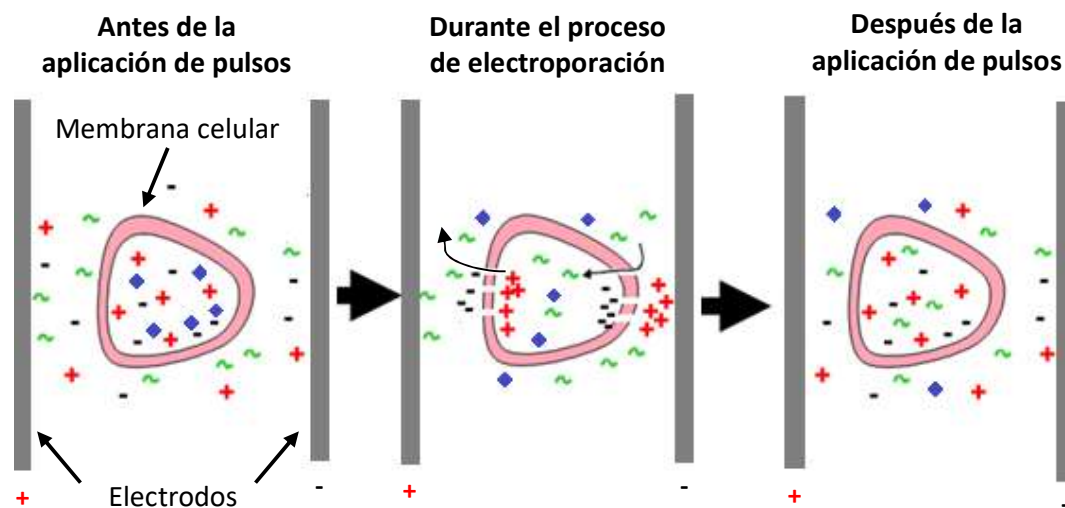


**Figura 1.8.** Representación de la evolución de formación de un poro por simulación dinámica molecular (Tarek, 2018).

La formación de estos poros transitorios es un proceso dinámico que ocurre en nanosegundos (Soliva-Fortuny, 2009) y puede ser un proceso reversible o irreversible dependiendo de la duración de la exposición de la célula al campo eléctrico, la intensidad local del campo y la capacidad de recuperación de la membrana. Si la intensidad del campo y el tiempo de exposición son insuficientes, no ocurrirá electroporación y la

permeabilidad celular no se verá afectada. Si la intensidad del campo y el tiempo de exposición alcanzan un valor crítico puede ocurrir electroporación reversible: la membrana aumenta su permeabilidad y se mantiene en este estado por un período variable de tiempo, pero luego es capaz de sellarse espontáneamente y volver a su estado original. Para que este proceso de recuperación pueda tener lugar, la célula debe encontrarse en un medio favorable para su funcionamiento y supervivencia. Si la intensidad del campo es muy alta, la cantidad de energía entregada es muy elevada y ocurre la electroporación irreversible. La célula pierde su capacidad de homeostasis, la membrana celular se desintegra y la célula pierde viabilidad (Mahnič-Kalamiza y col., 2014).

La **Figura 1.9** es una representación esquemática de lo que ocurriría a nivel celular en un tratamiento de electroporación reversible. Como puede observarse en la ilustración, durante el proceso de electroporación, cuando la permeabilidad de la membrana celular se encuentra incrementada, el transporte de sustancias desde el interior celular hacia el medio y viceversa puede verse aumentado como consecuencia del incremento de la difusión.



**Figura 1.9.** Representación esquemática de lo que ocurre a nivel celular en un tratamiento de electroporación reversible.

La electroporación presenta aplicaciones tanto en el campo de la medicina como la biotecnología y los alimentos. La electroporación reversible se usa para introducir drogas

citotóxicas a células tumorales en tratamientos de electroquimioterapia, para administración de drogas, transferencia de genes, entre otras. Por otro lado, los tratamientos de electroporación irreversible se usan para ablación de tejidos en tratamientos de cáncer. En alimentos, la electroporación reversible ha mostrado potencial para la extracción de jugo y compuestos de interés de tejidos vegetales y microorganismos, en procesos de deshidratación y criopreservación y para modificación de la textura; mientras que la electroporación irreversible puede usarse como métodos de preservación y esterilización por inactivación microbiana (Mahnič-Kalamiza y col., 2014).

En un proceso de electroporación reversible, el efecto que el tratamiento de campo eléctrico pulsado genere dependerá de numerosas variables tanto intrínsecas de la muestra como propias del sistema de aplicación de pulsos empleado y de las condiciones de tratamiento seleccionadas. Entre ellas podemos mencionar la conductividad eléctrica del material a electroporar, el tamaño, morfología y orientación de las células en el tejido, la temperatura de tratamiento, la intensidad del campo eléctrico, la amplitud de los pulsos, el número y la duración de los mismos, su frecuencia, la forma de aplicación (pulsos mono o bipolares, pulsos cuadrados o exponenciales), el diseño de los electrodos (electrodos de aguja, placas paralelas), entre otras variables. El campo eléctrico y el tiempo total de tratamiento son los principales parámetros que definen la intensidad del tratamiento (Raso y col., 2016).

#### 1.2.1.a. Extracción asistida por PEF

Para mejorar el rendimiento y la extracción de compuestos de interés presentes en tejidos vegetales, se suelen aplicar diversos pretratamientos tales como molienda, maceración, calentamiento y tratamientos enzimáticos. Aunque estos tratamientos se basan en principios distintos, en todos se persigue acelerar los fenómenos de transferencia de materia, lo cual se puede lograr provocando la desintegración global de los tejidos, o simplemente alterando o debilitando las membranas celulares. En este sentido, el tratamiento de electroporación mediante la tecnología de campos eléctricos pulsados puede entenderse como otra técnica aplicable con este fin (Wiktor y Witrowa-Rajchert, 2017). La electroporación es una alternativa no térmica, más rápida y más eficiente energéticamente que las técnicas tradicionales. Otra ventaja es que esta técnica puede

aplicarse tanto como un tratamiento previo al paso de extracción, como durante el proceso de extracción mismo (Lebovka y col., 2003). El efecto del tratamiento de tejidos vegetales con PEF consiste en la permeabilización temporaria o permanente de las membranas celulares, lo cual facilita la liberación del jugo y la salida de compuestos intracelulares (Pataro y col., 2017 a). La aplicación de PEF puede usarse no sólo para mejorar el rendimiento de obtención de jugo, sino también para aumentar la extracción de nutrientes, compuestos bioactivos y colorantes, permitiendo dirigir el proceso hacia la obtención de un producto con características específicas (Wiktor y Witrowa-Rajchert, 2017).

Las principales ventajas de la extracción asistida por PEF en comparación con métodos de extracción convencionales son (Barba y col., 2015 a):

- Aumento de la transferencia de masa
- Mejoramiento del rendimiento de jugo y compuestos de interés
- Reducción del tiempo de procesamiento
- Posibilidad de aplicación en continuo
- Reducción de la severidad de parámetros como temperatura y concentración de solventes
- Reducción de la degradación de compuestos termolábiles
- Simplificación de etapas de purificación
- Reducción de consumos y costos energéticos
- Reducción del impacto ambiental

Más aún, la combinación de PEF con técnicas convencionales en pasos sucesivos o simultáneos de extracción puede ser una herramienta muy útil para mejorar la eficiencia y la selectividad del proceso (Vorobiev y Lebovka, 2017).

La extracción de jugo y compuestos bioactivos asistida por PEF a partir de alimentos vegetales y sus residuos ha demostrado ser una técnica con gran potencial. Se han aplicado exitosamente tratamientos PEF para mejorar el rendimiento y la calidad de jugos extraídos de manzanas (Carbonell-Capella y col., 2016; Grimi y col., 2011), zanahorias (Jaeger y col., 2012), uvas (Donsi y col., 2010), arándanos (Pataro y Bobinaité, 2017 a), cerezas (Barba y col., 2015 b), entre muchos otros. Sin embargo, al variar el producto, cambia la conductividad del medio, lo que hace necesario el análisis particular de cada caso para estudiar la respuesta frente al tratamiento aplicado.

### **1.3. Procesos de deshidratación**

La deshidratación consiste en la eliminación total o parcial de agua de un material. Esta operación puede aplicarse sobre sólidos, líquidos e incluso gases. La deshidratación de alimentos se ha empleado desde tiempos antiguos en la historia de la humanidad con fines de conservación (Maupoey y col., 2016). Actualmente se sabe que esta operación aumenta la vida útil de los alimentos al disminuir la actividad de agua y así reducir el crecimiento de microorganismos y retardar el avance de ciertas reacciones químicas que pueden ocurrir durante el almacenamiento. Además, la reducción del peso y volumen alcanzados al deshidratar un líquido facilita el manejo, transporte y almacenamiento de los alimentos (Can Karaca y col., 2016).

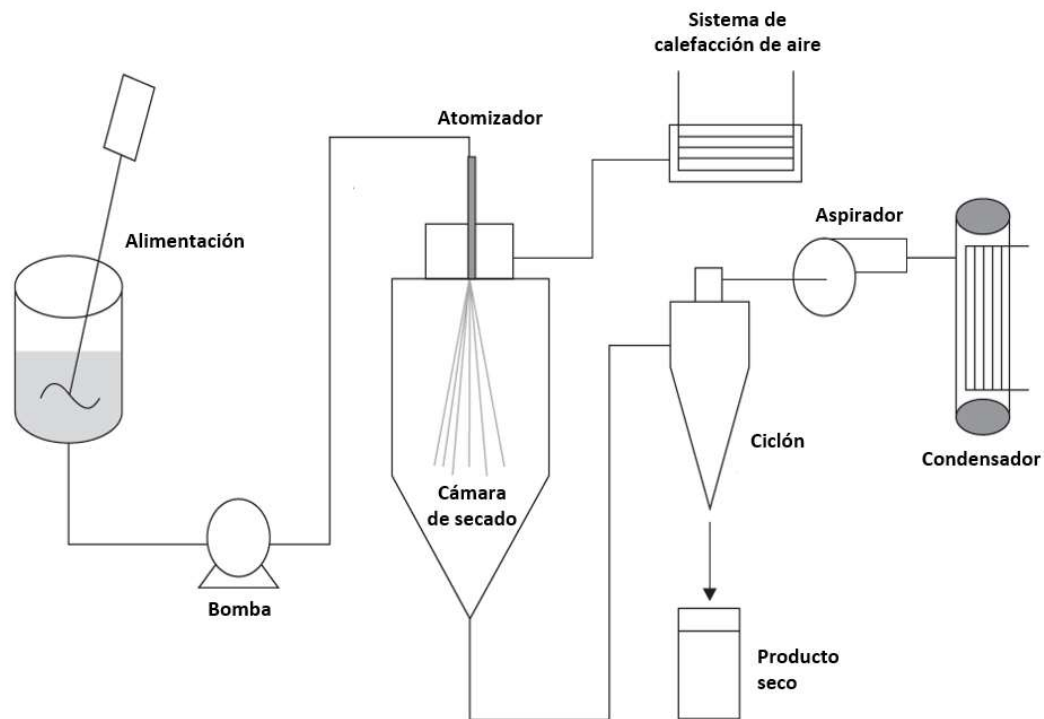
Sin embargo, durante el proceso de deshidratación se pueden producir cambios indeseables en las características de los alimentos lo que conlleva a una pérdida de calidad del producto. En alimentos de origen vegetal la retención de nutrientes, el color y la textura son los principales factores que se pueden afectar durante este proceso y por eso suelen ser los atributos críticos a evaluar cuando se estudia un determinado método de secado (Vega-Gálvez y col., 2012). Entre los métodos de deshidratación más empleados para secar productos líquidos, se pueden mencionar el secado por aspersión (o secado spray) y la liofilización. Para el secado de alimentos sólidos, los métodos más frecuentes por su simpleza y costo son el secado convectivo en monocapa llevado a cabo en cámaras de convección (hornos o estufas, túneles, etc.) y el secado solar (Maupoey y col., 2016). Con menos frecuencia, y solo para alimentos que requieran una mayor preservación de la calidad organoléptica y nutricional, se utilizan procesos más complejos y costosos como la liofilización o el secado por microondas, entre otros.

#### **1.3.1. Secado por aspersión**

El secado por aspersión es una operación unitaria en la cual un líquido, suspensión o emulsión es convertido en un polvo seco. Es uno de los métodos de deshidratación más empleados hoy en día en la industria de los alimentos debido a su rapidez, bajo costo operativo, posibilidad de operación en continuo, alta capacidad de producción, capacidad de operar a diferentes escalas y diversidad de configuraciones de secado (Ho y col., 2016).



Los componentes básicos de un equipo de secado por aspersión incluyen una bomba, un atomizador, una cámara o torre de secado, un sistema de calefacción y dispersión de aire, un ciclón para la recuperación del producto seco y un sistema de control. En la **Figura 1.10** se presenta el esquema de un equipo típico de secado por aspersión. El fluido es bombeado hasta el atomizador, donde es dispersado en pequeñas gotas. Cuando estas gotas entran en contacto con aire caliente en la cámara de secado, su gran superficie de contacto facilita la transferencia de calor desde el aire hacia la partícula y la transferencia de masa en sentido opuesto, resultando en una rápida evaporación del agua. Una vez secas, las partículas caen al fondo de la torre de secado y son transportadas con el aire caliente al ciclón donde se separan del aire y son recolectadas en un recipiente. En la mayoría de los casos el aire que sale del equipo pasa a través de un depurador para minimizar la contaminación del ambiente (Ho y col., 2016).



**Figura 1.10.** Esquema de un equipo de secado por aspersión típico.

El proceso de secado por aspersión involucra cinco pasos fundamentales: preparación del fluido de alimentación, atomización del fluido, contacto de las partículas con el aire

caliente, evaporación del agua y separación del producto seco y el aire húmedo (Tontul y Topuz, 2017). El diseño y las condiciones de operación en cada una de estas etapas son determinantes para lograr una buena eficiencia de secado y adecuadas propiedades en el producto obtenido.

Para mejorar el rendimiento del proceso y mejorar las propiedades del producto final es muy común el agregado de un agente *carrier*. Esto es indispensable cuando se secan jugos de fruta debido a la baja temperatura de transición vítrea por el alto contenido de azúcares y otros productos de bajo peso molecular (Du y col., 2014). La función del *carrier* es aumentar la temperatura de transición vítrea de la mezcla y evitar o reducir los problemas de adherencia del material a las paredes del equipo. Los materiales usados como *carrier* deben, además de presentar una temperatura de transición vítrea elevada, tener una buena solubilidad en la sustancia a deshidratar, una baja viscosidad, ser incoloros e inodoros y de bajo costo. Los materiales más usados con este fin son la maltodextrina y la goma arábica (Etzbach y col., 2020). También se pueden utilizar almidones modificados, inulina o concentrados proteicos (Du y col., 2014). Estos agentes no solo permiten superar los problemas de adherencia, sino que también reducen la higroscopicidad del polvo obtenido y pueden tener un efecto protector los componentes lábiles presentes en el alimento, como fenoles y vitaminas (Du y col., 2014).

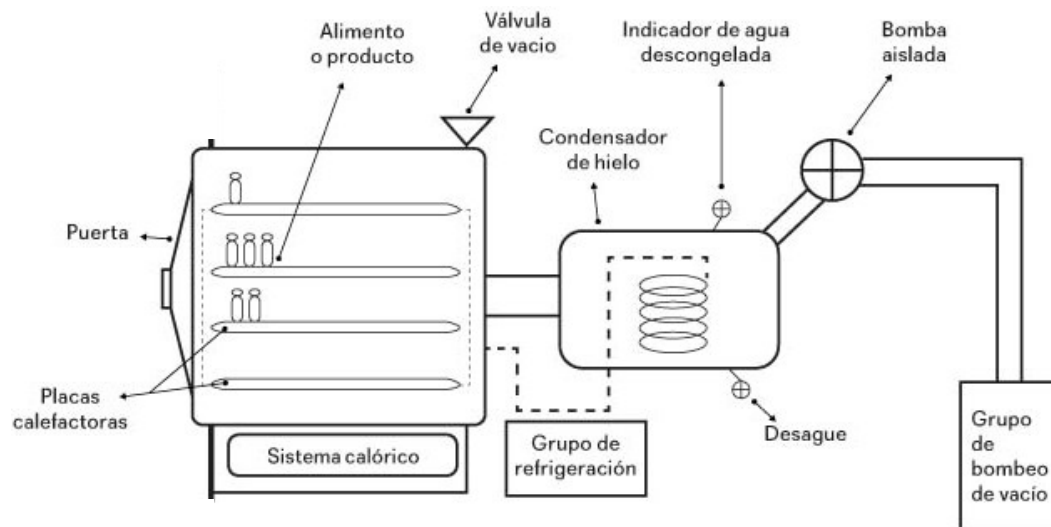
El objetivo de la atomización es convertir el líquido en una lluvia fina para aumentar la superficie de contacto y así mejorar la eficiencia de transferencia de calor y de materia involucradas en la operación. Una vez generado el *spray*, el secado ocurre en tres pasos: cuando la gota entra en contacto con el aire caliente su temperatura aumenta hasta la temperatura de bulbo húmedo; el agua se evapora a temperatura y presión parcial de vapor constantes; y al final del secado, debido a la formación de una costra en la superficie de la gota, la velocidad de secado disminuye y se torna dependiente de la velocidad de difusión del agua. El secado termina cuando la temperatura de la gota y del aire se igualan (Tontul y Topuz, 2017).

El equipo de secado por aspersion se puede clasificar en tres modelos de acuerdo a la dirección del fluido de alimentación y el aire caliente. El modelo más común en alimentos es el de co-corriente, en el cual el fluido de alimentación y el aire caliente transitan en la misma dirección. Esta disposición es muy conveniente para el secado de alimentos termolábiles ya que el alimento está en contacto con el aire a mayor temperatura cuando

aún contiene un elevado contenido de agua, lo cual asegura que la temperatura del mismo no exceda su temperatura de bulbo húmedo. En el modelo contra-corriente la dirección de atomización es opuesta a la del flujo de aire caliente. De esta manera, las gotas entran primero en contacto con el aire más frío y a medida que se secan van encontrándose con aire cada vez a mayor temperatura. El tercer modelo, conocido como modelo mixto, combina el secado en co-corriente y contra-corriente (Tontul y Topuz, 2017).

### 1.3.2. Liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación usado ampliamente en la industria farmacéutica y biotecnológica y que ha tomado cada vez más relevancia en la industria de los alimentos para preservar materiales y componentes muy sensibles al calor. En la **Figura 1.11** se muestra el esquema de un liofilizador.



**Figura 1.11.** Esquema de un liofilizador.

El proceso de liofilización se puede dividir en tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario (Orrego Alzate, 2009). La evolución de la temperatura y la presión durante el proceso se muestran en el diagrama de estado en la **Figura 1.12**.

*Congelación:* Se forman cristales de hielo de agua pura y la suspensión restante se concentra y queda en estado amorfo. Un porcentaje de agua pequeño que no se congela permanece en esta fase. Durante esta etapa el material se solidifica, lo que le confiere a esta técnica la propiedad de conservar la forma original con la que el producto fue congelado.

*Secado primario:* En esta etapa se remueve la mayor cantidad de agua por sublimación (entre 75 y 90%). Para ello se trabaja en alto vacío de manera que el hielo sublima y el vapor de agua generado escapa desde el interior del producto y se condensa en el condensador. La fuerza impulsora que mantiene la sublimación es el gradiente de presión de vapor entre la superficie congelada del producto y el condensador. Debido a la formación de una capa porosa de material seco que opone resistencia al flujo de calor y al vapor a medida que procede el secado, la velocidad de deshidratación va disminuyendo. Como consecuencia, al final de esta etapa se obtiene un material con gran cantidad de poros donde antes existían cristales de hielo.

*Secado secundario:* En esta etapa se elimina por desorción una cierta proporción del agua que no congeló. Esta etapa suele producirse por conducción de calor a través de las placas donde se soporta el material a secar.

En la **Figura 1.13** se muestra un esquema del secado por sublimación y los distintos mecanismos de transferencia de calor y materia.

Como resultado de la liofilización se obtiene un producto rígido, de muy baja humedad y alta porosidad que conserva la forma y el volumen del material original. Al ser un proceso que ocurre a bajas temperaturas, es ideal para deshidratar alimentos muy termolábiles ya que se preservan muy bien sus propiedades nutricionales (vitaminas, compuestos bioactivos) y organolépticas (aromas y pigmentos) (Różyło y col., 2019). Sin embargo, la principal desventaja de este método de secado es su larga duración y el costo energético en comparación con los procesos tradicionales de secado por convección (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Alimentos Argentinos. Ficha N° 3. Disponible en [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_03\\_Liofilizados.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf).)

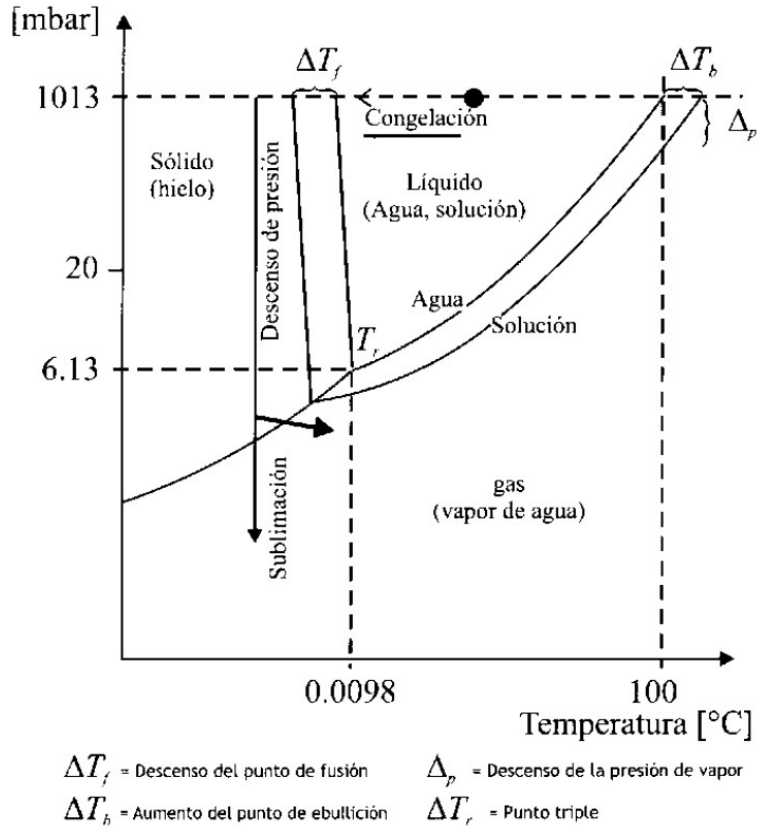


Figura 1.12. Evolución de la presión y la temperatura durante el proceso de liofilización (Orrego Alzate, 2009).

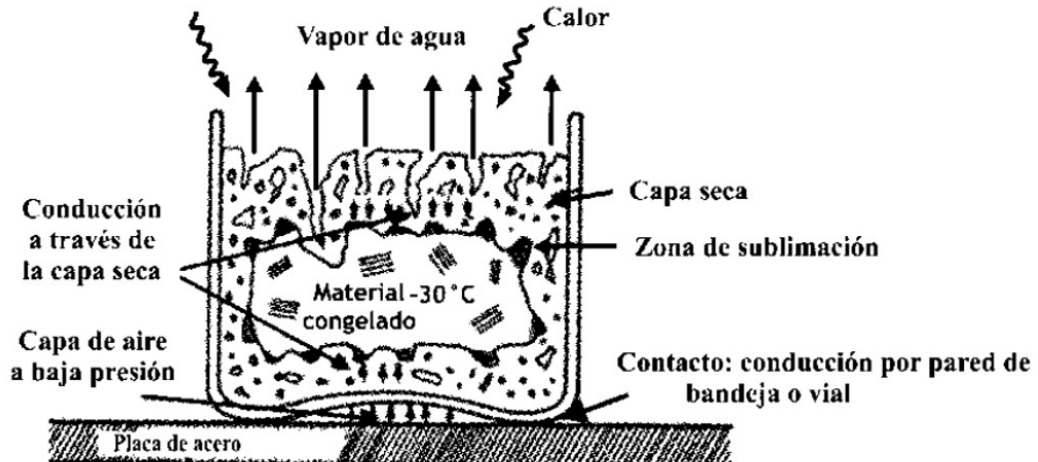
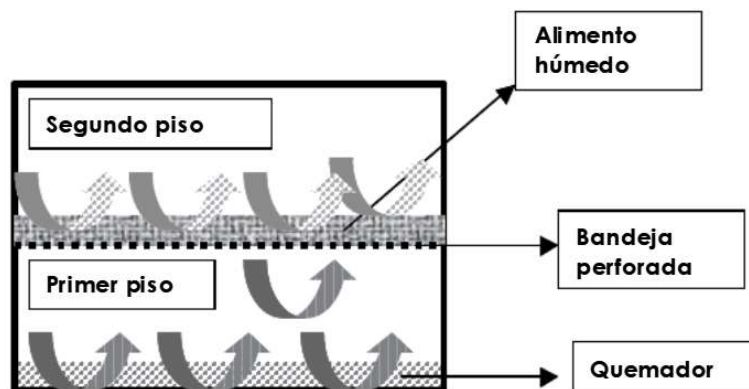


Figura 1.13. Esquema del secado por sublimación con los distintos mecanismos de transferencia de calor y materia (Orrego Alzate, 2009).

### 1.3.3. Secado convectivo

Como se mencionó previamente, el secado convectivo es otro de los métodos de secado más usados para deshidratar alimentos debido a su gran versatilidad y bajo costo de infraestructura. En esta operación el calor para la evaporación del agua es transferido al alimento mediante una corriente de aire caliente que circula y actúa al mismo tiempo como agente transportador del vapor de agua que se elimina del alimento (Fito y col., 2001). El vapor producido se transporta desde la superficie de la capa húmeda en el interior del producto hacia la superficie del mismo y es removida de la misma por el aire circulante.

En general, el secado convectivo es un proceso lento salvo que se usen temperaturas elevadas (Fito y col., 2001). El movimiento del agua durante el secado se produce por varios mecanismos como: fuerzas de capilaridad, difusión debido a gradientes de concentración, difusión superficial, flujo debido a gradientes de presión, etc. (Astigarraga-Urquiza y Astigarraga-Aguirre, 1995). Los mecanismos de transferencia de calor y materia que ocurren durante el secado dependen de diferentes variables tanto del aire de secado como del producto. Los secadores tipo horno o estufa son los más simples y consisten básicamente de una fuente de calor (la cual puede consistir de una fuente de ignición a gas o una fuente eléctrica) que calienta el aire, un sistema de circulación y bandejas o estantes donde se coloca el material a secar. Un esquema de un secador de horno o estufa se muestra en la **Figura 1.14** a modo de ejemplo.



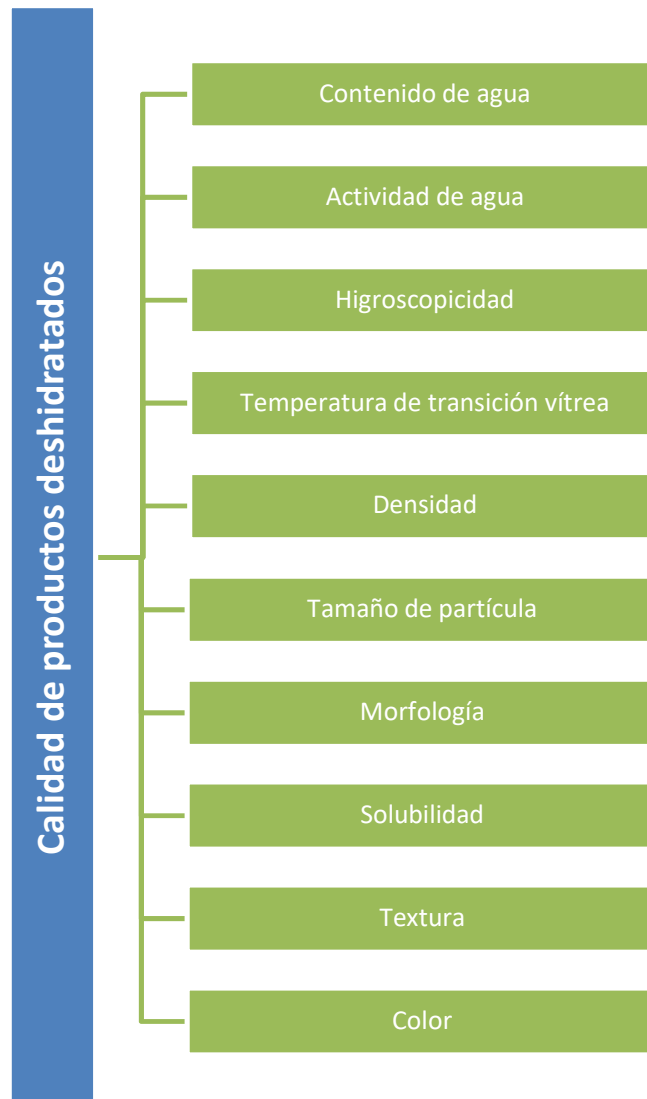
**Figura 1.14.** Esquema de un secador de horno o estufa (Maupoey y col., 2016).

Dado que se trabaja a temperaturas altas se debe tener en cuenta la ocurrencia de reacciones químicas como pardeamiento no enzimático, oxidación de lípidos, fenómenos físicos como contracción o encogimiento, fenómenos estructurales como endurecimiento, cambios de color, aroma y sabor y destrucción de nutrientes (Franceschinis, 2016). Algunos de estos cambios pueden ser deseados en algunos casos, como el pardeamiento o la generación de aromas en productos de panadería, mientras que otros suelen ser indeseados como la pérdida de calidad nutricional.

#### **1.3.4. Propiedades físicas y aspectos de calidad de productos deshidratados**

Los procesos de deshidratación producen cambios en las propiedades de los alimentos que pueden afectar en mayor o menor medida la calidad de los mismos. Según el método de secado y la finalidad que se desea dar al producto deshidratado, distintos parámetros físicos y químicos son significativos para caracterizar y evaluar la calidad del mismo. En la **Figura 1.15** se pueden ver algunas de estas propiedades. Algunas de estas características, como el contenido de agua y la actividad de agua, son importantes para todo tipo de material deshidratado. Estos dos parámetros definen en gran medida la estabilidad física, química y microbiológica del producto durante el almacenamiento y pueden determinar la vida útil del mismo. En general, empleando las condiciones de secado adecuadas, los tres métodos de secado descritos en este trabajo permiten alcanzar valores de actividad de agua y humedad muy bajos que garantizan la estabilidad microbiológica. Por lo tanto, en este trabajo de tesis, el estudio de la calidad de los productos deshidratados se enfocó principalmente en las propiedades físicas y químicas de los mismos.

La higroscopicidad es una medida de la capacidad de adsorción de agua del ambiente. Por los fenómenos involucrados en los procesos de secado por aspersión y liofilización, los materiales deshidratados obtenidos suelen presentar una elevada porosidad, lo cual trae aparejada una alta higroscopicidad (Ho y col., 2017). Por lo tanto, asegurar un almacenamiento adecuado, en envases herméticamente sellados que protejan al alimento de la humedad ambiente es esencial para conservar sus propiedades. Una ganancia de agua proveniente del ambiente puede causar cambios de textura y transiciones de fase que afectarán la estabilidad física y química del alimento.



**Figura 1.15.** Propiedades físicas y de calidad de productos deshidratados.

La temperatura de transición vítrea es un parámetro esencial para evaluar la estabilidad y las condiciones de almacenamiento adecuadas para un producto. Como consecuencia de la congelación o de la rápida eliminación del agua, los productos deshidratados por liofilización o secados por aspersión son materiales en estado amorfo vítreo, es decir que se encuentran en un estado de metaestabilidad (Ho y col., 2017). Por consiguiente, si la temperatura de almacenamiento supera la temperatura de transición vítrea del alimento, este pasará al estado de líquido sobreenfriado o gomoso, a partir del cual sufrirá la pérdida de muchas de sus propiedades físicas y se acelerarán distintas reacciones químicas como consecuencia del aumento de movilidad del sistema. A su vez, la temperatura de



transición vítrea disminuye al aumentar el contenido de agua del material, por lo que si el alimento no es correctamente deshidratado o adsorbe humedad del ambiente por un almacenamiento incorrecto, su temperatura de transición vítrea será menor y el producto será más inestable (Ramakrishnan y col., 2018).

Por otro lado, la densidad, el tamaño de partícula, su morfología y la solubilidad suelen estar muy relacionados, y cobran relevancia en alimentos en polvo. Estos parámetros afectan las características tecnológicas del producto tanto durante etapas de elaboración y distribución como su manipulación por parte del consumidor. En general, partículas con morfologías muy irregulares suelen dar polvos con propiedades de flujo pobres, lo cual puede dificultar su manipulación industrial (Islam Shishir y col., 2016); mientras que partículas muy pequeñas pueden originar polvos con malas propiedades de reconstitución (Ferrari y col., 2013). En cambio, la textura es un parámetro de interés en productos de estructura macroscópica, en los cuales suele ser una característica sensorial fundamental. Esta es una propiedad muy compleja de medir ya que está determinada por la percepción sensorial humana de las características mecánicas, estructurales y superficiales de un material (Lu y Abbott, 2004).

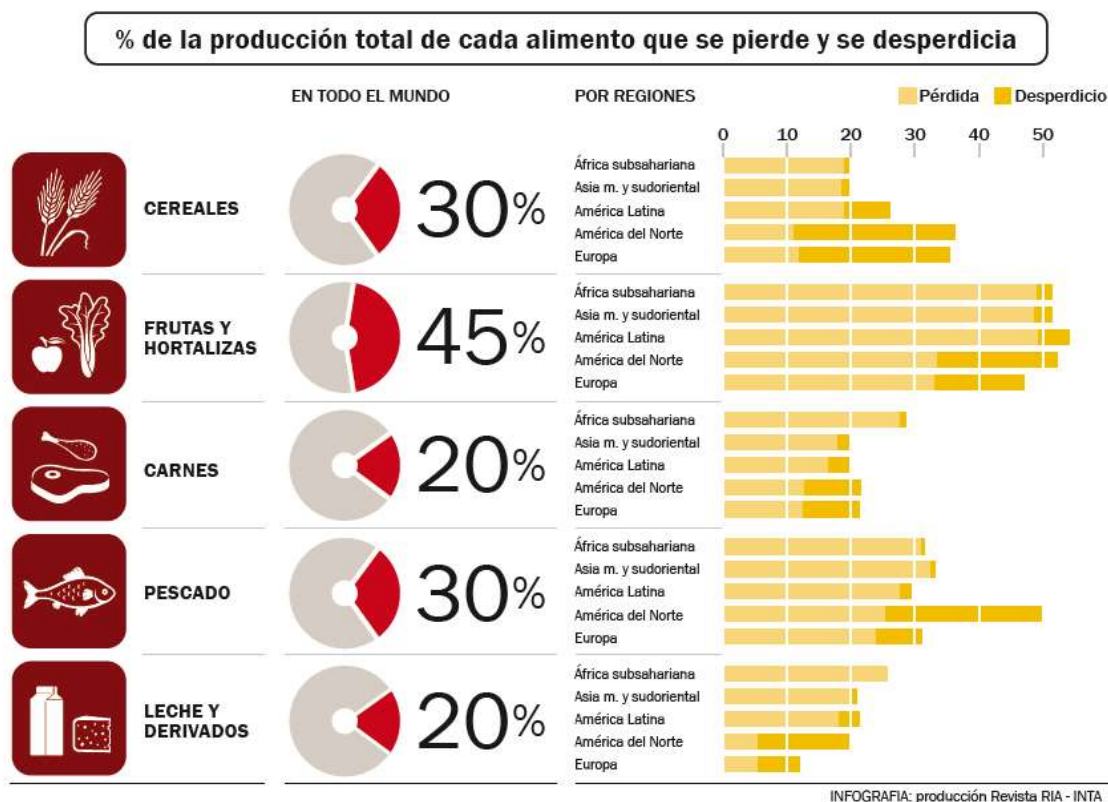
El color es otro parámetro de suma importancia tanto para alimentos en polvo como particulados ya que es uno de los primeros atributos que perciben los consumidores a la hora de elegir un producto. Como se explicó anteriormente, los compuestos fenólicos como los pigmentos antocianicos son compuestos relativamente inestables que pueden sufrir cambios químicos durante la deshidratación y el almacenamiento de un alimento deshidratado. Por lo tanto, analizar su estabilidad en las distintas etapas de trabajo es muy importante. En particular estos pigmentos naturales son lábiles frente a distintas condiciones ambientales, y los cambios en su estructura química pueden traducirse en alteraciones indeseadas en el color del producto (Franceschinis, 2016).

#### **1.4. Pérdidas y desperdicios de alimentos**

“Las pérdidas de alimentos se refieren a la disminución de la masa disponible para el consumo humano a través de los diferentes segmentos de la cadena de suministro. Además de las pérdidas cuantitativas, los productos alimenticios también pueden presentar un deterioro en calidad, lo cual conduce a una pérdida de valor económico y nutricional. El desperdicio de alimentos se refiere a las pérdidas de alimentos derivadas

de la decisión de desechar los alimentos que todavía tienen valor. El desperdicio de alimentos se asocia principalmente con el comportamiento de los vendedores minoristas, el sector de servicios de alimentos y los consumidores, pero el desperdicio y las pérdidas de alimentos ocurren a lo largo de las cadenas de suministro de alimentos” (FAO, 2015).

Aunque no existen evaluaciones precisas sobre el alcance de las pérdidas y los desperdicios de alimentos a nivel mundial, se estima que cada año se pierden y desperdician alrededor de un 30% de cereales; un 40 – 50% de tubérculos, frutas y hortalizas; un 20% de semillas oleaginosas, carne y productos lácteos; y un 30 - 35% de pescado (FAO, 2015). En la **Figura 1.16** se detallan las pérdidas y desperdicios de alimentos por sector y por región.



**Figura 1.16.** Pérdidas y desperdicios de alimentos por sector y por región (FAO, 2013).

Como puede observarse en este esquema, en los países desarrollados o de ingresos altos la mayor parte de los desperdicios ocurren en las etapas de distribución y consumo. En cambio, en países en vías de desarrollo o de bajos ingresos, las pérdidas durante las

primeras etapas de la cadena, debido a deficiencias durante su producción representan el mayor porcentaje.

La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible exige en su meta 12.3 reducir a la mitad el desperdicio per cápita de alimentos a nivel minorista y de consumo para 2030, así como reducir las pérdidas de alimentos a lo largo de las cadenas de producción y suministro. En su informe sobre el “Estado mundial de la agricultura y la alimentación” (FAO, 2013) la FAO asegura que la reducción de las pérdidas y desperdicios de alimentos y nutrientes en los sistemas alimentarios en su totalidad podría contribuir de modo importante a una mejor nutrición de la población y aliviar la presión sobre los recursos productivos.

### **1.4.1. Pérdidas y desperdicios de frutas y hortalizas en Argentina y Latinoamérica**

En Argentina, al igual que en el resto de la región latinoamericana, existen muy pocos datos respecto a las pérdidas y desperdicios de alimentos. Sin embargo, se estima que en nuestro país éstas llegan a valores de alrededor de 220 kg/año/persona. La mayor parte se da en las etapas entre la producción y la venta minorista, siendo menor el impacto de los desperdicios en la última etapa de consumo (FAO, 2013). Según una nota publicada en el sitio Alimentos Argentinos, del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, en Argentina el total de pérdidas y desperdicios alcanza aproximadamente los 14,5 millones de toneladas y los desperdicios, los 1,5 millones de toneladas. Las pérdidas, por lo tanto, explican el 90% del total (Rivas y col., 2015). Según esta fuente, aunque el valor estimado total de pérdidas y desperdicios en nuestro país es de alrededor de 12,5%, bastante inferior al promedio mundial de 30% estimado por la FAO, en sectores como el hortícola o el frutícola alcanza niveles del 29,8%. De estas pérdidas, un 26,8% corresponde a pérdidas en las etapas de producción primaria, poscosecha y almacenamiento, procesamiento y envasado y distribución y un 3% a pérdidas en etapas finales de consumo (Rivas y col., 2015).

En países y regiones en vías de desarrollo, el elevado porcentaje de las pérdidas en la etapa productiva se debe a momentos de cosecha inadecuados, falta de una infraestructura apropiada de transporte y conservación y cuestiones culturales que consideran más

factible el descarte que el desarrollo y la implementación de tecnologías de aprovechamiento de subproductos (FAO, 2013).

En línea con las iniciativas comenzadas por la FAO, en Argentina, en octubre de 2018 se creó el Plan Nacional de Reducción de Pérdidas y Desperdicios de Alimentos, a través de la Ley 27.454; en abril de 2019 se publicó el Decreto 246/2019 en el cual se reglamentó y se determinó a la Secretaría de Gobierno de Agroindustria, a través del área de Alimentos y Bioeconomía, como autoridad de aplicación. Además, se estableció el rol de Agroindustria basándose en tres tópicos: 1) Gobernanza, Normativas y Alianzas, 2) Investigación, Tecnología y Conocimiento y 3) Educación, Información y Comunicación (Nota del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, (2019), disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/se-reglamento-el-plan-nacional-de-reduccion-de-perdidas-y-desperdicios-de-alimentos-y-la>).

Industrias como jugueras, conserveras, bodegas, sidreras, etc. son generadoras de pérdidas y desperdicios, o residuos, que contienen biocompuestos de interés para su aprovechamiento. En particular, los residuos sólidos del prensado (piel y semillas) originados durante el proceso de obtención de jugo de *berries*, constituyen una fuente abundante de fibra dietaria y de fitoquímicos responsables del color y del poder antioxidante como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, etc. (Laroze y col., 2010; Rohm y col., 2015).

## **1.5. El gluten y la enfermedad celíaca**

### **1.5.1. Enfermedad celíaca**

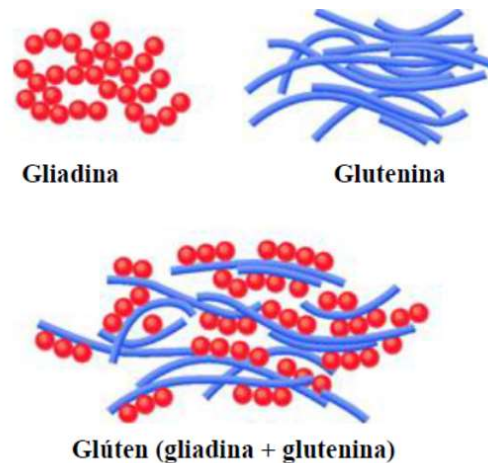
La celiaquía es una enfermedad autoinmune que causa la inflamación del intestino en pacientes que la padecen cuando ingieren gluten. Los síntomas son muy diversos y pueden dividirse en dos grupos: síntomas agudos generalmente a nivel intestinal, y consecuencias a mediano y largo plazo como resultado de la malabsorción de nutrientes y del daño prolongado en el intestino (Feighery, 1999). Los síntomas agudos clásicos suelen manifestarse como diarreas crónicas, vómitos y distensión abdominal. Pero también existen pacientes que presentan síntomas no asociados al sistema gastrointestinal de manera directa e incluso que llevan la enfermedad de manera asintomática. Entre los

síntomas crónicos pueden mencionarse la anemia, osteoporosis temprana, deficiencias vitamínicas, diverticulitis e incluso puede estar asociada a desarrollo de cáncer de colon. El único tratamiento en la actualidad es el seguimiento de una dieta estricta libre de gluten de por vida (Singh y col., 2018), lo cual garantiza el buen estado de salud.

Esta patología se está diagnosticando cada vez más a nivel mundial debido a la globalización de las dietas occidentales ricas en alimentos a base de harina de trigo pero también gracias a un mayor conocimiento de la enfermedad y mejores métodos de análisis y diagnóstico (Gallagher col., 2004). Al presente se estima que afecta a un 1% de la población mundial. En Argentina las estadísticas indican una población de 500.000 personas con enfermedad celíaca. Según el primer Estudio Multicéntrico Poblacional de Prevalencia de la Enfermedad Celíaca en Pediatría realizado entre 2008 y 2009 se determinó que padecen esta enfermedad 1 de cada 79 niños de entre 3 y 16 años, mientras que aparece en 1 de cada 167 personas adultas (Nota del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, disponible en <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=30>).

### 1.5.2. El gluten en los alimentos

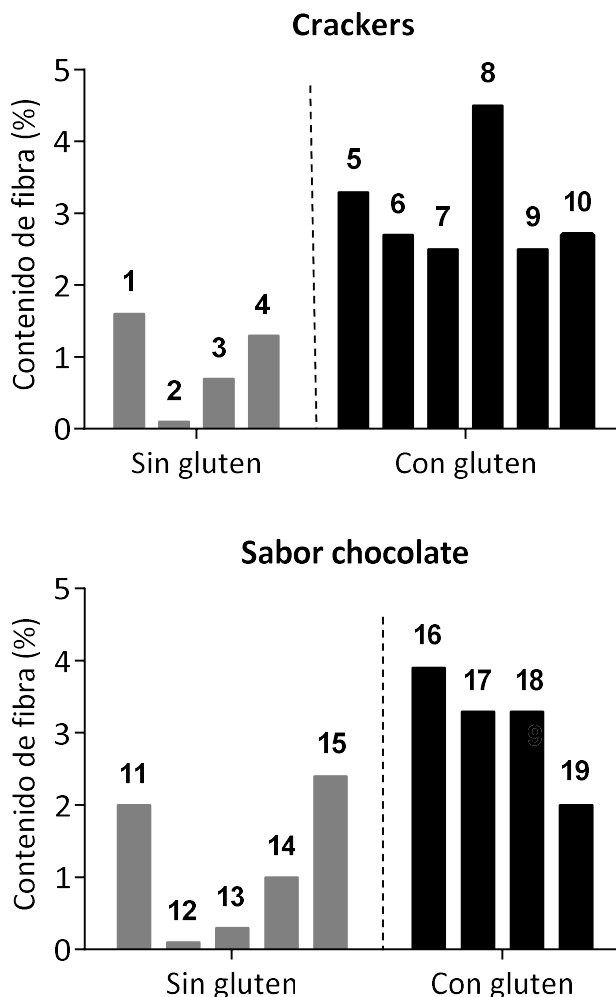
El gluten está formado por dos grupos de proteínas, las gliadinas y las gluteninas, que se encuentran presentes en el trigo, la avena, la cebada y el centeno (a los cuales se hace referencia con las siglas T.A.C.C.). En presencia de agua, estas proteínas interactúan formando el gluten (**Figura 1.17**). El gluten es muy apreciado en la panadería y repostería ya que es el que les confiere a las masas sus propiedades de elasticidad y extensibilidad (Gallagher y col., 2004), contribuye a la formación de la estructura que retiene el gas durante la fermentación de los alimentos y aporta grupos amino que participan en la reacción de Maillard para dar el color y flavor característico de este tipo de productos (Pérez y col., 2013).



**Figura 1.17.** Esquema de formación del gluten

### 1.5.3. Productos libres de gluten

Para lograr productos de panadería con buenas propiedades organolépticas, que se asemejen a los convencionales y sean fácilmente manipulables, en la elaboración de productos libres de gluten suelen usarse mayores cantidades de materia grasa junto con aditivos tecnológicos como la goma xántica. Además, las harinas o almidones usados en reemplazo de la harina de trigo (comúnmente harina de arroz y/o almidón de maíz o papa) tienen bajos contenidos de fibra, por lo que estos productos libres de gluten suelen presentar un muy bajo aporte de este nutriente. Mientras que las galletitas de agua convencionales suelen presentar contenidos de fibra de alrededor de 3,0 g de fibra dietaria cada 100 g de producto, el contenido de fibra en una galletita equivalente libre de gluten suele ser de aproximadamente 0,9 g cada 100 g, es decir hasta tres veces menor. Con las galletitas sabor a chocolate se observa la misma tendencia. Las galletitas sabor chocolate convencionales tienen en promedio 3,1 g de fibra dietaria cada 100 g, mientras que sus equivalentes libres de gluten presentan en promedio 1,1 g de fibra dietaria cada 100 g de producto. En la **Figura 1.18** se pueden apreciar los contenidos de fibra de varias galletitas tipo *crackers* y galletitas sabor chocolate con y sin gluten encontradas en el mercado local.



**Figura 1.18.** Contenido de fibra de varias galletitas tipo *crackers* y galletitas sabor chocolate con y sin gluten. (1) Smams *Crackers*, (2) Smams *Crackers sin sal*, (3) Maicena, (4) Schär *Saltí*, (5) Bagley *Traviata*, (6) Bagley *Criollitas*, (7) Bagley *Criollitas lacteadas*, (8) Granix *Sandwich*, (9) Arcor *Serranas*, (10) Mayco *Sandwich*, (11) Santa María *Galletitas de chocolate*, (12) Maicena *Galletitas sabor chocolate*, (13) DeliCel *Cookies sabor chocolate*, (14) Smams *Choco*, (15) Natuzen *Cookies chocolate*, (16) Bagley *Chocolinas*, (17) Terrabusi *Licolln sabor chocolate*, (18) ParNor *Morochitas*, (19) Fachitas *Choco País*.

En los últimos años, con el aumento de la conciencia sobre la importancia de una dieta rica en fibra, han aparecido en el mercado mundial algunas alternativas de galletitas libres de gluten complementadas con harinas de trigo sarraceno o semillas para ofrecer opciones más ricas en fibra. Aunque esta tendencia está empezando a observarse en el mercado

local, aún existen muy pocas variedades, la mayoría de las cuales consisten de la misma formulación que la variedad original, pero con agregado de semillas enteras.

#### **1.5.4. Productos libres de gluten en el mercado argentino**

La legislación sobre el rotulado de alimentos libres de gluten varía en distintos países del mundo. En Argentina, en el año 2011 se reglamentó la Ley 26.588 a través del Decreto 528/2011. Esta ley incluyó los artículos 1383 (Res. Conj. SPReI 131/2011 y SAGPyA 414/2011) y 1383bis (Res. Conj. SPReI 201/2011 y SAGyP 649/2011) en el Código Alimentario Argentino (CAA), que establecen los requisitos a cumplir para la comercialización de alimentos libres gluten. Para que un alimento pueda rotularse como libre de gluten, el Código Alimentario Argentino establece que el mismo debe estar “...preparado únicamente con ingredientes que por su origen natural y por la aplicación de buenas prácticas de elaboración —que impidan la contaminación cruzada— no contienen prolaminas procedentes del trigo, de todas las especies de *Triticum*, como la escaña común (*Triticum spelta* L.), kamut (*Triticum polonicum* L.), de trigo duro, centeno, cebada, avena ni de sus variedades cruzadas” (Código Alimentario Argentino, Artículo 1383 - (Resolución Conjunta SPReI N° 131/2011 y SAGyP N° 414/2011). Además, el contenido de gluten no puede superar los 10 mg/kg, determinados por la “metodología analítica basada en la Norma Codex STAN 118-79 enzimoimmunoensayo ELISA R5 Méndez y toda aquella que la Autoridad Sanitaria Nacional evalúe y acepte” (Código Alimentario Argentino, Artículo 1383 - (Resolución Conjunta SPReI N° 131/2011 y SAGyP N° 414/2011).

En Argentina hoy en día existe una gran variedad de alimentos libres de gluten en el mercado. Según datos de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) el crecimiento del mercado de productos libres de gluten en los últimos años ha sido exponencial, en particular en el sector de alimentos farináceos (alfajores, barritas de cereal, cereales para desayuno, cereales, harinas y premezclas, comidas preparadas y semielaboradas, galletas y galletitas, golosinas, panes y productos de panadería, pastas secas y frescas, rellenas y sin relleno, productos de repostería y snacks). En este sector, el número de altas de productos pasó de 716 en noviembre de 2012 a 1472 en abril del 2015. Según informes de la Cámara de Productores de Alimentos Libres de Gluten y Afines (CAPALIGLU) el número de socios dedicados a producir y



comercializar productos exclusivos para celíacos pasó de 6 empresas en el año 2009 a 42 en el 2015.

A pesar de estos grandes avances, el acceso a alimentos libres de gluten seguros sigue siendo difícil debido a su alto costo y a la escasa distribución de los mismos en ciertos sectores del país.

# **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

El objetivo general de esta tesis fue lograr un aprovechamiento integral del fruto de grosella negra. Para ello se propuso desarrollar ingredientes en polvo para su empleo en alimentos funcionales como fuente de compuestos bioactivos como polifenoles y fibra.

### 2.2. Objetivos específicos

#### **Objetivo específico 1: Aprovechamiento optimizado del jugo de grosella negra**

- Optimizar el tratamiento de campo eléctrico pulsado (PEF) para maximizar la extracción de compuestos fenólicos del fruto en el proceso de prensado en frío para la obtención de jugo.
- Estudiar el efecto del tratamiento PEF y los distintos parámetros del mismo en la extracción de biocompuestos mediante distintas técnicas analíticas.
- Deshidratar por secado por aspersión el extracto óptimo obtenido, para obtener un producto en polvo de fácil manipulación, que conserve los compuestos bioactivos extraídos y presente buenas propiedades físicas y tecnológicas.

#### **Objetivo específico 2: Aprovechamiento del residuo remanente luego del prensado en frío de grosella negra**

- Aprovechar el residuo remanente luego de la elaboración de jugo para enriquecer galletitas de chocolate libres de gluten con fibra y aportarles los compuestos bioactivos provenientes de la grosella negra.
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las galletitas obtenidas.
- Estudiar las propiedades texturales de las galletitas obtenidas y su respuesta frente a un análisis sensorial con consumidores.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Esta sección consta de tres partes. En la Parte I se detalla la caracterización de la fruta que se utilizó como materia prima. En la Parte II se describe la metodología empleada para la obtención de un extracto de grosella negra, su deshidratación por secado por aspersión para la obtención de un polvo (PS) y su caracterización. Finalmente, en la Parte III se presentan los materiales y métodos utilizados para el desarrollo y caracterización de un ingrediente en polvo liofilizado (PL) obtenido a partir del residuo de grosella negra remanente de la extracción de jugo realizada en la parte anterior. Adicionalmente se describen en esta parte los materiales y métodos correspondientes a la utilización de este residuo en polvo para la elaboración de galletitas libres de gluten con agregado de fibra.

## PARTE I: Caracterización de la materia prima

### 3.1. Materiales

Se utilizó grosella negra (*Ribes nigrum*, variedad Titania) proveniente de la localidad de El Bolsón (Río Negro, Argentina) congelada por la tecnología IQF (Individual Quick Freezing). Los frutos se conservaron a -18 °C hasta el momento de su utilización.

Para todas las determinaciones realizadas directamente sobre la fruta, ésta se descongeló siguiendo condiciones estandarizadas en un baño de agua a 40 °C durante 30 min y luego se molió con una procesadora manual minipimer HR 1372 (Philips, Buenos Aires, Argentina) por 60 s.

### 3.2. Análisis fisicoquímicos

#### 3.2.1. Contenido de agua

El contenido de agua de la fruta se determinó por gravimetría mediante secado en estufa con vacío hasta peso constante siguiendo el método oficial 925.09 (AOAC, 2005). Las muestras se colocaron en una estufa de vacío Vaccum Oven Fistreem (Cambridge, Reino Unido) en presencia de gel de sílice como agente desecante a una temperatura de 60 °C y con una presión de 50 mm Hg. Antes de cada pesada las muestras se enfriaron en un desecador conteniendo gel de sílice. Los pesos se registraron en una balanza analítica digital de precisión Mettler Toledo AG245 (Suiza). La determinación se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como g H<sub>2</sub>O/100g fruta.

#### 3.2.2. Sólidos solubles, acidez total y pH

El contenido de sólidos solubles de la fruta se determinó mediante el método oficial 932.12 (AOAC, 2005) con un refractómetro digital modelo AR200 (Reichert, USA) a 20 °C y el resultado se expresó como g sólidos/100g fruta (ó °Brix).

La acidez total se determinó por titulación con una solución de NaOH y se expresó como g ácido cítrico/ 100 g muestra. Se empleó un pHímetro modelo 340 (Mettler Toledo,

Reino Unido) para determinar el punto final de la titulación debido al color oscuro de la fruta que imposibilitaba la detección del viraje de color del indicador. El mismo pHímetro se empleó para determinar el pH.

Las tres determinaciones se realizaron por triplicado.

### **3.2.3. Análisis de propiedades funcionales**

Para las mediciones espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro UV-visible Jasco V-630 (Tokyo, Japón). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **3.2.3.a. Extracción**

##### *Extracción metanólica*

Para las determinaciones de contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante de la fruta se realizaron extractos metanólicos. Para ello, 0,5 g de muestra se homogeneizaron en 5 mL de metanol absoluto, se agitó por 5 minutos con un agitador magnético y se filtró con vacío en un embudo Büchner. El residuo remanente se volvió a extraer con 5 mL más de metanol. Finalmente, los extractos se juntaron y se llevaron a un volumen final de 10 mL con metanol.

##### *Extracción con alcohol acidificado*

Para las determinaciones de contenido de antocianinas monoméricas totales se usó un extracto con alcohol acidificado. 1,0 g de muestra se homogeneizó en 10 mL de etanol acidificado con ácido clorhídrico, se agitó por 15 min en un agitador magnético y se filtró en vacío con un embudo Büchner. El residuo remanente se volvió a extraer dos veces más con 5 mL de etanol acidificado. Finalmente, los extractos se juntaron y se llevaron a un volumen final de 25 mL.

#### **3.2.3.b. Contenido de polifenoles totales**

El contenido de polifenoles totales (CPT) se determinó mediante el método del reactivo de Folin–Ciocalteu según Singleton y col. (1999) con algunas modificaciones. 100  $\mu$ L de extracto metanólico se mezclaron con 900  $\mu$ L de agua, 100  $\mu$ L de reactivo

Folin–Ciocalteu y 600  $\mu\text{L}$  de solución de carbonato de sodio al 20% en NaOH 1,5 N. Luego de incubar 25 min a 40 °C protegido de la luz, se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 765 nm. Se realizaron las diluciones necesarias de los extractos de modo de obtener una absorbancia entre 0,2 y 0,9. Se construyó una curva de calibración con soluciones de ácido gálico de concentraciones entre 0 y 0,2 mg/mL ( $R^2=0,997$ ) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mg EAG/g).

### 3.2.3.c. Contenido de antocianinas monoméricas totales

El contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) se determinó usando el método del pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Se realizó una dilución 1:3 (extracto:buffer) con soluciones de buffer de pH 1,0 y de pH 4,5. Luego de 15 min de reposo en oscuridad se midió la absorbancia a 510 y 700 nm. El contenido de antocianinas monoméricas totales se expresó como mg de cianidina-3-glucósido por gramo de muestra (mg cian-3-glu/g fruta) usando las **Ecuaciones 3.1** y **3.2**.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad \text{Ec. 3.1}$$

$$\text{TMA} = \frac{(A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000)}{(\epsilon \times l)} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde PM es el peso molecular de la cianidina-3-glucósido (445,2 g/mol); FD es el factor de dilución;  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $26.900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ); y l es el paso óptico (1 cm).

### 3.2.3.d. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante (AA) se determinó mediante el método de decoloración del catión radical 2,20-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] ( $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ), según Coria Cayupán y col. (2011). Para preparar la solución del radical ( $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ) se disolvieron ABTS y persulfato de potasio en agua destilada de modo de obtener una concentración de 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato de potasio. Esta solución se incubó durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente y luego de este período se diluyó con buffer



fosfato de pH 7,4 hasta una absorbancia cercana a 1 a 734 nm. Para realizar la determinación, se adicionaron 1,9 mL de la solución de trabajo de ABTS<sup>+</sup> a 0,1 mL del extracto metanólico de la muestra, se incubó a 25 °C en oscuridad por 30 min y se midió la disminución de la absorbancia a 734 nm respecto a un blanco. Se realizaron las diluciones necesarias de los extractos de modo de obtener una absorbancia entre 0,2 y 0,9. Se construyó una curva de calibración con soluciones de ácido gálico de concentraciones entre 0,001 y 0,02 mg/mL. Debido a la gran inestabilidad del reactivo ABTS<sup>+</sup>, se construyó la curva de calibración al inicio de cada medición. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mg EAG/g).

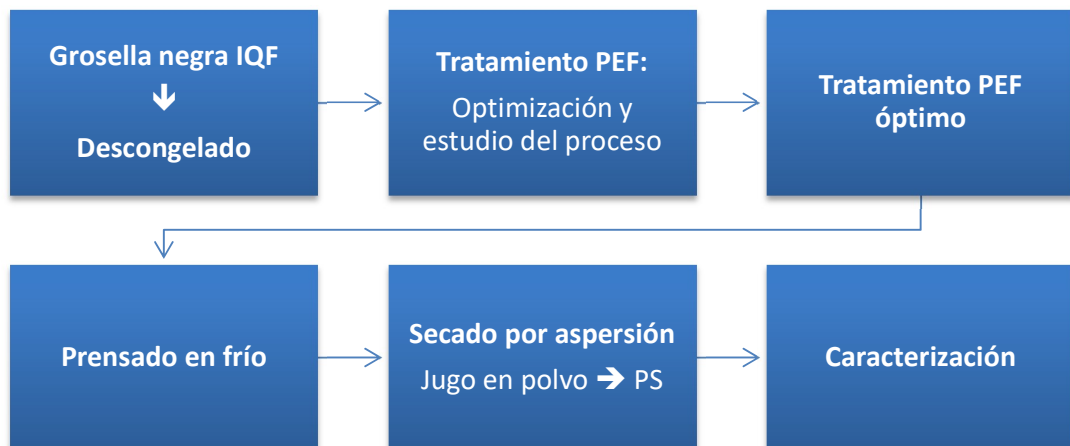
## PARTE II: Aprovechamiento optimizado del jugo de grosella negra

Con el fin de mejorar el aprovechamiento del jugo de grosella negra, se estudió el uso de la tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF) como pretratamiento aplicado a la fruta inmediatamente antes de la obtención del jugo por prensado en frío. A continuación, el jugo obtenido se deshidrató por secado por aspersion para obtener un producto de más fácil manipulación y transporte y para aumentar su vida útil conservando sus propiedades funcionales. La **Figura 3.1** muestra el esquema de trabajo seguido para esta parte de la tesis.

### 3.3. Materiales

Se utilizó la misma grosella negra (*Ribes nigrum*, variedad Titania) congelada por la tecnología IQF (Individual Quick Freezing) que fue caracterizada en la sección anterior. Los frutos se conservaron a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Para el secado por aspersion se empleó maltodextrina de grado alimenticio DE 12 como matriz o *carrier*.

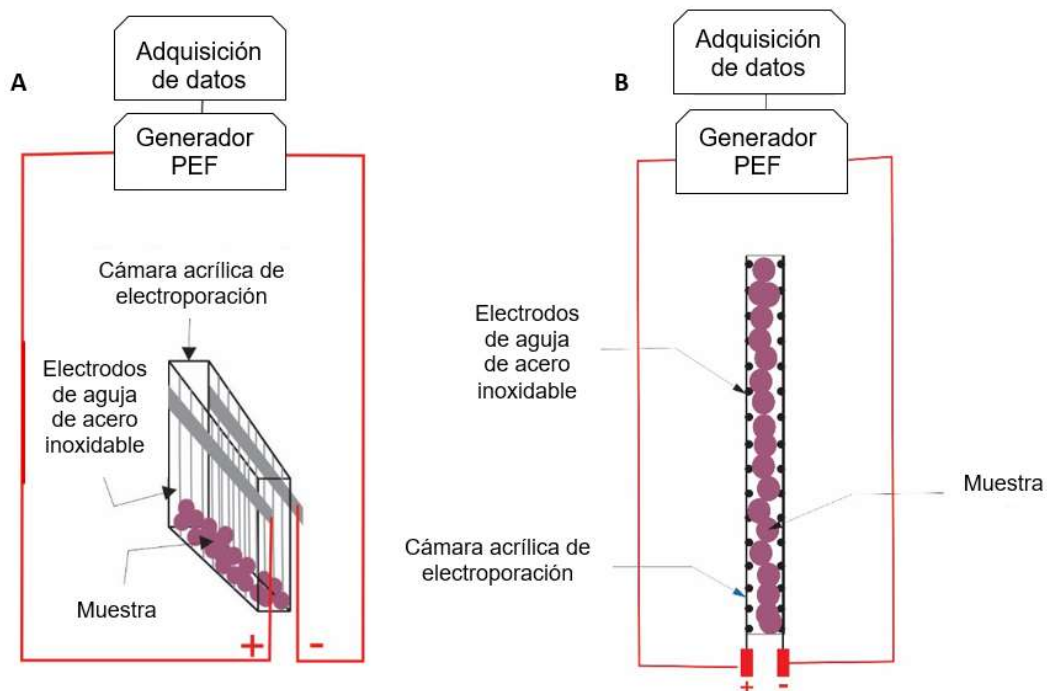


**Figura 3.1.** Esquema de trabajo seguido para la parte II de la tesis.

### 3.4. Estudio y optimización del tratamiento por campo eléctrico pulsado (PEF)

#### 3.4.1. Tratamientos PEF

El tratamiento de campo eléctrico pulsado se aplicó sobre la fruta descongelada en condiciones controladas (baño a 40 °C durante 30 min). Se realizó en lotes de 60 g de fruta en una cámara de electroporación diseñada a medida. La misma consistió de una cubeta de acrílico de 21 cm x 5 cm y 1 cm de profundidad. Los electrodos estuvieron constituidos por dos filas de agujas de acero inoxidable enfrentadas a 80 mm y distanciadas a 1 cm entre sí (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Sistema de electroporación empleado. (A) vista en perspectiva, (B) vista superior.

La cámara de electroporación se sumergió en hielo durante el tratamiento de manera de asegurar la continuidad de la cadena de frío y disipar el calor generado por la corriente eléctrica y minimizar los efectos térmicos indeseables. La **Figura 3.3** muestra una fotografía de la cámara de electroporación en uso.

El equipo de electroporación utilizado fue un electroporador de onda cuadrada (BTX ECM 830, Harvard Apparatus Inc., MA, Estados Unidos). Los pulsos se administraron en *trenes* de 25 pulsos, repitiendo la aplicación hasta alcanzar el número de pulsos totales. El voltaje y la corriente se midieron a lo largo de todos los tratamientos con una sonda de alto voltaje (100x) y un resistor *shunt* (1 ohm) en serie con la cámara usando un osciloscopio DSOX2012A, 100 MHz, 2 canales (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos). La **Figura 3.4** muestra una fotografía del equipo de electroporación utilizado. Además, se tomó registro de la temperatura al inicio y final de cada tratamiento con un termómetro de pinche modelo 265A (Luft, Alemania).



**Figura 3.3.** Fotografía de la cámara de electroporación durante su uso.

Inmediatamente después del tratamiento de electroporación se procedió a la extracción del jugo por prensado en frío en una juguera comercial (Peabody by Hurom PE-HSJO2, China) operando a 70 rpm durante 1,5 min a una potencia de 150 W.

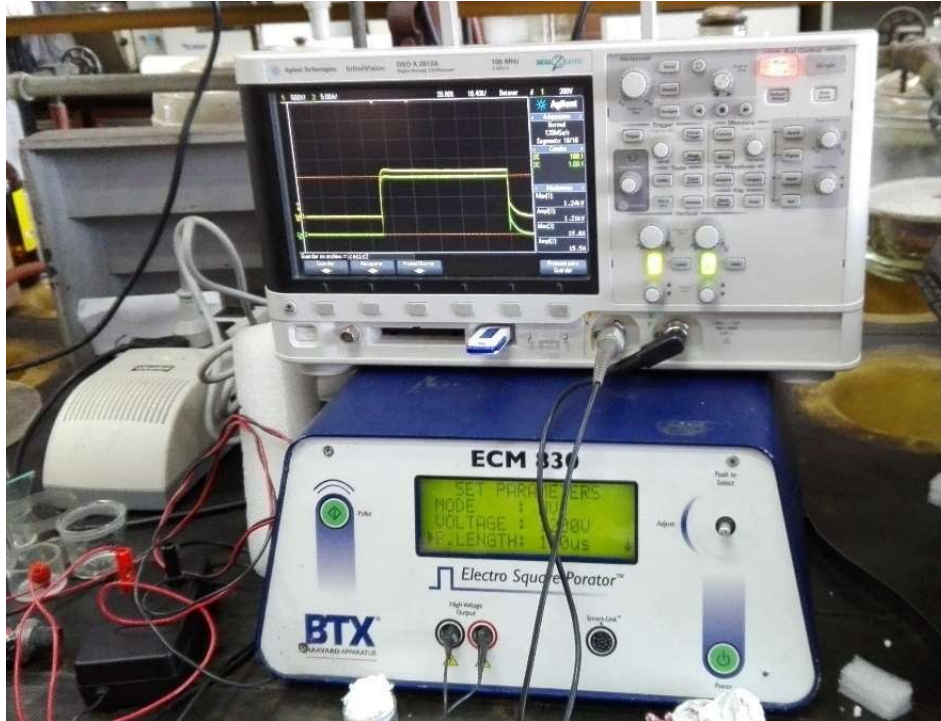


Figura 3.4. Fotografía del equipo de electroporación empleado.

### 3.4.2. Optimización del tratamiento PEF

Dado que los efectos del tratamiento de campo eléctrico pulsado dependen fuertemente del sistema de electroporación utilizado, así como del material a electroporar, se realizó un proceso de optimización con el fin de determinar cuáles eran las condiciones óptimas de tratamiento para favorecer la extracción de compuestos bioactivos de esta fruta con este sistema de electrodos. Se empleó el software Design Expert 10 para crear un diseño de experimentos. Se utilizó un diseño factorial de 4x3 niveles para dos variables independientes (factores) y dos variables dependientes (respuestas). Se realizó un duplicado del diseño completo, lo cual resultó en un total de 24 experimentos. Los experimentos se condujeron en orden aleatorio para evitar el efecto de *bloqueo*. Se estudió el efecto de la intensidad del campo eléctrico (Factor A) y el número de pulsos de duración

constante (100  $\mu$ s) (Factor B) sobre el contenido de polifenoles totales (Respuesta A) y la actividad antioxidante (Respuesta B). Las determinaciones de contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante se realizaron sobre el jugo siguiendo el procedimiento descripto en las **Secciones 3.2.3.a, 3.2.3.b y 3.2.3.d**.

Se evaluó en pruebas preliminares la conductividad del material de manera de determinar el voltaje máximo que podía administrarse al sistema (compuesto por el equipo, la cámara de electroporación y la muestra de fruta) sin que se generaran descargas eléctricas y limitaciones técnicas por exceso de corriente. Este valor máximo de campo eléctrico se usó como límite superior del diseño experimental. En la **Tabla 3.1** se muestran los valores ensayados para cada factor.

Con el fin de encontrar las condiciones de tratamiento óptimas para maximizar ambas respuestas se usó la metodología de superficie de respuesta (RSM) junto con la función deseabilidad (Derringer y Suich, 1980). La metodología de superficie de respuesta es una herramienta muy útil para estudiar el efecto de diferentes factores y sus interacciones (Baş y Boyacı, 2007; Suárez y col., 2014). Por otro lado, la función deseabilidad permite optimizar múltiples respuestas de manera simultánea, encontrando un valor óptimo para cada variable independiente que daría como resultado el valor más cercano al deseado para todas las variables dependientes (Silva y col., 2013). Esta función adopta diferentes formas según si el objetivo de la optimización es alcanzar un valor específico, un valor máximo o uno mínimo. En el caso de buscar la maximización de la respuesta, esta función queda de la forma expresada en la **Ecuación 3.3**.

$$d = 1 - \frac{Y^+ - \hat{Y}}{Y^+ - Y^-} \quad \text{si} \quad Y^- < \hat{Y} \leq Y^+ \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde  $d$  es la deseabilidad,  $Y^+$  e  $Y^-$  representan respectivamente las cotas inferiores y superiores, que definen los valores extremos del proceso, e  $\hat{Y}$  es el valor de la respuesta.  $d$  toma el valor 0 cuando  $\hat{Y}$  es menor que  $Y^-$  y valor 1 cuando  $\hat{Y}$  es mayor o igual a  $Y^+$ .

**Tabla 3.1.** Diseño experimental empleado para la optimización del tratamiento PEF.

Factores		
Número de tratamiento	Campo eléctrico (V/cm)	Número de pulsos
1	0	50
2	0	275
3	0	500
4	650	50
5	650	275
6	650	500
7	1300	50
8	1300	275
9	1300	500
10	1950	50
11	1950	275
12	1950	500
13	0	50
14	0	275
15	0	500
16	650	50
17	650	275
18	650	500
19	1300	50
20	1300	275
21	1300	500
22	1950	50
23	1950	275
24	1950	500

Se ensayaron distintos modelos y se estudiaron parámetros estadísticos para evaluar la bondad de ajuste. Se determinó que el modelo cúbico (**Ec. 3.4**) era el que mostraba el mejor ajuste a los datos experimentales.

$$y = a + bX_1 + cX_2 + dX_1X_2 + eX_1^2 + fX_2^2 + gX_1^2X_2 + hX_1X_2^2 + iX_1^3 + jX_2^3 \quad \text{Ec. 3.4}$$

Donde  $X_1$ = campo eléctrico y  $X_2$ = número de pulsos.

### 3.4.3. Efecto de la temperatura en el tratamiento PEF

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre el tratamiento de campo eléctrico pulsado se utilizaron las condiciones óptimas halladas según el diseño experimental. Se partió de frutos de grosella negra descongelados y acondicionados, uno en un baño de hielo (temperatura inicial 10 °C) y otro a temperatura ambiente (temperatura inicial de 22 °C). Se aplicó el tratamiento en ambas situaciones y se midió la temperatura cada 25 pulsos durante todo el tratamiento con un termómetro de pinche modelo 265A (Luft, Alemania). En ambos casos se observó un aumento de la temperatura de menos de 5 °C durante el tratamiento. Además, se realizaron dos controles, uno a cada temperatura inicial (10 y 22 °C). Sobre los distintos jugos obtenidos luego del prensado se determinó el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante siguiendo el procedimiento descrito en las Secciones 3.2.3.a, 3.2.3.b y 3.2.3.d. Las determinaciones, tanto de las muestras tratadas como de los controles, se realizaron por triplicado.

## 3.5. Obtención del jugo y análisis de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales

Para verificar el desempeño del proceso de optimización, se sometió la fruta al tratamiento PEF bajo las condiciones óptimas predichas por el diseño. Además, se condujo en paralelo una muestra control sometida al mismo proceso, pero sin la aplicación del pretratamiento PEF. Ambos procedimientos se realizaron por triplicado.

Los jugos obtenidos se caracterizaron en cuanto a su contenido de sólidos solubles, pH, acidez, contenido de polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales y actividad antioxidante siguiendo las metodologías que se detallan a continuación. También se realizaron estudios por espectroscopía FT-IR y RAMAN, y HPLC.



### **3.5.1. Sólidos solubles, acidez total y pH**

Se determinaron según las metodologías descriptas en la **Sección 3.2.2.**

### **3.5.2. Contenido de polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales y actividad antioxidante**

Se determinaron sobre el jugo, siguiendo el procedimiento descrito en las **Secciones 3.2.3.a, 3.2.3.b y 3.2.3.d.**

### **3.5.3. Liofilización del jugo para fines analíticos**

Para las determinaciones espectrofotométricas y cromatográficas que se describen a continuación, una fracción del jugo obtenido bajo las condiciones óptimas de tratamiento (óptimo) se deshidrató por liofilización. Para ello, el jugo se acondicionó en viales y se congeló por 48 hs a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se liofilizó en un liofilizador Alpha 1-4LD/2-4LD-2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GMB, Osterode, Alemania) operando a  $-50 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0,04 mbar durante 48 horas. El producto obtenido se molió manualmente. Un jugo obtenido sin el pretratamiento PEF, liofilizado y molido siguiendo el mismo procedimiento, fue utilizado como control.

### **3.5.4. Estudio del efecto del tratamiento PEF por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y análisis multivariado**

Los espectros infrarrojos de los jugos óptimo y control liofilizados se obtuvieron mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) en un espectrofotómetro FT-IR modelo Spectrum 400 (Perkin Elmer, INC., Shelton CT, E.E.U.U.) con un cristal de diamante de una reflexión. Se barrió la región entre  $450\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  y acumulando 64 barridos. A los espectros obtenidos se les corrigió la línea de base, se normalizaron y se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de clusters usando el software MATLAB (The Math Works, Inc., MA, E.E.U.U.) con el fin de analizar si se detectaban diferencias entre los espectros de las muestras sometidas al tratamiento PEF y las muestras control.

El análisis de componentes principales (PCA) es uno de los métodos multivariados más empleados. Consiste en construir una matriz  $\mathbf{X}$  con los datos, con I filas (tratamientos) y J columnas (absorción normalizada de los espectros FT-IR). El método PCA busca nuevas variables (componentes principales) para la matriz  $\mathbf{X}$  según  $\mathbf{X}=\mathbf{TP}^T+\mathbf{E}$ , donde  $\mathbf{P}$  son las matrices que contienen los vectores de *scores* (relacionados con los componentes principales) y los vectores de *loadings*. Por otro lado,  $\mathbf{E}$  es una matriz que contiene los residuos de cada muestra. Cada componente principal es una combinación de los *scores* y los *loadings* y se relaciona con una cantidad de varianza de los datos originales en orden decreciente (Bro y Smilde, 2014).

### 3.5.5. Estudio del efecto del tratamiento PEF por espectrometría Raman

Para el análisis por espectrometría Raman se utilizaron los mismos extractos, óptimo y control liofilizados, empleados para el estudio de espectroscopía FT-IR. Se obtuvieron los espectros Raman en un equipo LabRAM HR Evolution (Horiba Scientific, Francia) empleando un láser de 633 nm y un objetivo 20x. Cada espectro se obtuvo como resultado de tres barridos, con un tiempo de acumulación de entre 2 y 4 segundos y una potencia de entre 0,25 y 0,5 mW. Estos parámetros se ajustaron de manera de minimizar la señal debida a la fluorescencia. El procesamiento de los espectros consistió de una corrección de línea de base y un suavizado.

### 3.5.6. Estudio del efecto del tratamiento PEF sobre los compuestos fenólicos del jugo por HPLC-DAD

#### *Estándares utilizados*

Cloruro de cianidina (cianidina-3-glucósido, kuromanina), (-)epicatequina y resveratrol de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, EEUU); ácido elágico de LGC Standards (Teddington, Reino Unido) y ácido gálico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, catequina y quercetina-3-rutinósido (rutina) de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania). Los solventes usados como fase móvil fueron agua Mili-Q, metanol y ácido fosfórico 85% grado HPLC provistos por Sintorgan (Sintorgan S.A., Buenos Aires, Argentina).

### *Preparación de los extractos*

El producto liofilizado obtenido según el procedimiento descrito en la **Sección 3.5.3** se sometió a una extracción metanólica según la metodología descrita en la **Sección 3.2.3.a** pero pesando una masa de muestra de 0,3 g y llevando a un volumen final de 25 mL. A continuación, se realizó una purificación del extracto mediante una extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos HyperSep C18 (tamaño de partícula entre 40 y 60  $\mu\text{m}$ , volumen de 3 mL, Thermo Scientific<sup>TM</sup>, EEUU). Se usaron 3 mL de metanol para humedecer el cartucho y luego se agregaron los 3 mL del extracto metanólico. Las muestras eluidas se filtraron con un filtro de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  (Genbiotech SRL, Buenos Aires, Argentina) y se recolectaron en viales para HPLC.

### *Análisis cuali-cuantitativo*

El análisis cromatográfico se realizó usando un equipo Agilent 1260 HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con un detector de arreglo de diodos (DAD), controlado por un software Agilent's OpenLAB Chem Station. Se empleó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 X 100 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent Technologies) operando a 25 °C, bajo un flujo de 0,5 mL/min y un volumen de inyección de 5  $\mu\text{L}$ . Como solventes de elución se usaron agua Mili-Q (solvente A), ácido fórmico 85% (solvente B) y metanol (solvente C) en un gradiente lineal. Se comenzó la elución con 99% de solvente A y 1% de solvente B, alcanzando una proporción de 79,2% de solvente A y 0,8% de solvente B a los 10 minutos de elución, 59,4% de solvente A y 0,6% de solvente B a los 20 minutos, 39,6% de solvente A y 0,4% solvente B a los 30 min y 19,8% de solvente A y 0,2% de solvente B a los 40 minutos, completándose en cada caso el total con el solvente C. Entre cada inyección se dejó un tiempo de 6 minutos para asegurar el estado estacionario del sistema. La detección se realizó a 280 nm para los flavanoles y el ácido gálico, 323 nm para los ácidos hioxycinámicos y estilbenos, 365 nm para los flavonoles y el ácido elágico y 520 nm para la antocianidinas. La identificación se realizó comparando los tiempos de retención y los espectros UV-visibles (entre 210 y 610 nm) con los de los estándares. Para la cuantificación se usó el método de estándar externo con curvas de calibración construidas a partir de tres mezclas, en un rango entre 0,05 y 200 mg/L.

### **3.6. Obtención del ingrediente deshidratado a partir del jugo de grosella negra por secado por aspersión**

#### **3.6.1. Pretratamiento de campo eléctrico pulsado y prensado en frío**

La fruta se descongeló en condiciones controladas (baño a 40 °C durante 30 min) antes de su utilización. Una vez alcanzada una temperatura de 10 °C, se sometió al tratamiento de PEF óptimo determinado en la etapa previa (**Sección 3.4.2**) siguiendo el mismo procedimiento descrito en la **Sección 3.4.1**.

Inmediatamente después de aplicar el pretratamiento de campo eléctrico pulsado, se procedió a la obtención del jugo por prensado en frío con una juguera comercial (Peabody by Hurom PE-HSJO2, China) operando bajo las mismas condiciones descriptas en la **Sección 3.4.1**. El jugo y el residuo se recogieron por separado en recipientes adecuados.

#### **3.6.2. Deshidratación por secado por aspersión**

Al jugo se le agregó maltodextrina como matriz en una proporción del 20% en peso. La misma se fue incorporando de manera gradual con agitación constante hasta asegurar la solubilización total. El secado se realizó en un equipo a escala laboratorio Mini Spray Dryer Büchi B290 (Flawil, Suiza) que se muestra en la **Figura 3.5**. Las condiciones de secado fueron una temperatura de aire de entrada de  $150 \pm 3$  °C, un flujo de 8 mL/min, una presión de aire de 3,2 bar y un diámetro de boquilla de 1,5 mm. Estas condiciones de operación, así como el porcentaje de maltodextrina adicionado, se escogieron en base a trabajos previos realizados por el grupo y a ensayos preliminares (Archaina y col., 2018; Franceschinis y col., 2014). El polvo obtenido (PS) se recogió en bolsas de polietileno herméticamente selladas y se almacenó a -18 °C hasta su uso.



Figura 3.5. Fotografía del equipo de secado por aspersión utilizado.

### 3.7. Caracterización del polvo de grosella negra

El polvo de grosella negra obtenido por secado por aspersión (PS) se caracterizó en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y tecnológicas para evaluar su desempeño como ingrediente en polvo con potencial uso para el desarrollo de alimentos funcionales. Los estudios realizados se describen a continuación.

#### 3.7.1. Análisis fisicoquímicos

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 3.7.1.a. Contenido de agua y actividad de agua

Para la determinación del contenido de agua se utilizó el método de titulación Karl Fisher a 25 °C con un sistema de titulación Karl Fisher TIM 980 (Radiometer Analytical, France), usando la técnica de un solo componente con Hydranal Titrant Composite 5 de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). Se usó metanol puro como solvente y se analizaron porciones de 20 mg de muestra aproximadamente.

La actividad de agua ( $a_w$ ) se midió con un medidor de punto de rocío Aqualab series 3te (Decagon Devices, pullman, washington, USA).

### 3.7.1.b. Cohesividad y fluidez del polvo

La densidad de *bulk* (g/mL) se determinó según Jinapong y col. (2008) con algunas modificaciones, midiendo el volumen ocupado por 0,6 g de polvo. La masa se midió en una balanza analítica y el volumen con una probeta graduada de 10 mL. El volumen ocupado por la misma masa de muestra luego de 1 min de vibración en vortex se empleó para determinar la densidad compactada (g/mL).

El Índice de Hausner (IH) se relaciona con la cohesividad del polvo (**Ecuación 3.5**). Valores por debajo de 1,2 se consideran una cohesividad baja, entre 1,2 y 1,4 describen polvos de cohesividad intermedia y por arriba de 1,5 alta (Jinapong y col., 2018). Por otro lado, el grado de fluidez se basa en el Índice de comprensión de Carr (IC) (**Ecuación 3.6**). En este índice, valores iguales o menores de 10 corresponden a una fluidez excelente, entre 11 y 15 buena, entre 16 y 20 justa, de 21 a 25 aceptable y entre 26 y 31 pobre (Jinapong y col., 2018).

$$IH = \frac{\text{densidad compactada}}{\text{densidad de bulk}} \quad \text{Ec. 3.5}$$

$$IC = \frac{(\text{densidad compactada} - \text{densidad de bulk})}{\text{densidad compactada}} \quad \text{Ec. 3.6}$$

### 3.7.1.c. Solubilidad

La solubilidad se determinó de acuerdo a Franceschinis y col. (2014) con algunas modificaciones. Se hidrataron 0,5 g de polvo en 50 mL de agua destilada y la mezcla se centrifugó a 3000 g por 5 minutos. Posteriormente, 10 mL del sobrenadante se transfirieron a una cápsula de vidrio y se secaron en horno a 105 °C hasta peso constante. La solubilidad (%) se calculó por diferencia de peso.

### 3.7.1.d. Higroscopicidad

La higroscopicidad se determinó de acuerdo al método descrito por Swaminathan y col. (2015) con leves modificaciones. Se colocó 1,0 g de polvo en un desecador con una solución saturada de NaCl (75% HR) y se almacenó en una cámara de temperatura controlada a 25 °C. Se tomó el peso de las muestras de manera periódica durante 9 días con el fin de evaluar la cinética de adsorción de vapor de agua (**Figura 7.1 – Anexo**). La higroscopicidad se expresó como los gramos de agua adsorbida cada 100 g de materia seca una vez alcanzado el equilibrio, es decir, cuando el peso se mantuvo constante durante más de dos pesadas consecutivas.

### 3.7.1.e. Color

El color superficial se determinó mediante un fotocolorímetro triestímulo portátil (Minolta Co, model CR400, Japón) empleando el iluminante C, 2° de observador estándar y excluyendo la componente especular. Las funciones de color se calcularon en el espacio uniforme CIELAB obteniéndose los parámetros L\* (luminosidad/oscuridad), a\* (rojo/verde) y b\* (amarillo/azul). Las mediciones se realizaron dentro de viales de vidrio con un espesor suficiente de polvo para alcanzar 1 cm de altura y el sistema se cubrió con un recipiente opaco blanco para estandarizar las mediciones y proteger de la luz exterior. La variación global del color ( $\Delta E^*_{00}$ ) se calculó en los casos correspondientes según la **Ecuación 3.7** (Luo y col. 2001):

$$\Delta E^*_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H} \quad \text{Ec. 3.7}$$

Donde:

$$\Delta L' = (L_0^* - L^*)$$

$$\Delta C' = (C_0^* - C^*)$$

$$\Delta H' = 2 \sqrt{C_0^* C_1^*} \sin(\Delta h'/2)$$

$k_L S_L$ ,  $k_C S_C$  y  $k_H S_H$  son funciones de ponderación que corrigen las diferencias entre los parámetros.

$R_T$  es la función rotación que relaciona la interacción entre el chroma ( $C^*_{ab}$ ) y el ángulo hue ( $h^*_{ab}$ ) definidas en las **Ecuaciones 3.8** y **3.9** (MacDougall 2002).

$$C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Ec. 3.8}$$

$$h^*_{ab} = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{Ec. 3.9}$$

### 3.7.2. Análisis de propiedades funcionales: CPT, AMT y AA

Las determinaciones se realizaron sobre las muestras reconstituidas disolviendo 0,55 g de polvo en 2,5 mL de agua destilada de manera de obtener una solución con una concentración de sólidos solubles cercana a la del jugo original.

Las mediciones se realizaron por triplicado usando los métodos descritos en la **Sección 3.2.3**.

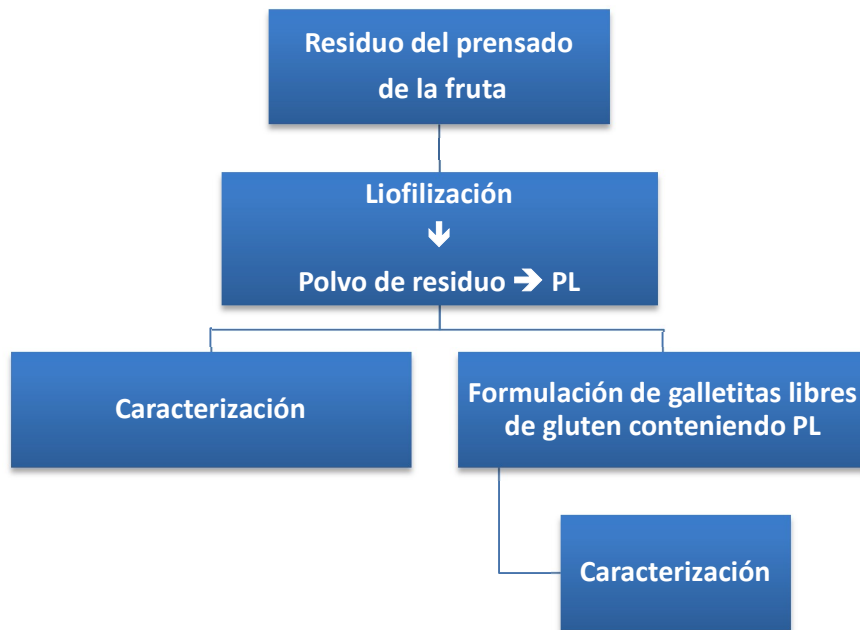
## 3.8. Diseño experimental y análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico GraphPad Prism 6 (California, E.E.U.U., 2014). Se realizaron análisis ANOVA y test de Tukey sobre todos los resultados para determinar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Para el diseño de experimentos y los experimentos de optimización se usó el software Design Expert 10 (Minneapolis, USA). Para el análisis estadístico multivariado se usó el software MATLAB (The MathWorks, Inc).



### PARTE III: Aprovechamiento del residuo de grosella negra

La **Figura 3.6** muestra el esquema de trabajo seguido para la formulación de galletitas libres de gluten ricas en fibra a partir de residuo de grosella negra en polvo.



**Figura 3.6.** Esquema de trabajo seguido para la Parte III de esta tesis.

### 3.9. Materiales

Se utilizó el residuo remanente luego del prensado en frío de la grosella negra descrito en la Parte II de esta sección (**Ítem 3.5**), con el objetivo de generar un polvo rico en compuestos bioactivos como fibra y compuestos antioxidantes, para ser incorporado en una formulación de galletitas libres de gluten.

Los insumos y materiales utilizados para la formulación de las galletitas (harina de arroz, almidón de maíz, azúcar, cacao en polvo, esencia de vainilla, esencia de chocolate, bicarbonato de sodio y sal) fueron todos productos libres de gluten provistos por la empresa Tecnología Alimentaria Rioplatense.

### **3.10. Obtención del polvo a partir del residuo del prensado de grosella**

El residuo separado luego del prensado se acondicionó en recipientes adecuados y se congeló por 48 hs a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se liofilizó en un liofilizador Alpha 1-4LD/2-4LD-2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GMB, Osterode, Alemania) operando a  $-50 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0,04 mbar durante 48 horas.

El material liofilizado se sometió a una molienda manual suave con la ayuda de un mortero y se tamizó con una malla de 1 mm de paso (mesh N° 18) para separar las semillas. A continuación, con el fin de obtener un polvo de una granulometría más fina que se disperse correctamente con los otros polvos a emplear en la formulación, se molió durante 45 segundos en un molinillo para café Moulinex (China). Este polvo se identificó como PL.

### **3.11. Elaboración de galletitas de chocolate libres de gluten con agregado de PL**

Se preparó una formulación de galletitas de chocolate libres de gluten según las recomendaciones provistas por la empresa Tecnología Alimentaria Rioplatense, y siguiendo el procedimiento usado en la planta de fabricación, pero a escala laboratorio. La formulación de base consistió de: harina de arroz, almidón de maíz, azúcar, cacao en polvo, esencia de vainilla, esencia de chocolate, bicarbonato de sodio y sal. A esta formulación se le adicionó PL en reemplazo de una parte de la mezcla de harinas libres de gluten en distintas cantidades: 0,40; 1,00; 3,75 y 6,00 %.

Una vez obtenidas las premezclas se procedió a elaborar las galletitas con el fin de evaluar el desempeño de cada una. Para ello se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante. Por cada 200 g de premezcla se batió 1 huevo (45 g), se adicionaron 50 g de manteca derretida y por último se incorporó la premezcla mezclando y luego amasando. Luego de dejar reposar la masa 15 min, se la estiró hasta lograr un espesor de 0,5 mm, se cortaron las galletitas y se cocinaron a  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 8 min en un horno eléctrico con convección SL-TO0040 (Smartlife, China). Una vez frías se envasaron en bolsas de polietileno con sello hermético hasta su análisis.

Para definir la formulación de las galletitas enriquecidas, se prepararon los distintos prototipos y se realizó un primer análisis sensorial con un panel interno constituido por 8 jueces no entrenados. Este tipo de evaluaciones se realizan para investigar la aceptabilidad relativa de los productos (Watts y col., 1992). En este caso se determinó que la mayor concentración del residuo que permitía elaborar galletitas sensorialmente aceptables era de 3,75%, siendo el color y el *flavor* los parámetros limitantes. A partir de estos resultados se continuó el análisis con esta formulación, a la cual se denominó “galletita GN”. Como control se desarrolló la “galletita C”, con una fórmula idéntica, pero sin el agregado del ingrediente de grosella negra, completando la misma masa total que la galletita GN con la mezcla de harinas.

### **3.12. Estudio y caracterización del ingrediente PL y de las galletitas**

El polvo PL se caracterizó en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales para evaluar su posible aplicación como ingrediente en polvo con potencial uso para el desarrollo de alimentos funcionales. Se determinó su  $a_w$ , contenido de agua, pH, acidez, color, contenido de polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales, actividad antioxidante, contenido de fibra dietaria total e insoluble, composición centesimal, contenido de cenizas y contenido de ciertos minerales (sodio, potasio y calcio). También se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de barrido.

Sobre las galletitas adicionadas con el polvo de grosella negra (galletita GN) y las galletitas control (galletita C) una vez horneadas, se determinaron el color, las dimensiones, la actividad de agua ( $a_w$ ) y el contenido de agua. Se estudió su composición centesimal, contenido de cenizas, fibra dietaria total y fibra dietaria insoluble y contenido de ciertos minerales (sodio, potasio y calcio). Por otro lado, se analizó el contenido de polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales y actividad antioxidante y se realizó una digestión *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante bioaccesible. Además, se estudiaron las propiedades texturales y se condujo un análisis sensorial con consumidores.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a excepción de la determinación de fibra dietaria total e insoluble que se realizó por duplicado y las mediciones de textura que se realizaron sobre 10 réplicas debido a la gran variabilidad de esta determinación. Las metodologías empleadas para estas determinaciones se detallan a continuación.

### 3.12.1. Análisis fisicoquímicos y de microestructura

#### 3.12.1.a. Contenido de agua y actividad de agua

Para la determinación del contenido de agua del PL se empleó el método descrito en la **Sección 3.7.1.a**. Para las galletitas se empleó el método detallado en la **Sección 3.2.1**, sobre las muestras previamente molidas con un mortero manual.

La actividad de agua ( $a_w$ ) se determinó empleando la metodología descrita en la **Sección 3.7.1.a**.

#### 3.12.1.b. Acidez total y pH

La acidez total y el pH se determinaron sobre el ingrediente PL según los métodos detallados en la **Sección 3.2.2**. Para ellos, el polvo se reconstituyó previamente disolviendo 0,55 g de polvo en 2,5 mL de agua destilada.

#### 3.12.1.c. Color

El color se determinó siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 3.7.1.e**.

#### 3.12.1.d. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se obtuvieron imágenes SEM del polvo PL y de las galletitas con un microscopio Zeiss Supra 40 (Oberkochen, Alemania). Las muestras se ubicaron en soportes de aluminio, aseguradas con cinta bifaz de carbono conductor, y se recubrieron con nanopartículas de oro. Las imágenes se tomaron a aumentos de 1000, 2000 y 5000x, con el detector incluido en el lente usando un voltaje de aceleración de 3,00 kV.

### 3.12.2. Análisis de propiedades funcionales

#### 3.12.2.a. Contenido de fibra

Los contenidos de fibra dietaria total (FDT) y de fibra dietaria insoluble (FDI) se determinaron según el método AOAC para fibra dietaria en alimentos (AOAC, 991.43 y 985.29, 2006) con ligeras modificaciones. Las galletitas se molieron manualmente antes de la determinación. 50 mL de buffer fosfato de pH 6,0 se agregaron a 1,0 g de muestra. Se realizó un tratamiento de 15 minutos con  $\alpha$ -amilasa termoestable en un baño a ebullición. Luego las muestras se trataron enzimáticamente, primero con proteasa y después con amiloglucosidasa a 60 °C por 30 minutos cada una, con agitación constante en una cámara termostatazada (Orbital Shaker Incubator TOU-120). Para la FDT, se agregaron cuatro volúmenes de etanol 95% previamente calentado a 60 °C y las suspensiones se dejaron en reposo por 60 minutos. A continuación, el residuo se filtró en un equipo Raw Fiber Extractor V230, VELP SCIENTIFIC (Europa) y se lavó con etanol 78%, etanol 95% y acetona, realizando dos lavados con cada solvente. Para la determinación de FDI se evitó el paso de reposo y el residuo se lavó con agua destilada, etanol 95% y acetona, realizando dos lavados con cada solvente. Luego de los lavados, el residuo remanente se secó en una estufa Ionomex MCH (Bs As, Argentina) a 105 °C hasta peso constante y se registró la masa ( $m_{\text{residuo}}$ ). A continuación, se determinó el contenido de cenizas sobre el mismo residuo ( $m_{\text{cenizas}}$ ) y el porcentaje de FDT y FDI se calculó como la diferencia entre ( $m_{\text{residuo}}$ ) y ( $m_{\text{cenizas}}$ ).

#### 3.12.2.b. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante

En el caso de las muestras de PL, las determinaciones se realizaron sobre las muestras reconstituidas disolviendo 0,55 g de polvo en 2,5 mL de agua destilada. Las galletitas, se molieron manualmente con un mortero. Las mediciones se realizaron sobre las galletitas molidas y el polvo PL disuelto, usando los métodos descriptos en la **Sección 3.2.3**, empleando la extracción con alcohol acidificado para las determinaciones tanto del CPT, la AA y las AMT debido a inconvenientes de disolución de la galletita en la solución metanólica.

### 3.12.3. Composición centesimal

#### 3.12.3.a. Contenido de proteína bruta

Se determinó el contenido de nitrógeno total y proteína bruta por el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning (A.O.A.C., 928.08, 2000). Se pesaron entre 1,8 y 2,0 g de muestra (polvo PL o galletita molida) en un trozo de papel satinado. Se envolvió la muestra y se introdujo en un tubo de digestión de Kjeldahl. Se agregaron 12 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,6 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se procedió a la digestión de la muestra en un digestor J.P. Selecta (Barcelona, España).

Una vez completada la digestión se agregaron 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada para disolver el digerido. Por otro lado, se colocaron 50 mL de solución saturada de ácido bórico en un erlemeyer de 500 mL, se agregaron unas gotas de indicador combinado (aproximadamente 0,15 mL) y se realizó la destilación en un equipo de destilación J.P. Selecta (Barcelona, España).

El destilado finalmente se tituló con HCl 0,1 N valorado y el contenido de nitrógeno total y de proteína bruta se calculó según las **ecuaciones 3.10 y 3.11**.

$$\% N = \frac{(V \times N \times f)_{\text{ácido}} \times P_{\text{eqN}} \times 100}{m_M \times 1000} \quad \text{Ec. 3.10.}$$

$$\% \text{ proteína} = \% N \times f_p \times 1000 \times m_M \quad \text{Ec. 3.11}$$

Donde V es el volumen de titulante consumido, N es la normalidad del mismo, f el factor de corrección, P<sub>eqN</sub> es el peso equivalente del nitrógeno, f<sub>p</sub>: factor de conversión de nitrógeno a proteína (valor usado: 6,25) y m<sub>M</sub> es la masa de muestra (g). El contenido de proteína se expresó como porcentaje en base seca.

#### 3.12.3.b. Contenido de lípidos

El contenido de lípidos de las galletitas y el residuo en polvo se determinó por el método directo por extracción con solvente orgánico (grasa bruta) (AOAC, 960.39, 2000). Se pesaron 3,0 g del polvo PL o de galletita molida y se colocaron en un cartucho

de celulosa. Se cubrió la muestra con un trozo de algodón y se introdujo en el cuerpo de un extractor soxhlet. Por otro lado, se colocaron 2 ó 3 piedras pómez en un balón y se cargó el cuerpo del extractor una vez y media con cloruro de metileno. Se llevó a reflujo durante 4 h y una vez finalizada la extracción se evaporó el solvente en rotavap Laborota 4000 – efficient (Heidolph, Schwabach, Alemania). Se trasvasó el extracto a un erlenmeyer y se terminó de evaporar el solvente en plancha calefactora. Se dejó enfriar y se pesó el extracto obtenido. El contenido de grasa se expresó como porcentaje en base seca.

#### 3.12.3.c. Cenizas

El contenido de cenizas se determinó siguiendo el método directo A.O.A.C., 923.03, (2000). 1,0 g de polvo o de galletita molida se dispuso en cápsulas de porcelana y se incineraron en una mufla, Mufla N°275, ESTIGIA® (La Plata, Argentina). El residuo remanente luego de la incineración se pesó y el contenido de cenizas se informó como porcentaje en base seca.

#### 3.12.3.d. Minerales

Se determinó el contenido de Na, K y Ca mediante fotometría de llama usando un equipo ZF250, ZZELTEC® (Buenos Aires, Argentina). El residuo carbonizado obtenido luego de la determinación de cenizas se disolvió en 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y se completó un volumen de 25 mL con agua destilada. Se tomaron alícuotas de 5 mL de esta solución para la determinación y se prepararon soluciones de trabajo de cada mineral: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,01 mg/mL), KCl (0,01 mg/mL) y CaCO<sub>3</sub> (0,40 mg/mL). A partir de la emisión de cada mineral se calculó su concentración. El contenido de cada mineral se informó en mg cada 100 g de base seca (mg/100 g b.s.).

### 3.12.4. Caracterización adicional de las galletitas

#### 3.12.4.a. Dimensiones

El diámetro y espesor de las galletitas se midieron con un calibre. Se promediaron los resultados de tres mediciones por cada triplicado de muestras.

#### 3.12.4.b. Presencia de gluten

Para verificar que el producto cumpliera con el requisito de un alimento libre de gluten, se sometió la galletita adicionada con el polvo de grosella negra a un ensayo inmunoenzimático ELISA con un kit Ridascreen Gliadin r-Biopharm (Alemania). El mismo resuelve si se detecta o no gluten con un límite de detección de 1 mg/kg.

#### 3.12.4.c. Análisis de textura

##### Propiedades mecánicas (análisis instrumental)

Se evaluó el comportamiento mecánico de las galletitas utilizando una máquina universal de testeo Instron 3342 (Instron Corporation, Massachusetts, Estados Unidos) conectada por medio de una computadora al software Instron Bluehill Material Testing Software. Se obtuvieron curvas de fuerza-distancia mediante un ensayo de punción. Se utilizó una punta de penetración de 3 mm de diámetro de punta roma que simula la fuerza ejercida por un molar, y la prueba finalizó cada vez que la muestra era completamente atravesada. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron: velocidad de cabezal: 0,5 mm/s; intervalo de tiempo (captura de datos): 100 ms; rango de carga: 500 N. Como el área de contacto de la punta con la muestra fue la misma en todos los casos, por cuestiones prácticas y a modo comparativo en lo que respecta a esta tesis, se utilizó directamente el valor de F sin corregir por el área.

A partir de las curvas de fuerza-distancia se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Fuerza máxima ( $F_{\text{máx}}$ ), que indica la fuerza máxima requerida para atravesar la muestra y se relaciona con la resistencia del producto a la fractura o a su firmeza.



- Distancia correspondiente a la fuerza máxima ( $\Delta F_{\text{máx}}$ ), que indica la deformación que experimenta la muestra antes de ser atravesada por la punta y se relaciona con su fragilidad.
- Energía o Trabajo (W), deducida del área bajo la curva fuerza-distancia hasta el pico máximo, es la energía de deformación liberada por unidad de área de fractura del material y está relacionada con la dureza del material.

### Textura por análisis de imagen

#### *Adquisición de las imágenes por cámara digital*

Las muestras de galletita se ubicaron en una recámara pintada de color gris estándar para la toma de imágenes y se iluminaron con una fuente estandarizada de luz D65. La posición de la muestra fue de 45° respecto a la fuente de luz y la posición de la cámara se mantuvo a una distancia constante, de frente a las muestras. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital (CDC) Canon EOS 40D (Japón) con un lente EFS 60 mm f/2.8 Macro USM (Taiwan). Se tomaron fotografías tanto del frente como del dorso de las muestras control y de las adicionadas con grosella negra y se observó que las imágenes del dorso representaban mejor la textura interior de las muestras. Por consiguiente, se decidió utilizar estas fotografías para realizar el análisis.

#### *Adquisición de imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Se montaron pequeños trozos de galletita en un soporte de aluminio y se analizaron por SEM siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 3.12.1.d**. Las muestras de galletita se observaron con aumentos de 1000, 2000 y 5000x.

#### *Análisis de textura usando la matriz de co-ocurrencia de grises (GLCM)*

La textura de una imagen se puede entender como los cambios en la dispersión de la luz debida a diferencias en la estructura de la superficie de un objeto (Russ, 2005). En el método de la matriz de co-ocurrencia de grises, la textura de una imagen corresponde a la organización espacial de los píxeles de la misma. Las imágenes obtenidas tanto con la cámara digital como por SEM se almacenaron como *bitmaps* en una escala de grises con un rango de luminosidad entre 0 y 255 para cada píxel de la imagen. Para todos los análisis se tomó una región de interés de igual tamaño (122x122 píxeles). Los parámetros de imagen estudiados mediante el método de matriz de co-ocurrencia de grises (GLCM)

fueron energía (ASM), contraste (CON), correlación (COR), homogeneidad (HOM) y entropía (ENT); los cuales se estudiaron sobre las imágenes del dorso de las galletitas obtenidas con la cámara digital y sobre las imágenes obtenidas por SEM con los tres aumentos usados.

El parámetro ASM mide el orden o uniformidad de una imagen y se relaciona con la suavidad superficial (Ou y col., 2014; Pieniazek y col., 2018). Cuanto mayor es ASM más uniforme es la muestra. La característica CON mide la intensidad de contraste entre un píxel y su vecino, es decir, indica la variación local de la matriz o la nitidez de los contornos. Este parámetro se relaciona con la dureza de la muestra: cuanto mayor es el valor de CON la muestra presenta mayor dureza (Laddi y col., 2013). El parámetro COR indica cuánta correlación tiene un píxel respecto a su vecino. Varía entre -1 y +1, adoptando estos valores para imágenes con correlaciones perfectamente positivas o negativas. Es una medida de la probabilidad de que ocurran pares de píxeles. La propiedad ENT es una medida de la aleatoriedad de la textura. Muestra con qué frecuencia un píxel de un nivel de gris  $i$  aparece horizontalmente adyacente a otro píxel con un nivel de gris  $j$  (Karimi y col., 2012). El valor de ENT es alto cuando todas las entradas en la matriz  $p(i;j)$  tienen magnitudes similares y es bajo cuando estas son muy disímiles (Koc y col., 2008). Finalmente, HOM indica la uniformidad y suavidad de la imagen. Estos cinco parámetros se calcularon usando el software MATLAB 8.4 (TheMath Works, Inc., MA, E.E.U.U.) según Pieniazek y Messina (2018).

#### 3.12.4.d. Digestión *in vitro*

Se realizó un ensayo de digestión *in vitro* de las galletitas control y GN, en el cual las fases oral, gástrica e intestinal se simularon de acuerdo al método propuesto por Minekus y col. (2014) desarrollado en el marco del proyecto COST Action FA1005 INFOGEST. Las muestras se incubaron a 37 °C en una estufa Function Line 7000 (Heraeus, Hesse, Alemania), con agitación constante en un agitador orbital Vicking M-23 (Vicking, Buenos Aires, Argentina) a 100 rpm durante todo el experimento. El procedimiento seguido se detalla a continuación:

*Fase oral:* 5,0 g de muestra de galletita se molieron groseramente con un mortero y se mezclaron con 3,5 mL de una solución de fluido salivar simulado (FSS). Se agregaron

0,50 mL de una solución de  $\alpha$ -amilasa salivar (actividad 1500 U/ml), 25  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  0,3 M y 975  $\mu$ L de agua destilada; y se incubó durante 2 minutos.

*Fase gástrica:* Al bolo resultante de la fase oral se le agregaron 7,5 mL de una solución de fluido gástrico simulado (FGS), 1,6 mL de una solución de pepsina (25000 U/ml) y 5,0  $\mu$ L  $\text{CaCl}_2$  0,3 M. El sistema se llevó a pH 3,0 con HCl 1 M y luego se completó un volumen de 10 mL totales con agua destilada. Una vez alcanzado el pH y volumen deseados se incubó durante 2 horas.

*Fase intestinal:* el producto de la fase gástrica se mezcló con 11 mL de solución de fluido intestinal simulado (FIS), 5,0 mL de una solución de pancreatina (800 U/ml), 2,5 mL de una solución de sales biliares 160 mM y 40  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  0,3 M. El sistema se llevó a pH 7,0 con NaOH 0,1 M y luego se completó un volumen de 20 mL totales con agua destilada. Una vez alcanzado el pH y volumen deseados se incubó durante 2 horas.

Una vez cumplida la fase intestinal las muestras se llevaron a un baño de hielo para detener la actividad enzimática y se centrifugaron a 13.000 g (6000 rpm) y 4 °C durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5804 (Hamburgo, Alemania). El sobrenadante (fracción soluble) y el precipitado (fracción insoluble) se separaron. El sobrenadante se almacenó a -18 °C hasta su análisis, mientras que la fracción insoluble se congeló a -18°C durante 48 hs y se liofilizó utilizando las mismas condiciones mencionadas en la **Sección 3.5.3**.

#### *Determinación de la actividad antioxidante luego de la digestión*

La actividad antioxidante (AA) se midió en la fracción soluble (o bioaccesible) tal cual y en la fracción insoluble liofilizada provenientes de la digestión *in vitro*. Para la fracción soluble se empleó el método descrito en las **Secciones 3.2.3.a.** y **3.2.3.d.** usando etanol acidificado como solvente de extracción. Para la fracción insoluble se empleó el procedimiento QUENCHER descrito por Gökmen y col. (2009) con algunas modificaciones. A 1,0 mg de fracción liofilizada se le agregaron 10 mL de reactivo de ABTS<sup>+</sup>. Se mezcló en un vortex durante 4 minutos y se dejó reposar durante 30 min protegido de la luz. Luego de este tiempo se midió la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico en miligramos por 1 g de muestra en base seca.

#### 3.12.4.e. Análisis sensorial

Las galletitas control y adicionada con el polvo de grosella negra se sometieron a un análisis sensorial con consumidores en cabinas especialmente diseñadas según Meilgaard y col. (2006) en el laboratorio de análisis sensorial de la Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos. La **Figura 3.7** muestra una fotografía de las instalaciones usadas. Se encuestaron 95 consumidores de entre 7 y 70 años incluyendo estudiantes, empleados de la universidad y miembros de una asociación de personas celíacas (ACELA). Las galletitas control y GN se codificaron con un número de tres dígitos y se presentaron en platos blancos a los consumidores (**Figura 7.2 – Anexo**). En la **Figura 7.3 – Anexo** se muestra una de las personas del panel de consumidores evaluando una muestra.



**Figura 3.7.** Instalaciones del laboratorio de análisis sensorial de la Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos donde se condujo el análisis sensorial.

Se llevaron a cabo tres estudios: un test de intensidad de atributos, un test de nivel de satisfacción de atributos; y un test de satisfacción global (Lawless y Heymann, 2010; Watts y col., 1992). Los atributos evaluados fueron dureza, crocancia, fragilidad, aroma, sabor a chocolate y color. Para los ensayos de satisfacción (satisfacción de atributos y satisfacción global) se usó una escala hedónica de 7 puntos que iba desde “me gusta mucho” a “me disgusta mucho”; mientras que para los ensayos de intensidad de atributos se usó una escala de 5 puntos que iba desde “muy bajo” a “muy alto”. La nota de consentimiento informado que se les hizo firmar a los consumidores antes de participar del estudio se adjunta en el Anexo del presente trabajo (**Planilla 7.1 – Anexo**); así como la planilla que se les entregó para completar la encuesta (**Planilla 7.2 – Anexo**).

La población de consumidores se dividió en dos grupos según sus hábitos dietarios: uno formado por personas que consumían productos de panadería y repostería regulares (Grupo I) y otro por personas que solían consumir productos libres de gluten (Grupo II).

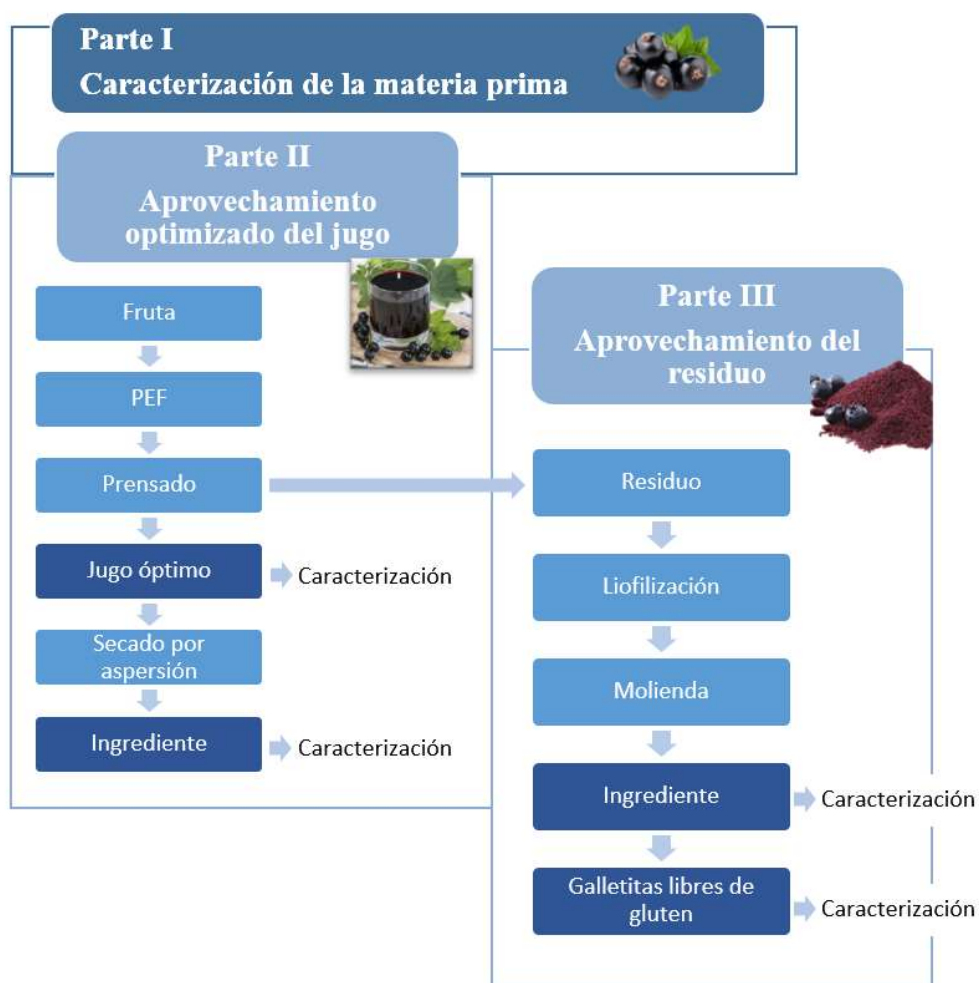
### **3.13. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico GraphPad Prism 6 (California, E.E.U.U., 2014). Se realizaron análisis ANOVA y test de Tukey sobre todos los resultados para determinar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como principal objetivo lograr un aprovechamiento integral de los frutos de grosella negra. Para ello se partió de la fruta congelada por tecnología IQF, la cual se caracterizó para conocer la materia prima de partida (Parte I). A continuación, se aplicó un método de extracción por prensado en frío asistido por la tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF) para optimizar el aprovechamiento del jugo, el cual luego se deshidrató por secado por aspersión para obtener un polvo (Parte II). Por otro lado, se propuso un uso del residuo remanente luego del prensado para generar un ingrediente que actuara como fuente de compuestos bioactivos y fibra, para incorporar en galletitas libres de gluten (Parte III). La **Figura 4.1** sintetiza el esquema de organización de esta tesis.



**Figura 4.1.** Esquema de organización de la presente tesis.

## PARTE I: Caracterización de la materia prima

### 4.1. Caracterización de los frutos de grosella negra congelados

Existe vasta bibliografía acerca de la caracterización de distintas *berries*, entre ellas la grosella negra. Sin embargo, en la misma se evidencia la gran variabilidad que existe en las características fisicoquímicas de los frutos dependiendo de la variedad estudiada, así como de factores ambientales, prácticas de cultivo, estado de madurez y época de cosecha. Por este motivo, en una primera instancia se procedió a la caracterización fisicoquímica de los frutos de grosella negra (*Ribes nigrum*, var. Titania) que se emplearon a lo largo de todo el trabajo experimental. En la **Tabla 4.1** se muestran los resultados de esta caracterización.

**Tabla 4.1.** Caracterización fisicoquímica de la grosella negra congelada.

Propiedad	Resultado
Contenido de agua (g H <sub>2</sub> O/100g fruta)	78 ± 2
Sólidos solubles (°Brix a 20 °C)	16,6 ± 0,4
Acidez total (mg ácido cítrico/100g fruta)	2,83 ± 0,04
pH	3,11 ± 0,04
AMT (mg cian-3-glu/g fruta)	2,42 ± 0,03
CPT (mg EAG/g fruta)	4,3 ± 0,2
AA (mg EAG/g fruta)	2,47 ± 0,05

Valores expresados como la media ± desviación estándar.

Los resultados de contenido de agua, sólidos solubles, acidez y pH se correspondieron con los hallados por Archaina y col. (2018) para la misma variedad de fruta proveniente del mismo productor, mientras que los contenidos de AMT y CPT encontrados en este lote de fruta fueron superiores a los informados en ese trabajo (1,70 mg cian-3-glu/g fruta y 2,88 mg EAG/g fruta, respectivamente). Los resultados de este trabajo estuvieron dentro de los rangos publicados por varios autores para distintas variedades de grosella negra. Rubinskiene y col. (2005) estudiaron la composición química de nueve variedades diferentes y encontraron rangos de sólidos solubles totales entre 14,0 - 16,1 °Brix y



valores de acidez total entre 2,30 - 3,15 mg de ácido cítrico/100 g. Por otro lado, Nour y col. (2011) caracterizaron ocho variedades de grosella negra e informaron valores de contenido de agua entre 76,8 y 82,1%, sólidos solubles entre 14,0 - 15,6 °Brix, acidez total entre 1,19 - 1,65 mg de ácido cítrico/100 g y AMT entre 1,16 y 2,87 mg cian-3-glu/g fruta. Djordjevic y col. (2013) informaron contenidos de sólidos solubles totales entre 12,3 y 18,2 °Brix para distintas variedades de grosella negra (13,3 °Brix para frutos de la variedad Titania) reportando valores de CPT entre 1,37 y 2,78 mg EAG/g de fruta (1,37 mg EAG/g de fruta para frutos de la variedad Titania) y contenidos de AMT entre 0,27 y 1,35 mg cian-3-glu/g de fruta (0,53 mg cian-3-glu/g de fruta para frutos de la variedad Titania).

## **PARTE II: Aprovechamiento optimizado del jugo de grosella negra**

### **4.2. Estudio y optimización de la extracción asistida por campo eléctrico pulsado (PEF)**

La aplicación de PEF sobre las frutas de grosella negra requirió de estudios preliminares. En primer lugar se buscó establecer la intensidad de campo eléctrico máxima que podría aplicarse al sistema sin la ocurrencia de descargas eléctricas ni corte eléctrico en el equipo empleado. Estos estudios dieron como resultado un valor de campo eléctrico máximo de 1950 V/cm. Una vez determinado este valor, se decidió evaluar el efecto de la aplicación de PEF sobre la extracción de compuestos polifenólicos de las frutas. Para ello se realizaron ensayos aplicando un campo eléctrico mínimo (650 V/cm), uno de intensidad intermedia (1100 V/cm) y otro a la intensidad máxima establecida (1950 V/cm). Se halló que ocurría un aumento del contenido de polifenoles totales en los extractos al aumentar el campo eléctrico de 650 a 1100 V/cm, pero al incrementarlo hasta 1950 V/cm se observaba una disminución del CPT. En base a estos primeros resultados, se realizó un diseño experimental con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de tratamiento PEF (intensidad del campo eléctrico y número de pulsos) para maximizar la extracción de compuestos bioactivos. En la **Tabla 4.2** se muestran los 24 experimentos realizados según el diseño aplicado (**Sección 3.4.2**) con sus respectivos resultados para las variables dependientes CPT y AA.

**Tabla 4.2.** Diseño experimental empleado para la optimización del tratamiento PEF y resultados obtenidos para el contenido de polifenoles totales (CPT) y la actividad antioxidante (AA).

Número de tratamiento	Factores		Respuestas	
	Campo eléctrico (V/cm)	Número de pulsos	CPT (mg EAG/g jugo)	AA (mg EAG/g jugo)
1	0	50	3,2 ± 0,3	1,6 ± 0,1
2	0	275	3,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1
3	0	500	3,27 ± 0,07	1,29 ± 0,01
4	650	50	3,4 ± 0,2	1,40 ± 0,04
5	650	275	3,85 ± 0,08	1,6 ± 0,1
6	650	500	3,6 ± 0,3	1,59 ± 0,03
7	1300	50	4,1 ± 0,4	1,7 ± 0,1
8	1300	275	4,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2
9	1300	500	4,0 ± 0,3	1,8 ± 0,2
10	1950	50	3,7 ± 0,2	1,63 ± 0,06
11	1950	275	3,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2
12	1950	500	3,6 ± 0,3	1,6 ± 0,2
13	0	50	3,12 ± 0,08	1,66 ± 0,06
14	0	275	3,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1
15	0	500	3,3 ± 0,3	1,69 ± 0,05
16	650	50	3,40 ± 0,08	1,65 ± 0,07
17	650	275	3,36 ± 0,07	1,8 ± 0,1
18	650	500	3,35 ± 0,04	1,72 ± 0,09
19	1300	50	3,71 ± 0,09	1,81 ± 0,05
20	1300	275	3,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1
21	1300	500	3,7 ± 0,2	1,83 ± 0,03
22	1950	50	2,98 ± 0,01	1,65 ± 0,08
23	1950	275	3,51 ± 0,09	1,78 ± 0,08
24	1950	500	3,1 ± 0,9	1,8 ± 0,1

Valores expresados como la media ± desviación estándar.

El análisis estadístico mostró que ambos factores experimentales (intensidad de campo eléctrico y número de pulsos) presentaron un efecto positivo significativo sobre las respuestas ( $p < 0,05$ ), observándose una mayor influencia de la intensidad del campo

eléctrico en comparación con el factor número de pulsos. Se ajustó un modelo cúbico a los datos experimentales y se obtuvieron las siguientes ecuaciones para CPT (**Ecuación 4.1**) y AA (**Ecuación 4.2**):

$$y = 3,81 + 0,74X_1 + 0,008181X_2 - 0,035X_1X_2 - 0,42X_1^2 - 0,11X_2^2 + 0,024X_1^2X_2 - 0,16X_1X_2^2 - 0,50X_1^3 \quad \text{Ec. 4.1.}$$

$$y = 1,75 + 0,35X_1 + 0,053X_2 + 0,042X_1X_2 - 0,12X_1^2 - 0,025X_2^2 - 0,067X_1^2X_2 - 0,064X_1X_2^2 - 0,23X_1^3 \quad \text{Ec. 4.2.}$$

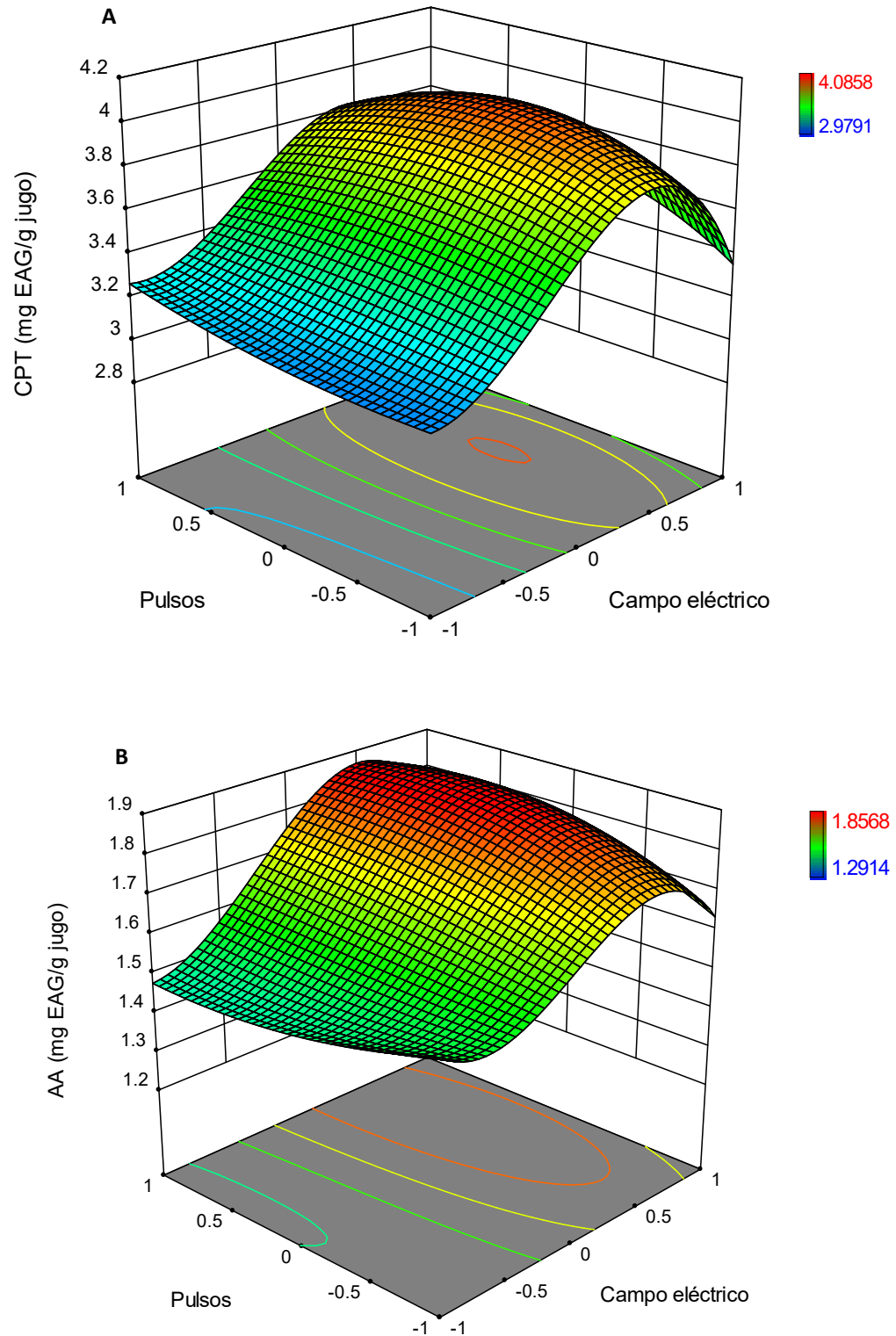
Donde  $X_1$ = campo eléctrico y  $X_2$ = número de pulsos.

Los análisis estadísticos realizados para evaluar la bondad del ajuste mostraron que los modelos propuestos permitieron describir adecuadamente ( $p < 0,05$ ) la relación entre los factores analizados y las variables de respuesta dado que el test de falta de ajuste arrojó resultados no significativos y se obtuvieron valores de  $R^2$  de 0,818 para el CPT y de 0,724 para la AA. Los coeficientes de regresión estimados permiten corroborar lo observado anteriormente, siendo los coeficientes correspondientes a los efectos principales asociados al campo eléctrico mayores que los asociados al número de pulsos para ambas respuestas. El CPT mostró ser más influido por el campo eléctrico que la AA, mientras que el número de pulsos influyó en la AA y no fue significativo para el CPT. En cuanto al efecto de la interacción de factores se pudo observar que la interacción cuadrática del campo eléctrico tuvo un efecto negativo significativo sobre ambas respuestas, mientras que la interacción de mismo orden del número de pulsos no fue significativa en ninguno de los casos. Las interacciones de primer orden entre ambos parámetros no fueron significativas mientras que las interacciones cuadráticas de ambos parámetros mostraron efectos negativos sobre ambas respuestas, aunque este efecto no fue significativo sobre la AA. Por último, la interacción cúbica del campo eléctrico también mostró tener un efecto negativo sobre ambas respuestas, mientras que este grado de interacción para el número de pulsos fue nulo.

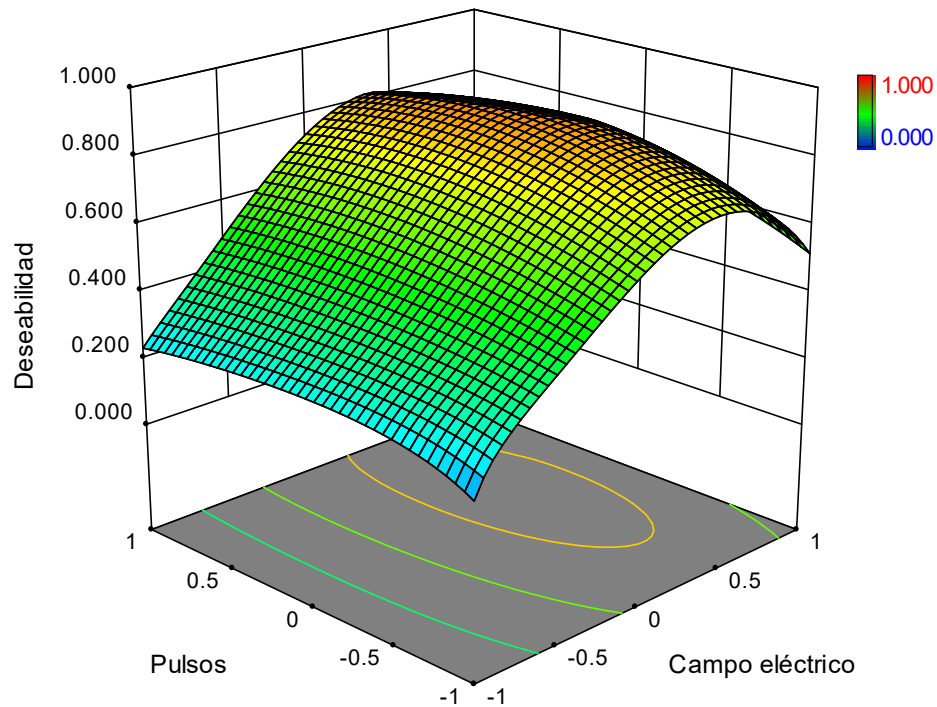
La **Figura 4.2** muestra la superficie de respuesta y el gráfico de contornos obtenidos para el CPT (**Figura 4.2 A**) y la AA (**Figura 4.2 B**) en función del campo eléctrico y el número de pulsos. Se observó un aumento de ambas variables independientes con el

aumento del campo eléctrico hasta 1300 V/cm. Este comportamiento sugiere una mayor liberación de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante al aumentar la permeabilidad de las membranas celulares de los tejidos durante la aplicación del tratamiento (Pataro y col., 2017 a; Pataro y col., 2017 b; Bobinaitė y col., 2015; Luengo y col., 2013). En cambio, a valores superiores a 1300 V/cm, tanto los valores del CPT como de la AA disminuyeron, posiblemente como consecuencia de una degradación de los compuestos bioactivos. Otros autores también observaron que niveles altos de campo eléctrico pueden causar deterioro y degradación de compuestos de interés durante los tratamientos PEF (Mahnič-Kalamiza y col., 2014). Bobinaitė y col. (2015) informaron una leve disminución de los valores, tanto del CPT como de la AA en jugo de arándanos al aplicar un tratamiento PEF de 5000 V/cm y 10 kJ/kg.

La **Figura 4.3** muestra la superficie de respuesta y el gráfico de contornos de la función deseabilidad en función del campo eléctrico y el número de pulsos. La función deseabilidad alcanzó un valor de 0,869, lo cual indica que se logró una buena maximización de las variables respuesta. Las condiciones de tratamiento óptimas sugeridas por el diseño fueron una intensidad de campo eléctrico de 1318 V/cm y 315 pulsos, las cuales permitirían obtener extractos con valores de CPT de 3,8 y AA de 1,8 mg EAG/g según las predicciones del modelo. Con el propósito de verificar la capacidad y precisión de la predicción del modelo, tres nuevas muestras se trataron bajo las condiciones óptimas predichas por el mismo. Los valores experimentales obtenidos en estos nuevos extractos fueron consistentes con los predichos, alcanzándose valores de CPT de  $3,8 \pm 0,2$  mg EAG/g y de AA de  $1,88 \pm 0,06$  mg EAG/g (**Tabla 4.3**). Bajo estas condiciones óptimas de operación se lograron incrementos de 19% y 45% para el CPT y la AA, respectivamente, en relación a un control no sometido a un tratamiento de pulsos eléctricos.



**Figura 4.2.** Superficies de respuesta y gráficos de contornos para el CPT (A) y la AA (B) en función del campo eléctrico y el número de pulsos. Rango de intensidad de campo eléctrico de 0 (codificado como nivel -1) a 1950 V/cm (codificado como nivel 1), y de número de pulsos de 50 (codificado como nivel -1) a 500 (codificado como nivel 1).



**Figura 4.3.** Superficie de respuesta y gráfico de contornos de la deseabilidad en función del campo eléctrico y el número de pulsos, obtenidos por el procedimiento de optimización de múltiples respuestas. Rango de intensidad de campo eléctrico de 0 (codificado como nivel -1) a 1950 V/cm (codificado como nivel 1), y de número de pulsos de 50 (codificado como nivel -1) a 500 (codificado como nivel 1).

La energía total recibida por la muestra puede ser un parámetro útil para describir la severidad del tratamiento aplicado, dado que la corriente que circula efectivamente por el material puede variar debido a la composición, la cantidad de líquido o incluso la disposición del mismo en la cubeta de electroporación. Debido a esto, los datos de intensidad de campo eléctrico y número de pulsos pueden no aportar suficiente información para describir el tratamiento aplicado. Por este motivo, la corriente circulante se midió durante todo el tratamiento (**Figura 4.4** y **Figura 7.4 - Anexo**) y con esa información se calculó la energía total recibida por la muestra, que está descrita por la **Ecuación 4.3**. La energía que recibió la muestra en las condiciones óptimas fue de  $30 \pm 2$  kJ/kg.

$$\text{Energía específica} = \frac{E \times J \times a \times N \times t \times np}{m_{\text{muestra}}} \quad \text{Ec. 4.3}$$

Donde:

E = campo eléctrico (V/cm)

J = densidad de corriente (A/cm)

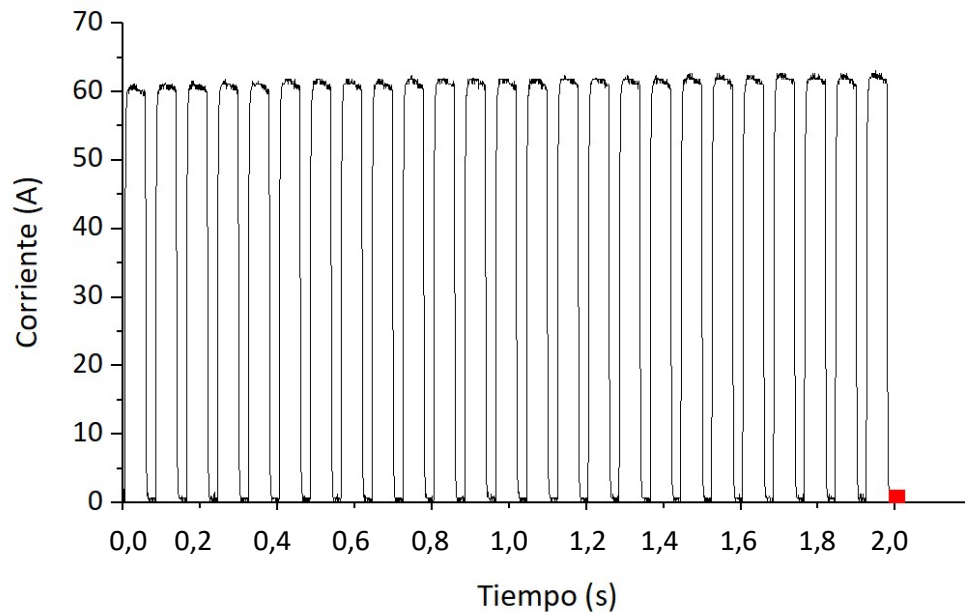
a = área de un electrodo (cm<sup>2</sup>)

N = número de electrodos

t = duración de un pulso (s)

np = número de pulsos aplicados

m<sub>muestra</sub> = masa de muestra (kg)



**Figura 4.4.** Corriente registrada durante la aplicación de los pulsos eléctricos del tratamiento óptimo. Se muestra el registro correspondiente a un tren de 25 pulsos a modo de ejemplo.

El tratamiento con campo eléctrico pulsado ha demostrado tener efectos positivos para la extracción de compuestos bioactivos de diversas fuentes vegetales. Aun así, los trabajos sobre optimización de extracción de compuestos bioactivos mediante PEF a partir de matrices vegetales son escasos. Sumado a esto, la comparación entre tratamientos PEF aplicados por diferentes autores se torna muy complicada debido a diferencias en las



condiciones de tratamiento, en la preparación de la muestra, el diseño de los electrodos y la falta de información sobre los procedimientos experimentales. Donsi y col. (2010) mostraron que un tratamiento PEF de 20 kJ/kg (aplicado con un campo de 3 kV/cm) sobre cáscara de uvas obtenida luego de la maceración para la producción de vino permitió un aumento de 25 % en la AA (determinado por el método ABTS<sup>+</sup>). Bobinaité y col. (2015) estudiaron un tratamiento con campo eléctrico para la producción de jugos y extracción de compuestos de arándanos y observaron un incremento del 36 % en la AA (método FRAP) al aplicar una energía de 10 kJ/kg (campo de 3 kV/cm). Pataro y col. (2017 b) también utilizaron un tratamiento de 10 kJ/kg (aplicando un campo de 1 kV/cm) sobre cerezas dulces alcanzando un aumento de 27 % en la AA (método FRAP). En este trabajo de tesis, aplicando un tratamiento de  $30 \pm 2$  kJ/kg (condiciones óptimas de tratamiento) se logró una buena performance del tratamiento PEF alcanzando un incremento de 45% en la AA (ver **Tabla 4.3** del siguiente apartado).

#### **4.2.1. Caracterización del extracto óptimo**

El extracto obtenido bajo las condiciones óptimas de tratamiento (1318 V/cm y 315 pulsos) se analizó en cuanto a su contenido de sólidos solubles, acidez, pH y contenido de antocianinas monoméricas totales, además del contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante. Los resultados de estas determinaciones en relación a un control obtenido siguiendo el mismo procedimiento pero sin la aplicación de los pulsos eléctricos, se presentan en la **Tabla 4.3**.

La muestra sometida al tratamiento PEF presentó una acidez significativamente más alta y un pH más bajo que el control, sugiriendo un mayor pasaje de compuestos ácidos desde la pulpa de la fruta hacia el extracto. Respecto a los compuestos bioactivos, la extracción de antocianinas aumentó ligeramente, además del aumento ya mencionado en el contenido de polifenoles totales y de la actividad antioxidante. Como se explicó anteriormente, el tratamiento de electroporación aumenta la permeabilidad de las membranas celulares, lo cual se traduce en un aumento de la difusividad de moléculas de mayor tamaño que pueden no ser fácilmente extraíbles. Numerosos estudios han demostrado que el tratamiento PEF aplicado antes o durante el prensado en frío permite una mayor recuperación de los compuestos de interés en los extractos obtenidos, incluso a temperaturas bajas (Grimi y col., 2011; Bobinaité y col., 2015; Carbonell-Capella y col.,

2016; Pataro y col., 2017 a). El elevado porcentaje de aumento observado para la AA y el CPT entre la muestra control y la tratada, aún a porcentajes menores de aumento de AMT puede deberse a varios factores. El tratamiento de electroporación puede inducir la ocurrencia de reacciones que involucran la disociación de antocianinas y la formación de ácidos fenólicos. Además, puede provocar cambios en las membranas celulares y en la disociación de complejos formados entre fenoles y componentes de la membrana, facilitando su liberación y por ende, aumentando el CPT (Barba y col., 2015 a). Por otro lado, la corrosión de los materiales de los electrodos y las reacciones electroquímicas locales inducidas por la corriente eléctrica en las cercanías de los mismos pueden provocar la copigmentación de antocianinas (siendo estas no detectadas por el método de pH diferencial usado para su cuantificación) e incluso la formación de complejos de copigmentación con iones metálicos, los cuales parecen presentar mayor capacidad antioxidante que sus antocianinas originarias (Sun y col., 2011). También se debe considerar que el fenómeno de copigmentación puede provocar desviaciones no lineales de la ley de Labert-Beer (Kammerer, 2016).

**Tabla 4.3.** Caracterización del extracto obtenido bajo las condiciones óptimas de tratamiento PEF (1318 V/cm y 315 pulsos) y de un control.

	<b>Control</b>	<b>PEF óptimo</b>
Sólidos solubles totales (°Brix a 25 °C)	13,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,3 ± 0,7 <sup>a</sup>
pH	3,14 ± 0,04 <sup>b</sup>	2,88 ± 0,05 <sup>a</sup>
Acidez total (mg ácido cítrico/100 g extracto)	2,41 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,01 <sup>b</sup>
CPT (mg EAG/g extracto)	3,18 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>b</sup>
AA (mg EAG/g extracto)	1,296 ± 0,007 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,06 <sup>b</sup>
AMT (mg cian-3-glu/g extracto)	1,301 ± 0,008 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,02 <sup>b</sup>

Valores expresados como la media ± desviación estándar.

Distintas letras minúsculas dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Debido al mecanismo de acción del proceso de electroporación, cabría suponer que los efectos observados en este trabajo sobre la extracción habrían sido aún más notorios de haberse trabajado con fruta fresca en lugar de congelada. Aunque la fruta se obtuvo congelada por la tecnología IQF y se observó al microscopio que la mayoría de sus células

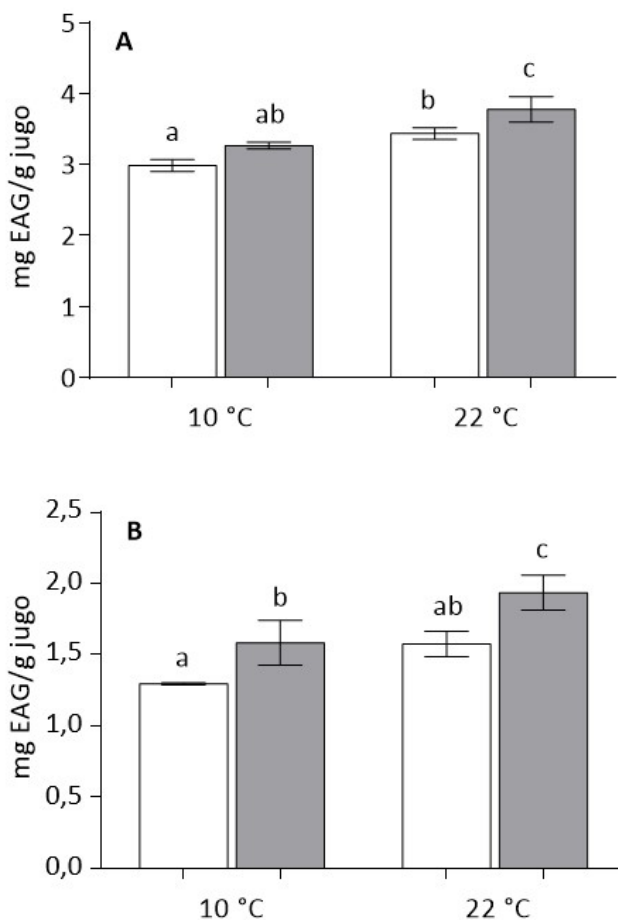
permanecían íntegras al momento de aplicar el tratamiento, éstas no se encontraban en perfecto estado, por lo cual el jugo usado como control provenía de frutas con una membrana ya parcialmente debilitada y como consecuencia, el efecto de la electroporación puede haber sido menos apreciable que si se hubiese trabajado con fruta intacta. Si bien el efecto de la electroporación sería más eficiente sobre fruta fresca, la fruta empleada como materia prima en esta tesis posee una vida útil muy corta y por ello no está disponible en fresco en el mercado local para consumo directo, e incluso la industria la obtiene exclusivamente en forma congelada para su procesamiento.

#### **4.2.2. Efecto de la temperatura en el tratamiento PEF**

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la temperatura de trabajo al aplicar el procesamiento PEF, considerando las propiedades funcionales y la corriente eléctrica. Se realizaron experimentos a dos temperaturas iniciales diferentes: uno a 10 °C y otro a 22 °C. Además, se hizo un control a cada temperatura, siguiendo el mismo procedimiento pero sin la aplicación de los pulsos eléctricos.

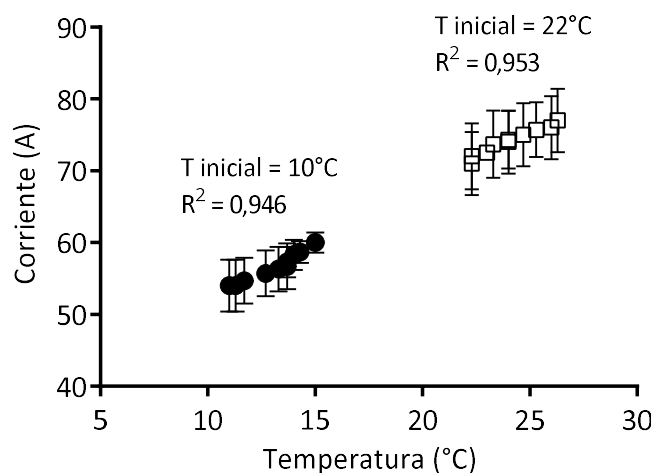
Con respecto a las propiedades funcionales, los valores de CPT y AA obtenidos en estos experimentos se presentan en la **Figura 4.5**.

Al comparar los dos controles entre sí se encontró que un aumento de temperatura de 12 °C causó un incremento del 15% en la extracción de polifenoles totales (**Figura 4.5 A**) y un 21 % en la AA (**Figura 4.5 B**). Por otro lado, al comparar cada tratamiento con su respectivo control a la misma temperatura inicial, se observó un aumento de alrededor del 10 % para el CPT y de 23 % para la AA, poniéndose en evidencia el efecto directo de la aplicación del campo eléctrico junto con el aumento de la temperatura ocurrido como consecuencia del mismo.



**Figura 4.5.** CPT (A) y AA (B) de los extractos obtenidos bajo las condiciones óptimas de tratamiento PEF (gris) y los controles correspondientes (blanco) a 10 y 22 °C. Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La **Figura 4.6** muestra la relación entre la corriente eléctrica y la temperatura durante los tratamientos PEF estudiados. La corriente inicial para los tratamientos a 10 y 22 °C fue  $54 \pm 4$  y  $71 \pm 4$  A, respectivamente. Como podía esperarse, la corriente fue más alta para el tratamiento a mayor temperatura. Además, durante ambos tratamientos se registró un aumento de hasta 5 °C, observándose una relación lineal entre la corriente eléctrica y la temperatura. Esta dependencia puede atribuirse al efecto Joule (Frey y col., 2017), según el cual, al circular una corriente eléctrica a través de un material, parte de la energía cinética de los electrones se transforma en calor como consecuencia de choques con las moléculas del mismo.

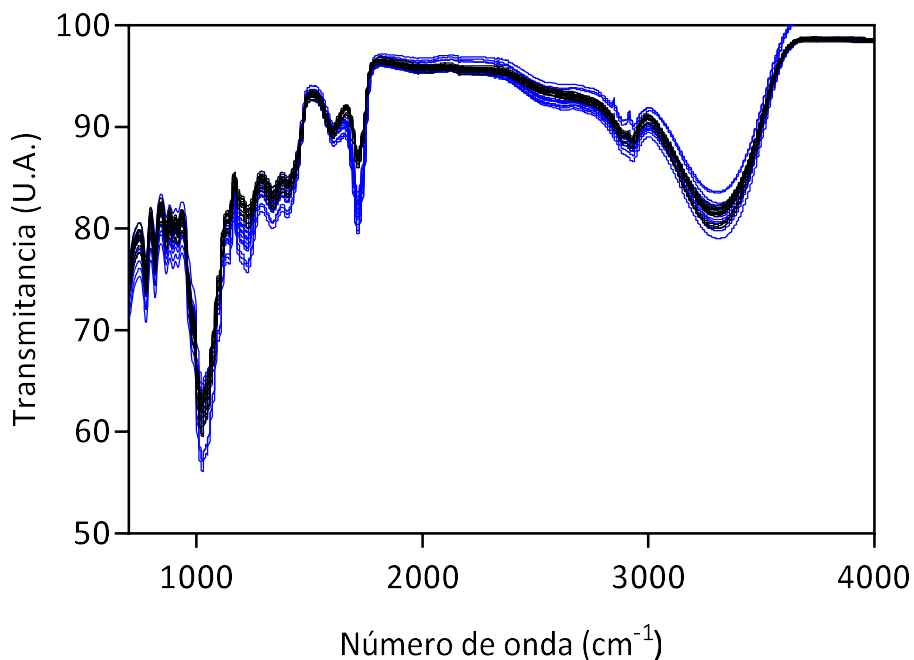


**Figura 4.6.** Corriente eléctrica en función de la temperatura en las condiciones óptimas de tratamiento. Círculos negros para experimentos a temperatura inicial = 10 °C; cuadrados blancos para experimentos a temperatura inicial = 22 °C.

En experimentos con remolacha, Frey y col. (2017) demostraron que a temperaturas por debajo de 7 °C existe una disminución significativa en la eficiencia de electroporación trabajando con campos eléctricos de 6 kV/cm. Estos autores afirman que un aumento en la temperatura de tratamiento conlleva un aumento en la conductividad de la muestra, generando un incremento proporcional en la corriente que circula por la misma durante la aplicación de los pulsos. Por consiguiente, es de esperar que haya mayores niveles de extracción cuando se trabaja a temperaturas más altas. Estos resultados destacan la importancia de controlar la temperatura cuando se aplican tratamientos PEF dado que su efecto es muy relevante en el resultado final. Sin embargo, según el tipo de producto con el que se trabaje, la elección de una temperatura de tratamiento baja debe considerarse para evitar crecimiento de microorganismos y minimizar los efectos adversos sobre la calidad del alimento debido a la posible pérdida de nutrientes, cambios de color y desarrollo de off-flavors (Ling y col., 2015).

### 4.2.3. Estudio del efecto del tratamiento PEF mediante técnicas de espectroscopía Raman y FT-IR

Para profundizar el estudio del efecto del tratamiento PEF sobre los compuestos presentes en las grosellas negras, se realizó un análisis empleando espectroscopía FT-IR y Raman, de manera de poder identificar cambios en zonas de los espectros características de los compuestos bioactivos propios de la fruta. Dado que el agua presenta importantes bandas de absorción en la región infrarroja del espectro electromagnético, los jugos de grosella negra se liofilizaron para eliminar la mayor cantidad posible de agua. En la **Figura 4.7** se muestran los espectros infrarrojos originales obtenidos para las muestras control y las muestras sometidas al tratamiento PEF óptimo.



**Figura 4.7.** Espectros infrarrojos para las muestras control (negro) y tratadas por PEF (azul).

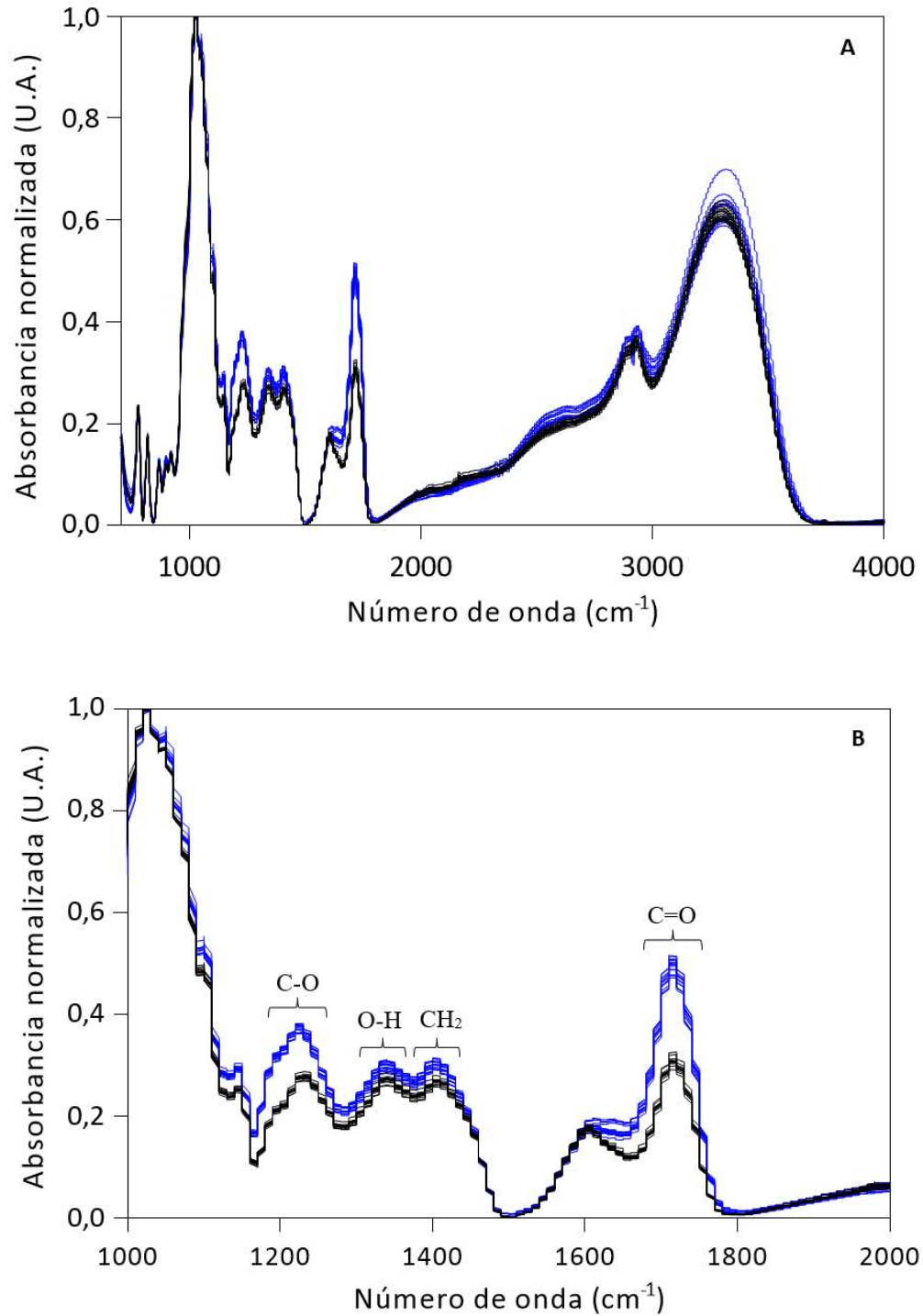
Para poder realizar un mejor análisis comparativo de los espectros, los mismos se sometieron a una corrección de línea de base y normalización (**Figura 4.8 A**). Los espectros obtenidos por FT-IR mostraron las mayores diferencias en la región comprendida entre 1150 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  entre las muestras control y las tratadas por PEF. En particular, se observó un aumento en la intensidad de la banda a 1719  $\text{cm}^{-1}$ , asignada por

otros autores al estiramiento del doble enlace C=O de ácidos fenólicos; de la banda a 1225  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a vibraciones de grupos C-O de ácidos orgánicos; y de las bandas a 1333 y 1410  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a grupos OH de antocianinas (la primera de estas dos observada en espectros FT-IR de cianidinas) y CH<sub>2</sub> de azúcares y ácidos (**Figura 4.8 B**) (Choong y col., 2019). Según Clark y col. (2018), una mayor intensidad de banda se correlaciona con una mayor concentración de los compuestos responsables de esa vibración, siguiendo la relación lineal de Lambert-Beer entre la absorbancia y la concentración. Por lo tanto, el aumento de la altura de estas bandas se podría asociar al aumento de la extracción de estos compuestos, en concordancia con el aumento observado previamente en el CPT, las AMT y la AA. Por otro lado, no se observaron corrimientos, apariciones o desapariciones de bandas, lo que sugiere que no ocurrieron modificaciones estructurales de estos compuestos como consecuencia del tratamiento de electroporación aplicado.

En la **Tabla 4.4** se resumen las principales bandas halladas en el espectro infrarrojo y la asignación correspondiente a cada una de acuerdo a datos bibliográficos (Clark y col., 2018; Namiesnik y col., 2014; Xu y col., 2018).

**Tabla 4.4.** Asignación de bandas de los espectros FT-IR del jugo liofilizado de grosella negra.

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Estructura molecular
1025	Plegamientos y estiramientos de grupos C-H del anillo aromático.
1225	Estiramiento de grupos C-O de ácidos orgánicos no ionizados
1333	Plegamientos de grupos O-H de antocianinas
1410	Tijereteo de grupos CH <sub>2</sub> de azúcares y ácidos
1595	Estiramiento asimétrico de grupos C-O de sales carboxílicas ionizadas
1719	Estiramiento del doble enlace C=O de ácidos fenólicos
2924	Vibraciones de grupos C-H
3290	Estiramiento de grupos O-H



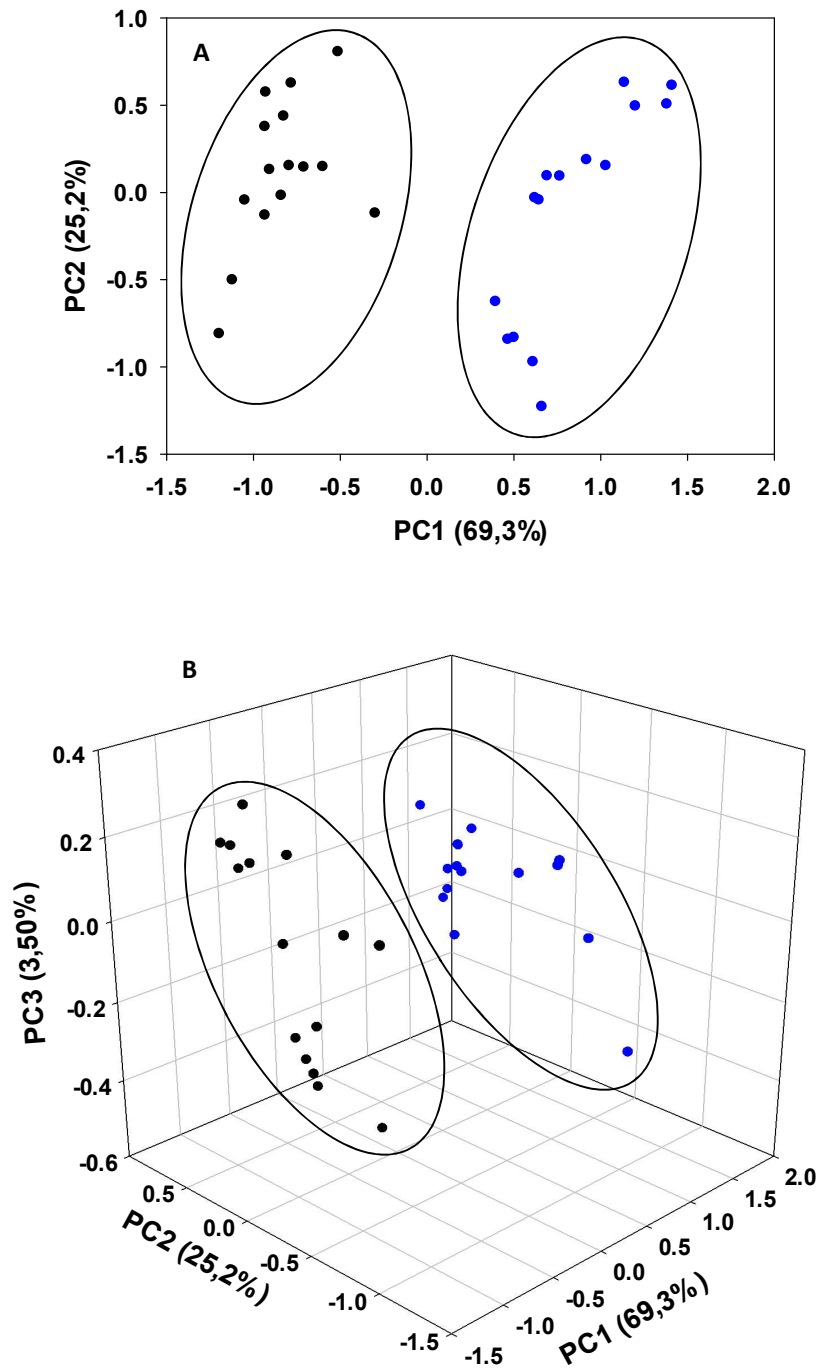
**Figura 4.8.** Espectros infrarrojos corregidos por línea de base y normalizados, para las muestras control (negro) y tratadas por PEF (azul). (A) Espectro completo, (B) Región donde se detectan los cambios principales entre las muestras.



Con los valores de la absorbancia normalizada obtenidos a lo largo de todo el espectro se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de clusters para estudiar si era posible distinguir las muestras sometidas al tratamiento PEF de las que no lo habían sido, únicamente mediante el análisis de los espectros FT-IR (**Figura 4.9**).

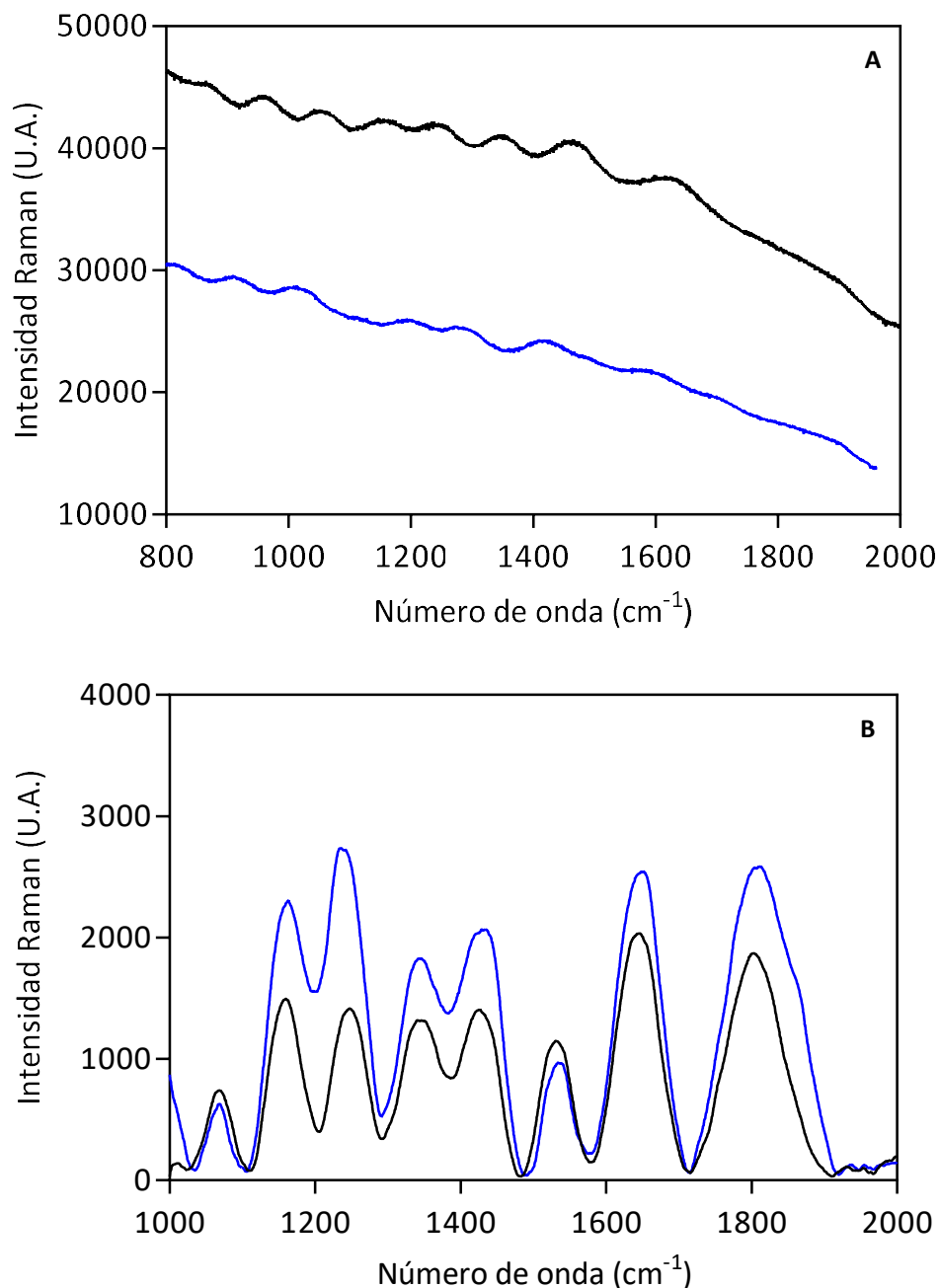
En general, no existe un criterio único para seleccionar el número de componentes principales (PCs) significativos del modelo en un ensayo exploratorio como el realizado en este trabajo. En algunos casos se considera suficiente un 80% de la varianza total explicada, mientras que en otros se busca alcanzar un 95%. Es decisión del autor, según el contexto y el objetivo del análisis, seleccionar de manera crítica los PCs necesarios para explicar el problema (Bro y Smilde, 2014; Jiang y col., 2014).

En este caso se observó que los dos primeros PCs explicaban en conjunto el 94,5% de la varianza (**Figura 4.9 A**), mientras que considerando también el tercer PC se alcanzaba una varianza acumulada de 98,0% (**Figura 4.9 B**). Como puede observarse en la **Figura 4.9**, tanto usando dos PCs como tres PCs, se logró una clara separación en dos grupos: muestras tratadas con PEF en un grupo (círculos azules) y muestras control en otro (círculos negros).



**Figura 4.9.** Gráfico de componentes principales para las muestras control (negro) y tratadas (azul). (A) Seleccionando dos componentes principales y (B) Seleccionando tres componentes principales.

En la **Figura 4.10 A** se presentan los espectros obtenidos por espectroscopía Raman para el control y la muestra tratada. En la **Figura 4.10 B** se presentan estos espectros luego de la corrección de línea de base y el suavizado.



**Figura 4.10.** Espectros obtenidos por espectroscopía Raman para las muestras control (negro) y las muestras tratadas por PEF (azul). (A) Espectros originales y (B) Espectros luego de la corrección de línea de base y el suavizado.

La espectroscopía Raman corroboró lo observado por FT-IR. Mediante esta técnica tampoco se observaron corrimientos, apariciones ni desapariciones de bandas, revalidando que no se observó descomposición de los compuestos de interés. A pesar de que se observa una mayor intensidad de señal en el caso de la muestra tratada por PEF, no puede decirse que se relacione directamente con la concentración de polifenoles en la misma, como en el caso del FT-IR, ya que el modo en que se adquirieron los espectros para minimizar la fluorescencia de la muestra no permite sacar conclusiones cuantitativas confiables.

Así mismo, en la **Tabla 4.5** se resumen las principales bandas halladas que pudieron ser asignadas en base a la bibliografía estudiada (Zheng y col., 2017; Zaffino y col., 2016).

**Tabla 4.5.** Asignación de bandas de los espectros Raman del extracto liofilizado de grosella negra.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
875	Vibraciones de grupos C-O-C cíclicos de carbohidratos
960	Aleteo de grupos C-C
1243	Estiramiento del enlace C-OH de compuestos fenólicos
1350	Estiramiento de enlaces C-C del anillo fenólico
1469	Deformación de enlaces CH <sub>2</sub> de disacáridos
1630	Estiramiento del enlace C=O de antocianinas

#### 4.2.4. Estudio del efecto del tratamiento PEF sobre los compuestos fenólicos del jugo por HPLC-DAD

En la **Tabla 4.6** se muestra el contenido de los distintos compuestos fenólicos analizados y sus familias. La metodología y los estándares empleados permitieron cuantificar el contenido de los principales ácidos fenólicos, flavonoles del grupo de las quercetinas y, entre las antocianinas, la cianidina-3-glucósido y la delfinidina-3-glucósido.

En concordancia con lo informado por otros autores, las antocianinas fueron el grupo más abundante de compuestos fenólicos en las muestras de grosella negra. En la muestra control la cianidina-3-glucósido y la delfinidina-3-glucósido representaron alrededor de un 70% del total de compuestos determinados. El segundo grupo mayoritario fue el de

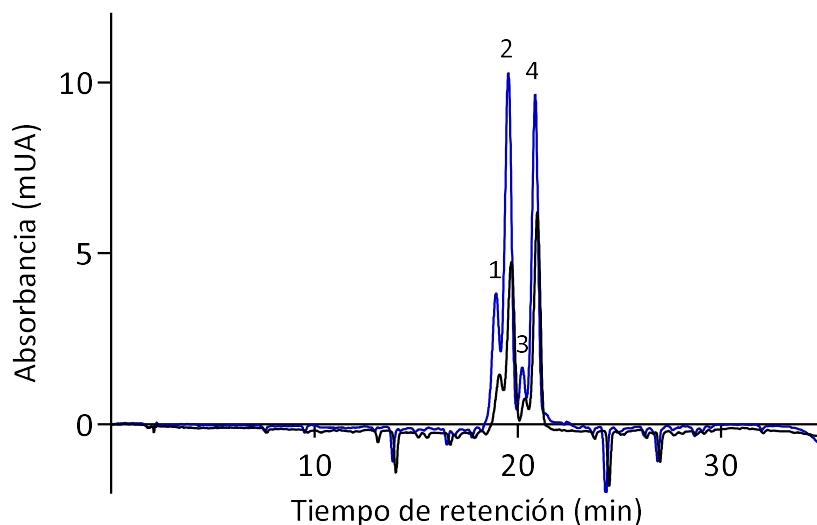
los flavonoles, en particular las quercetinas, que representaron un 22% del total de compuestos fenólicos, seguido por los ácidos fenólicos que constituyeron un 11%. Estos resultados coinciden con los informados por Paunović y col. (2017), Vagiri y col. (2012), Anttonen y col. (2006) y Kapasakalidis y col. (2006). No se detectaron compuestos flavan-3-oles, lo cual coincide con los hallazgos de Kapasakalidis y col. (2006), aunque difiere de lo reportado por Vagiri y col. (2012). Según los primeros, esto puede deberse al bajo contenido de este grupo de compuestos y a diferencias en la purificación y tratamiento de las muestras.

**Tabla 4.6.** Contenido de compuestos fenólicos determinados por HPLC-DAD.

<b>Compuestos fenólicos</b>		<b>Control</b> (mg/g)	<b>PEF óptimo</b> (mg/g)
<b>Ácidos fenólicos</b>			
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gálico	0,0287	0,0454
	Ácido elágico	0,0411	0,0251
	Ácido clorogénico	0,0706	0,0917
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido ferúlico	0,0177	0,0126
	Ácido p-cumárico	0,0158	0,0129
	Ácido cafeico	nd	nd
<b>Flavan-3-oles</b>			
	(+)-Catequina	nd	nd
	(-)-Epicatequina	nd	nd
<b>Flavonoles</b>			
	Quercetina	0,0171	0,0210
	Rutina	0,319	0,389
<b>Antocianinas</b>			
	Cian-3-glucósido	0,137	0,150
	Delf-3-glucósido	0,886	2,151
<b>Estilbenos</b>			
	Resveratrol	nd	nd

nd: no detectado.

En base a la bibliografía consultada, las cuatro antocianinas más abundantes en la grosella negra son la delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido (kuromanina) y cianidina-3-rutinósido, las cuales en conjunto representan más del 95% del total de antocianinas de esta fruta (Paunović y col., 2017; Bonarska-Kujawa y col., 2014; Nour y col., 2013; Vagiri y col., 2012; Anttonen y col., 2006). Según el trabajo de Mattila y col. (2016), los rutinósidos fueron los derivados predominantes de estas antocianidinas. Estos autores informaron que alrededor del 80% de las antocianinas totales correspondían a formas rutinósidas, mientras que alrededor de un 20% a las formas glucosiladas. Como se explicó anteriormente, para este trabajo sólo se contó con estándares de delfinidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido, por lo que se cuantificaron sólo estas dos antocianinas para analizar los cambios producidos en la concentración debido al tratamiento PEF. Sin embargo, comparando los cromatogramas obtenidos para la señal detectada a 520 nm (**Figura 4.11**) con los resultados reportados en bibliografía es posible identificar tentativamente la presencia de rutinósidos derivados de delfinidina y cianidina (delfinidina-3-rutinósido y cianidina-3-rutinósido) asociados a los picos 2 y 4 de mayor intensidad (Bonarska-Kujawa y col., 2014). Este análisis permite sugerir que efectivamente las formas rutinósidas de ambas antocianinas se encuentran en mayor concentración que sus formas glucósidas.



**Figura 4.11.** Cromatograma HPLC de la muestra control (negro) y tratada por PEF (azul) a 520 nm. Los picos señalados corresponden a: 1. delfinidina-3-glucósido, 2. delfinidina-3-rutinósido, 3. cianidina-3-glucósido y 4. cianidina-3-rutinósido.

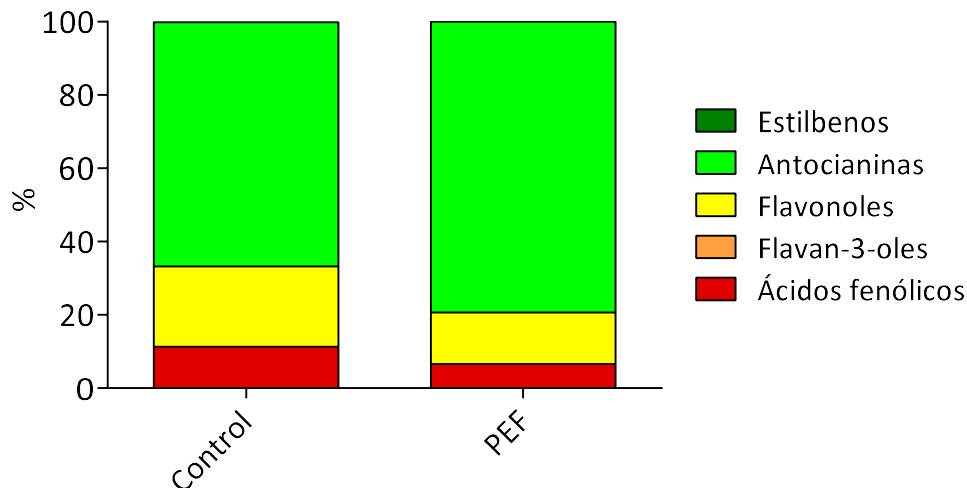
Respecto a los ácidos fenólicos, los derivados del ácido hidroxicinámico fueron mayoritarios, y entre ellos, el ácido clorogénico fue el más abundante, en concordancia con lo reportado por Laczkó-Zöld y col. (2018) y Vagiri y col. (2012). Otros ácidos hidroxicinámicos reportados en grosella negra son el ácido p-cumárico, ácido ferúlico y ácido cafeico (Bonarska-Kujawa y col., 2014; Anttonen y col., 2006), aunque este último no se detectó en el presente trabajo. Dentro de los flavonoles, la bibliografía revela que los más abundantes son los derivados de la miricetina y la quercetina (Mattila y col., 2016), en especial los glucósidos y rutinósidos de estas formas (Anttonen y col., 2006). Bonarska-Kujawa y col. (2014) hallaron también los derivados galactósidos de estos compuestos. Paunović y col. (2017) reportaron que los derivados de la quercetina fueron los flavonoles más abundantes en esta fruta.

Comparando la muestra control con la sometida al tratamiento PEF óptimo, se pudo observar que el tratamiento aplicado no generó formación de nuevas especies de compuestos fenólicos ni desaparición de grupos de éstos, pero sí permitió un aumento del contenido global de compuestos fenólicos en la muestra tratada. Estos resultados coinciden con los reportados por Pataro y col. (2017 a) y con lo observado en el análisis espectrofotométrico y espectroscópico por FT-IR (**Figura 4.8**) y Raman (**Figura 4.10 B**). Un análisis más detallado evidenció que el tratamiento de electroporación favoreció especialmente la extracción de las antocianinas del grupo de las delfinidinas y la del ácido gálico, seguido por el ácido clorogénico y las quercetinas, y en menor medida la de las cianidinas. Por otro lado, se observó una disminución en la extracción de algunos ácidos como el elágico, ferúlico y p-cumárico. Los rendimientos de extracción de los distintos compuestos fenólicos pueden variar según el procesamiento de la fruta y los métodos de extracción empleados. Algunos autores afirman que ciertos grupos de polifenoles, su ubicación dentro del tejido, su capacidad de interacción y su estabilización durante distintas condiciones de procesamiento pueden influir en el perfil fenólico del extracto obtenido (Corrales y col., 2008). Pataro y col. (2017 a) estudiaron el efecto de tratamientos PEF sobre la extracción de antocianinas en arándanos e informaron un efecto más significativo sobre ciertos compuestos antociánicos que otros. En ese trabajo en particular, el tratamiento PEF condujo a aumentos significativos de malvidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, malvidina-3-galactósido y peonidina-3-arabinósido. Sin embargo, otros trabajos indican una mayor extracción de otros compuestos antociánicos diferentes a los mencionados por Pataro y col. (2017 a)

como consecuencia de tratamientos de electroporación (Pataro y col., 2017 b; Luengo y col., 2013). Delsart y col. (2013) estudiaron el efecto de distintos tratamientos PEF sobre uvas, y reportaron que diferentes condiciones de operación pueden influir de manera distinta sobre la extracción de diversos grupos de compuestos fenólicos. En su trabajo observaron que tratamientos de mayor duración y energía (con menor intensidad del campo eléctrico) favorecieron la extracción de taninos asociados a la pared celular, mientras que tratamientos de menor energía pero mayor campo eléctrico aumentaron la extracción de antocianinas. Por otro lado, Sun y col. (2011) estudiaron el efecto del material de los electrodos del sistema de electroporación sobre dos antocianinas (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-soforósido) y reportaron una degradación parcial de ambos compuestos como consecuencia de las reacciones electroquímicas causadas por el tratamiento PEF. Aunque en ese trabajo se estudiaron antocianinas de manera aislada, los autores discuten que este fenómeno puede deberse a la formación de especies de oxígeno reactivas que podrían clivar el anillo bencénico de los compuestos fenólicos en general y sus resultados demuestran que ciertos compuestos pueden ser más susceptibles a la degradación por electroporación que otros. Estos resultados revelan que, aunque el tratamiento PEF puede favorecer la extracción de unos compuestos sobre otros, no existe evidencia consistente que demuestre que dicha extracción selectiva pueda controlarse o generalizarse a otras frutas ni distintas condiciones de tratamiento.

Si se consideran en su conjunto los distintos grupos de polifenoles cuantificados en cada uno de los extractos de grosella negra obtenidos, se observa que la proporción relativa de cada grupo cambió luego del tratamiento con PEF. En particular, se observa que el extracto óptimo presentó un aumento significativo de la proporción de antocianinas en desmedro de los otros grupos presentes como ácidos fenólicos y compuestos flavonoles, que no fueron extraídos con la misma eficiencia que los compuestos antociánicos (**Figura 4.12**).





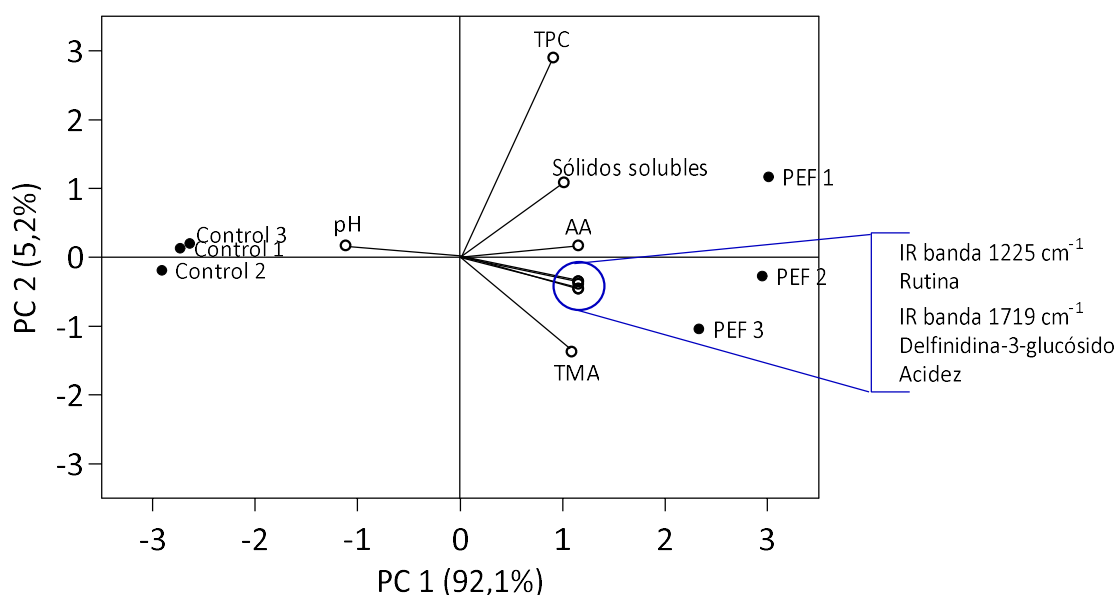
**Figura 4.12.** Contenido relativo de los distintos grupos fenólicos cuantificados en cada extracto (control y el tratado por PEF).

De acuerdo a un estudio realizado por Borges y col. (2010), el glucósido de delphinidina y los rutinósidos de delphinidina y cianidina, junto con la vitamina C serían los compuestos que contribuyen en mayor grado a la actividad antioxidante de la fruta. Estos autores determinaron en su trabajo que un 33% de esta actividad se debe a la delphinidina-3-rutinósido, un 19% a la cianidina-3-rutinósido y un 14% a la delphinidina-3-glucósido. Mientras que otros compuestos del grupo de las antocianinas y los flavonoles aportarían individualmente a menos del 2% de la actividad antioxidante total, y en conjunto alcanzarían un 17%.

#### 4.2.5. Integración de resultados por análisis de componentes principales

Con el fin de tener una comprensión global de la influencia de cada variable estudiada sobre las características del extracto óptimo obtenido, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) en el que se evaluó el peso de: el contenido de sólidos solubles, la acidez, el pH, el contenido de polifenoles totales, el contenido de antocianinas monoméricas totales, la actividad antioxidante, el contenido de rutina (quercetina-3-rutinósido) y de delphinidina-3-glucósido, y la altura de las bandas a 1225 y 1719  $\text{cm}^{-1}$  de los espectros obtenidos por FT-IR, sobre las muestras sometidas al tratamiento PEF y las muestras control. La **Figura 4.13** muestra los resultados de este análisis.

Como puede observarse en los ejes del gráfico, el 97,3% de la varianza está explicada por los dos primeros componentes principales. Se observó que todas las variables estudiadas tuvieron un peso de similar magnitud para la construcción de los componentes principales (valores similares de autovectores y/o largo de vector), aunque el CPT fue el que mayor peso presentó, especialmente en la construcción del PC 2. Las variables pH, acidez, AA, contenido de rutina y delfinidina y altura de las bandas IR tuvieron un aporte mayor para la construcción del PC1, mientras que las variables sólidos solubles, CPT y AMT presentaron un peso similar para ambos componentes.



**Figura 4.13.** Gráfico de análisis de componentes principales construido con las variables estudiadas sobre los extractos obtenidos por tratamiento PEF óptimo y control. Se muestran los triplicados de las muestras tratadas y las muestras control.

Ambos grupos de muestras fueron descriptas por todos los vectores ya que todas se encontraron alejadas del origen de coordenadas. Las muestras PEF se caracterizaron por valores más altos de sólidos solubles, CPT, AMT, AA, acidez, contenido de rutina y delfinidina y altura de las bandas IR, y valores más bajos de pH. Por el contrario, las muestras control estuvieron descriptas por mayor pH y menor contenido de sólidos solubles, CPT, AMT, AA, acidez, contenido de rutina y delfinidina y altura de las bandas IR.

Se apreció, como era de esperarse, que las variables pH y acidez presentaron direcciones prácticamente opuestas (ángulo entre vectores cercano a  $180^\circ$ ), mientras que la altura de las bandas de los espectros FT-IR presentaron ángulos muy parecidos, es decir que estuvieron muy relacionadas entre sí, al igual que el contenido de rutina y de delfinidina. Además, es interesante observar que los vectores correspondientes al contenido de rutina y de delfinidina y el vector acidez presentaron una correlación muy elevada con los vectores de altura de bandas de FT-IR. Esto es de sumo interés ya que sugiere que este tipo de análisis espectroscópico constituye una herramienta rápida y no destructiva para profundizar el análisis del impacto de los tratamientos aplicados sobre los compuestos fenólicos mayoritarios. En cambio, los vectores CPT, AMT y AA mostraron mayor independencia con el resto de los vectores.

Respecto a las muestras, se puede observar que las muestras control se ubicaron todas muy cercanas entre sí, indicando que las réplicas presentaron características muy similares. En cambio, las muestras sometidas al tratamiento PEF se encontraron a mayor distancia unas de otras, mostrando que las mismas exhibían mayor variabilidad en las réplicas (esto también pudo observarse en los valores de los desvíos estándar para ambos grupos de muestras mostrados en la **Tabla 4.3**). Esto se debe a que el efecto del tratamiento PEF puede variar levemente de una aplicación a la otra debido a pequeñas diferencias en la disposición de la muestra en la cubeta de electroporación, cantidad de líquido en el medio, variabilidad de la fruta, entre otras.

### **4.3. Obtención y caracterización del ingrediente deshidratado**

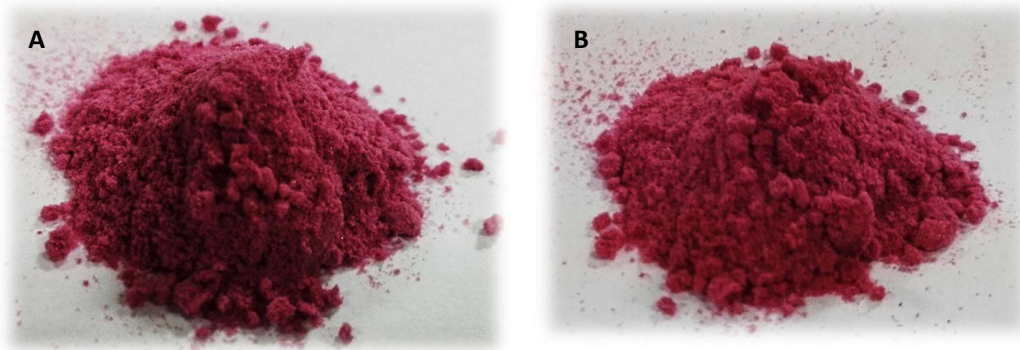
El extracto obtenido en las condiciones óptimas de tratamiento PEF se deshidrató por secado por aspersión con el fin de obtener un ingrediente en polvo. La **Tabla 4.7** presenta las características fisicoquímicas y el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante del polvo obtenido y del control sometido al mismo procedimiento pero sin la aplicación del tratamiento PEF. En la **Figura 4.14** se pueden ver fotografías tomadas de ambos polvos.

**Tabla 4.7.** Caracterización fisicoquímica de los polvos obtenidos por secado por aspersión.

	Control	PEF
Contenido de agua (g/100 g b.s.)	9,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	9,6 ± 0,8 <sup>a</sup>
a <sub>w</sub>	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>
Solubilidad (%)	91,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	91 ± 2 <sup>a</sup>
Higroscopicidad (g agua/100g b.s.)	17,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	16,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
Índice de Hausner	1,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,02 <sup>a</sup>
Índice de Carr	35 ± 1 <sup>b</sup>	30 ± 1 <sup>a</sup>
L*	50 ± 2 <sup>a</sup>	49 ± 2 <sup>a</sup>
a*	42 ± 0,7 <sup>a</sup>	38,1 ± 0,9 <sup>a</sup>
b*	2,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
CPT (mg EAG /g b.s.)	14,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	15,9 ± 0,4 <sup>b</sup>
AA (mg EAG /g b.s.)	7,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
AMT (mg cian-3-glu/g b.s.)	3,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>b</sup>

Valores expresados como la media ± desviación estándar.

Diferentes letras minúsculas dentro de cada fila indican diferencias significativas (p<0,05).



**Figura 4.14.** Fotografías de los polvos control (A) y PEF (B).

En primer lugar se puede observar que el proceso de deshidratación conservó la misma tendencia que los extractos originarios en cuanto al contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante: se obtuvieron valores significativamente más altos de CPT, AMT y AA en el polvo obtenido a partir de la fruta sometida al tratamiento óptimo que en el control. Por otro lado, el contenido y la actividad de agua no presentaron diferencias

significativas entre ambas muestras. La solubilidad también fue muy similar para ambas, y presentó valores relativamente altos (mayores a 90%). Muzaffar y col. (2016) obtuvieron un polvo de jugo de granada por secado por aspersión y sugirieron que las mejores características del polvo se podrían alcanzar en un rango de higroscopicidad entre 10,84 y 15,42. Los valores hallados en esta tesis fueron similares entre los dos polvos y ligeramente superiores al rango sugerido por este autor. En cuanto a los índices de Hausner y de Carr, ambos polvos presentaron una cohesividad intermedia y una fluidez aceptable, siendo esta última levemente mejor para el polvo proveniente de la muestra tratada por PEF. En un trabajo previo realizado por el grupo se obtuvieron polvos de grosella negra, frambuesa y sauco por secado por aspersión, empleando las mismas condiciones de secado, pero una temperatura de entrada de aire superior a la usada en este trabajo de tesis. En el trabajo citado, se hallaron valores de IH de entre 1,08 y 1,23 y de IC entre 5,89 y 18,45 (Gagnetten y col., 2018). Santhalakshmy y col. (2015) secaron frutos de jamun por aspersión y obtuvieron valores de IH de entre 1,57 y 1,72 y de IC entre 36 y 42. Caliskan y Dirim (2016), por su parte, hallaron valores de IH e IC de 1,5 y 34 para un polvo de zumaque.

Por último, los dos polvos presentaron una apariencia muy parecida y no se observaron diferencias significativas en los parámetros de color estudiados (**Tabla 4.7**). De manera consistente con el tono rojo oscuro de la grosella negra, se registraron valores de  $a^*$  altos y de  $b^*$  bajos. Respecto a la luminosidad, ambos polvos presentaron valores intermedios de  $L^*$  como consecuencia de la combinación del color oscuro del jugo de la fruta con el color pálido de la maltodextrina usada como matriz de secado.

Los resultados de esta caracterización mostraron que el tratamiento PEF en las condiciones estudiadas para mejorar la extracción de compuestos bioactivos no alteró las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas deseadas de los polvos de manera significativa.

### **PARTE III: Aprovechamiento del residuo de grosella negra**

El residuo remanente luego del prensado en frío, constituido por pulpa, piel y semillas de la fruta, presentó una consistencia muy densa y con muy poco líquido, sugiriendo la presencia de importantes cantidades de fibra. Además, mostró una coloración intensa, indicando la presencia de una elevada concentración de antocianinas. Por consiguiente, se decidió emplearlo para desarrollar un ingrediente alimentario con potencial de realizar un aporte de compuestos bioactivos como fibra dietaria y pigmentos con capacidad antioxidante. Para obtener un material de mayor vida útil, más fácil almacenamiento y con mayor versatilidad de aplicaciones se decidió liofilizar el residuo y luego molerlo hasta obtener un polvo fino. Antes de realizar la molienda se separaron las semillas para evitar posibles problemas de enranciamiento de los lípidos presentes en las mismas. El polvo obtenido luego de liofilizar y moler el residuo se denominó PL.

#### **4.4. Caracterización del polvo liofilizado del residuo de grosella negra (PL)**

En la **Figura 4.15** se muestra una imagen del polvo liofilizado de grosella negra una vez molido. Los resultados de la caracterización del PL se muestran en la **Tabla 4.8**.

Al tratarse de un producto liofilizado, el ingrediente presentó un contenido de agua y una actividad de agua bajos. Además, se almacenó durante 12 meses a temperatura ambiente en recipientes herméticamente cerrados y no se observaron cambios físicos a simple vista. Este resultado, junto con los valores bajos de  $a_w$ , sugiere que el polvo PL posee estabilidad microbiológica y física, mostrando que el mismo podría almacenarse a temperatura ambiente en envases herméticos sin riesgo de deterioro por un tiempo prolongado.



**Figura 4.15.** Imagen del PL.

**Tabla 4.8.** Caracterización del PL.

Propiedad	Resultado
Actividad de agua	0,25 ± 0,01
Contenido de agua (g / 100 g b.s.)	3,62 ± 0,07
pH	3,25 ± 0,01
Acidez total (mg ácido cítrico/100 g)	6,02 ± 0,04
Fibra dietaria total (g / 100 g b.s.)	32,3 ± 0,4
Contenido de proteínas (g / 100 g b.s.)	4,2 ± 0,1
Contenido de grasas (g / 100 g b.s.)	1,98 ± 0,05
Contenido de cenizas (g / 100 g b.s.)	2,9 ± 0,1
Na (mg / 100 g b.s.)	0,033 ± 0,006
K (mg / 100 g b.s.)	8,9 ± 0,6
Ca (mg / 100 g b.s.)	4,8 ± 0,6
CPT (mg EAG/ g b.s.)	37,5 ± 0,9
AMT (mg cian-3-glucósido / g b.s.)	18,0 ± 0,4
AA (mg EAG / g b.s.)	22,1 ± 0,3

Valores expresados como la media ± desviación estándar.

b.s. = base seca.

Los contenidos de proteínas y de grasas hallados fueron bajos como era de esperarse para un producto frutal, mientras que el contenido de cenizas representó un porcentaje apreciable del material. Reißner y col. (2019) reportaron contenidos de grasa y de proteínas más altos y aproximadamente el mismo contenido de cenizas en un puré de

grosella negra que contenía las semillas y cáscaras. Por otro lado, Bruzone (2009) informó contenidos de fibra dietaria total de 4g/100 g en distintos tipos de grosellas frescas, mientras que Caminiti (2013) informó valores de entre 1,90 y 4,00 g/100 g de grosella fresca. Teniendo en cuenta un contenido aproximado de agua en la fruta fresca de 75 - 80 %, los valores reportados por estos autores se corresponden con un rango de entre 8 y 18 g de fibra cada 100 g b.s. El contenido de fibra dietaria total obtenido en el PL fue alto y superior al reportado por estos autores para la fruta fresca, tendencia que también observaron Morales de la Peña y col. (2020). De esta fibra dietaria total, más del 60 % correspondió a la fracción insoluble ( $20 \pm 2$  g/100 g b.s.). Reißner y col. (2019) obtuvieron valores de fibra dietaria insoluble de 55,1 % b.s. para un puré de grosella negra; mientras que Šarić y col. (2019) reportaron contenidos de FDT de  $52,51 \pm 1,34$  y  $56,41 \pm 1,11$  % b.s. para concentrados de fibra de frambuesa y de arándanos, respectivamente, y hallaron que más del 90% de esta fibra correspondía a la FDI.

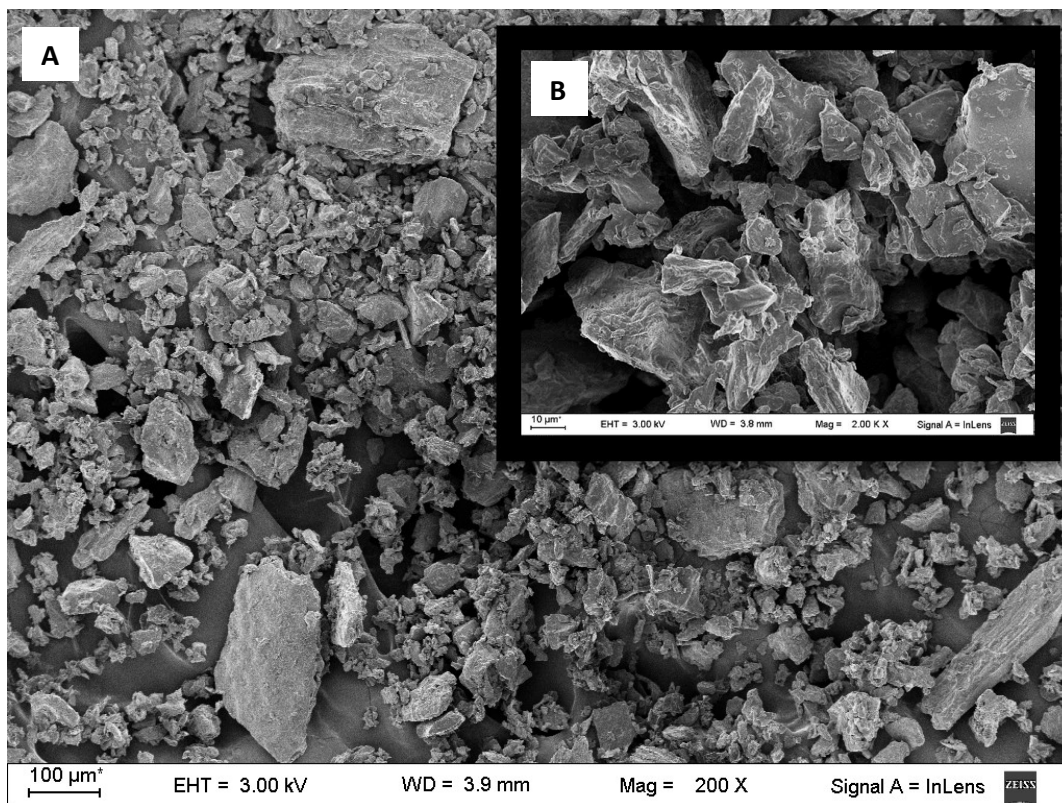
Respecto al CPT, las AMT y la AA, el polvo exhibió contenidos importantes de los tres parámetros medidos. Esto sugiere que el residuo remanente luego del proceso de prensado en frío conserva una importante fracción de los compuestos bioactivos presentes en la fruta, que quedan retenidos en la torta de prensado. Como describen Guardiola-Márquez y col. (2020) gran parte de los compuestos fenólicos hallados en matrices vegetales se encuentran asociados a componentes de la pared celular mediante interacciones tanto covalentes como no covalentes entre los anillos aromáticos o los grupos hidroxilo con polisacáridos y proteínas de la pared celular. Esto conduce muchas veces a contenidos de polifenoles muy elevados en la cáscara y residuos de estos vegetales. A partir de estos resultados se torna de mucho interés el aprovechamiento de este residuo para la producción de ingredientes funcionales y para agregar valor a la producción de grosella negra.

Los parámetros de color del polvo fueron  $L^* = 29 \pm 2$ ,  $a^* = 31 \pm 3$  y  $b^* = 7,5 \pm 0,7$ , los cuales representan el color bordeaux intenso provisto por el alto contenido de antocianinas de esta fruta. Si se comparan estos parámetros de color con los correspondientes al polvo obtenido por secado por aspersión a partir del extracto (**Tabla 4.7**), se puede observar que el valor de  $L^*$  del PS fue apreciablemente más alto que para el PL ( $\Delta L^* = 19$ ). Esto se debe principalmente al aporte de la maltodextrina que se adicionó al extracto como matriz antes de realizar el secado por aspersión, la cual tiene



un elevado valor de luminosidad. La diferencia del parámetro  $a^*$  entre ambos polvos ( $\Delta a^*$ ) fue de 7 siendo más alto en el PS, mientras que la de  $b^*$  ( $\Delta b^*$ ) fue de 4,5, resultando más bajo en el PS. La variación global del color ( $\Delta E^*_{00}$ ) entre ambos polvos fue  $16 \pm 1$ . Keraitè y col. (2017) establecieron una escala para clasificar las diferencias de color en base al valor de  $\Delta E^*_{00}$  y así poder correlacionar la medición instrumental del color con la percepción del ojo humano. Según esta clasificación, valores de  $\Delta E^*_{00}$  menores a 1 no son percibidos por el ojo humano, los valores entre 1 y 2 se perciben por observación cercana, los valores comprendidos entre 2 y 10 se perciben a simple vista, los valores entre 11 y 49 corresponden a colores con cierta similitud, y el valor de  $\Delta E^*_{00}=100$  corresponde a colores opuestos. De acuerdo con esta clasificación, la diferencia de color determinada entre los dos polvos corresponde a colores con cierta similitud. Con estos parámetros también se calculó el valor del ángulo de tono, el cual fue 13,86 y 4,60 para el PL y el PS, respectivamente, mostrando la diferencia cromática entre ambos polvos, debida fundamentalmente a la menor concentración de pigmentos antociánicos en el PS por la presencia de maltodextrina.

Las imágenes SEM del polvo (**Figura 4.16**) mostraron partículas con una distribución amplia de tamaños desde alrededor de 10  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ , observándose incluso estructuras de hasta casi 300  $\mu\text{m}$ . Las partículas presentaron una gran diversidad de formas con un predominio de superficies rugosas y bordes afilados, típicos de materiales liofilizados (Franceschinis y col, 2014), en especial en productos de fruta ricos en fibra (Gan y Latiff, 2011).



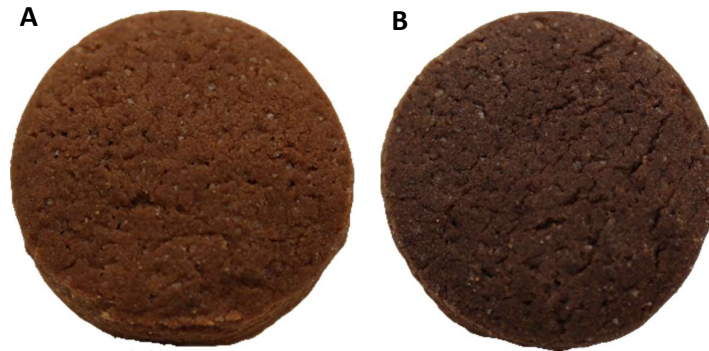
**Figura 4.16.** Imágenes SEM del PL. Aumento de 200x (A) y 2000x (B).

#### **4.5. Formulación y caracterización fisicoquímica de galletitas de chocolate libres de gluten adicionadas con PL**

Dado que se logró obtener un ingrediente rico en fibra y compuestos con actividad antioxidante (Sección 4.4), se resolvió emplearlo como parte de una formulación de galletitas libres de gluten, con el fin de enriquecer esta clase de productos que habitualmente carecen de ese tipo de nutrientes. Sin embargo, dada la coloración intensa del ingrediente, éste no resultaría adecuado para ser incorporado en galletitas de tonalidades claras. Por lo tanto, se decidió emplearlo dentro de la formulación de galletitas de chocolate. Para ello, se realizaron estudios preliminares para evaluar el comportamiento del polvo PL durante el proceso de mezclado y preparación de la formulación y su efecto sobre el producto final. Se estudió el agregado de diferentes niveles del PL a una premezcla comercial de galletitas de chocolate libres de gluten, en reemplazo de una fracción de la harina de arroz y el almidón de maíz de la formulación

original. Durante el proceso de elaboración de las galletitas, la distribución de tamaños de partícula heterogénea observada en la microscopía SEM no generó dificultades en el mezclado de los ingredientes secos de la formulación. Un ensayo sensorial de los productos elaborados, realizado por un panel interno, determinó que el aroma y el sabor fueron las características sensoriales que limitaron el nivel de PL que podía adicionarse sin detectar cambios organolépticos severos, y se concluyó que la concentración más alta del PL que podía adicionarse a la formulación era de 3,75%. A partir de estas observaciones se elaboraron las galletitas con el agregado del PL en esa concentración (galletita GN). También se prepararon otras galletitas sin la adición del ingrediente, como control (galletita C).

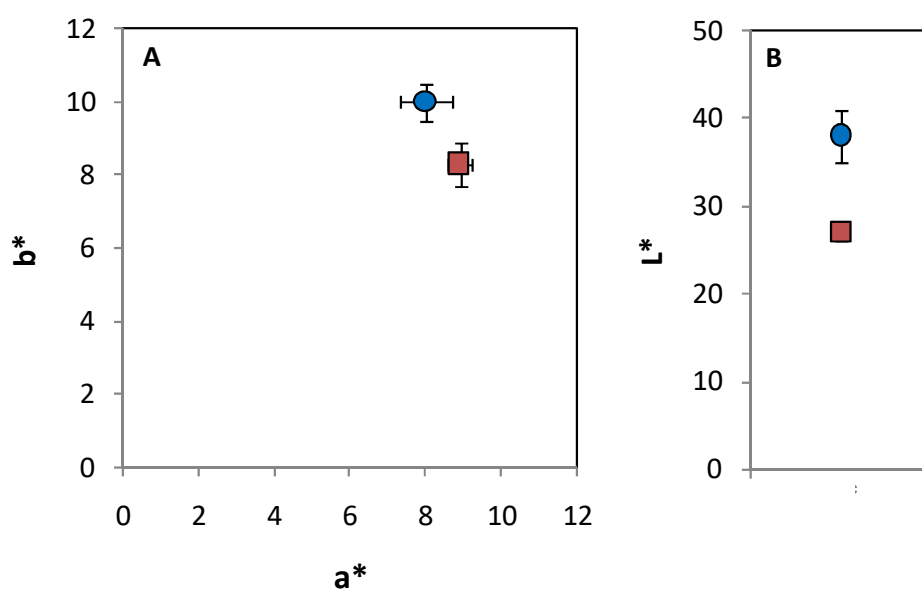
La **Figura 4.17** muestra fotografías de las galletitas C y GN elaboradas siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Las dimensiones de las mismas no presentaron diferencias significativas entre ambas muestras. Su diámetro fue de  $294 \pm 5$  mm y la altura fue de  $55 \pm 5$  mm.



**Figura 4.17.** Fotografía de las galletitas C (A) y GN (B).

El contenido de agua fue de  $9,5 \pm 0,1$  y  $11,3 \pm 0,2$  g/100 g para las galletitas C y GN respectivamente, observándose diferencias significativas. La actividad de agua, en cambio, no presentó diferencias significativas, siendo de  $0,733 \pm 0,004$  y  $0,740 \pm 0,001$  para cada muestra. El hecho de que la galletita GN haya presentado un contenido de agua más elevado que el control, pero valores de  $a_w$  estadísticamente iguales podría deberse a la capacidad de la fibra para retener agua, así como a la mayor presencia de compuestos de bajo peso molecular provistos por el ingrediente de fruta que interactúan con las moléculas de agua y contribuyen a bajar la  $a_w$ .

Respecto al color (**Figura 4.18**), se observó que el parámetro  $L^*$  fue el que presentó mayor variación, siendo más bajo en la galletita GN en comparación al control ( $\Delta L^*=11,1$ ), mientras que  $a^*$  aumentó ( $\Delta a^*=0,9$ ) y  $b^*$  disminuyó ( $\Delta b^*=1,7$ ). Estos cambios, representan un oscurecimiento de la muestra y un incremento de la tonalidad rojiza, como puede observarse también en la **Figura 4.17**. La variación global del color ( $\Delta E^*_{00}$ ) fue  $10,3 \pm 0,5$ , lo cual indica que la diferencia de color entre ambas galletitas fue perceptible a simple vista según la clasificación introducida por Keraitè y col. (2017) descripta anteriormente.



**Figura 4.18.** Variables cromáticas  $b^*$  vs  $a^*$  (A) y  $L^*$  (B) para las galletitas C (círculo azul) y GN (cuadrado rojo).

La composición centesimal de las dos galletitas se presenta en la **Tabla 4.9**. No se observaron diferencias significativas en el contenido de grasa ni de proteínas entre ambas muestras. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de cenizas ni de los minerales estudiados. Esto es coherente ya que la cantidad de polvo de grosella negra adicionada a la formulación GN no fue tan alta como para afectar la composición mineral del producto final.

Respecto al contenido de fibra, si se expresa la cantidad de ingrediente adicionada como porcentaje de reemplazo de las harinas, el porcentaje de reemplazo fue de 18%, el

cual permitió lograr un incremento de 2,5 veces en el contenido de FDT en relación a la galletita C. Viva de Toledo y col. (2017) adicionaron galletitas de chocolate con residuos liofilizados de ananá, manzana o pelón en una proporción entre 5 y 15% y determinaron contenidos de fibra de entre 2,44 y 6,46%. A su vez, Šarić y col. (2019) alcanzaron un contenido de FDT de  $6,92 \pm 0,02$  % b.s. al enriquecer galletitas libres de gluten con un concentrado de frambuesa (30 % de reemplazo de las harinas libres de gluten).

El Código Alimentario Argentino en su Capítulo V establece las normas para la rotulación de los alimentos. En el artículo 235 quinto - (Resolución Conjunta SPReI N° 161/2013 y SAGyP N° 213/2013), donde resuelve sobre la información nutricional complementaria, establece los requisitos que debe cumplir un producto para llevar distintas declaraciones nutricionales. El contenido de FDT alcanzado en la galletita GN ( $4,8 \pm 0,7$  % b.s. ó  $4,2 \pm 0,7$  % en base total) fue superior al valor mínimo establecido en esta norma (3g/100 g de producto) requerido para habilitar el uso de la declaración “fuente de fibra” en el rotulado del producto. De este modo, el incremento del contenido de fibra en el producto, no sólo significaría una importante mejora en el perfil nutricional de las galletitas libres de gluten, sino que además permitiría una rotulación distintiva del mismo.

**Tabla 4.9.** Composición centesimal de las galletitas C y GN.

Propiedad		Galletita C	Galletita GN
Fibra dietaria (% b.s.)	FDT	$1,9 \pm 0,4^a$	$4,8 \pm 0,7^b$
	FDI	$1,1 \pm 0,1^a$	$3,0 \pm 0,9^b$
Contenido de proteínas (g / 100 g b.s.)		$5,31 \pm 0,08^a$	$5,36 \pm 0,09^a$
Contenido de grasa (g / 100 g b.s.)		$22 \pm 3^a$	$23 \pm 2^a$
Contenido de cenizas (g / 100 g b.s.)		$1,3 \pm 0,1^a$	$1,4 \pm 0,1^a$
Na (mg/ 100 g b.s.)		$0,116 \pm 0,007^a$	$0,122 \pm 0,009^a$
K (mg/ 100 g b.s.)		$2,9 \pm 0,2^a$	$2,8 \pm 0,1^a$
Ca (mg/ 100 g b.s.)		$1,19 \pm 0,08^a$	$1,11 \pm 0,08^a$

Valores expresados como la media  $\pm$  desviación estándar.

Diferentes letras dentro de cada fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

b.s. = base seca.

Si se considera el contenido de FDT en una porción de galletitas listas para consumir (35 g ó 4 galletitas), el aporte de fibra dietaria de este producto sería de 1,47 g, lo cual

representa alrededor de un 6% de la Ingesta Diaria de Referencia según los valores establecidos en el Código Alimentario Argentino (basados en el reporte técnico de la OMS “Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases” Series 916 Génova, 2003) y lo reportado por la European Food Safety Authority (2010) y la FDA (2014). En la **Tabla 4.10** se compara el contenido de fibra dietaria total aportado por una porción de estas galletitas respecto al encontrado en algunas frutas (Gorinstein y col., 2001; Marlett y Cheung, 1997; Marlett y Vollendorf, 1994). Como puede observarse, el aporte que una porción de las galletitas GN haría a la dieta es similar al de muchas frutas como el durazno, el pelón o las frutillas.

**Tabla 4.10.** Contenido de fibra dietaria total y fibra dietaria insoluble de las galletitas GN y algunas frutas de consumo habitual.

Alimento	Porción	FDT por porción* (g)	FDI por porción* (g)	FDI/FDT	% Valor diario de referencia de FDT por día
<b>Galletitas GN</b>	<b>35 g</b>	<b>1,47</b>	<b>0,95</b>	<b>0,64</b>	<b>5,9</b>
Manzana	1 unidad	1,9	1,7	0,89	7,6
Durazno	1 unidad	1,7	1,1	0,65	6,8
Naranja	1 unidad. Sin cáscara	2,2	1,7	0,77	8,8
Banana	1 unidad. Sin cáscara	1,8	1,3	0,72	7,2
Ciruela	1 unidad.	0,8	0,5	0,63	3,2
Pelón	1 unidad.	1,6	1	0,63	6,4
Arándanos	1/2 taza	2,1	1,9	0,90	8,4
Frutillas	1/2 taza	1,3	1	0,77	5,2
Frambuesas	1/2 taza	2,6	2,3	0,88	10

Por otro lado, en la **Tabla 4.11** se compara el contenido de FDT de las galletitas GN con el de otras galletitas de chocolate libres de gluten encontradas en el mercado argentino. Se puede ver en esta tabla que el aporte de fibra de las galletitas elaboradas en esta tesis es sustancialmente mayor al hallado en los productos habitualmente disponibles.

**Tabla 4.11.** Contenido de fibra dietaria total de las galletitas GN y de galletitas de chocolate libres de gluten encontradas en el mercado argentino.

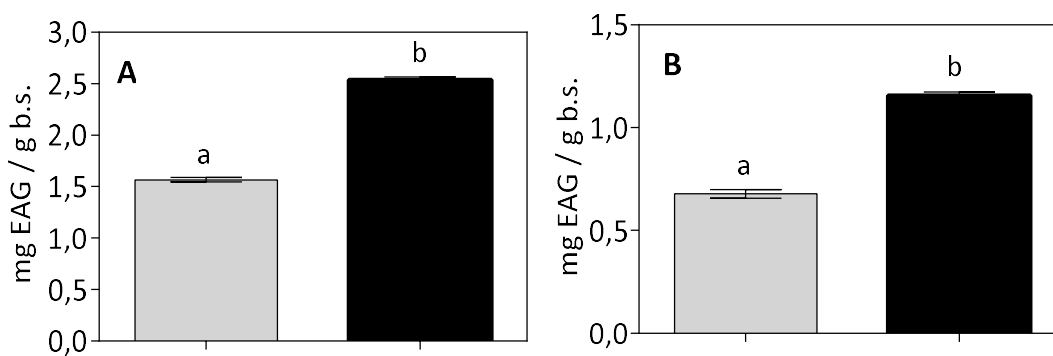
Producto	FDT (g/100 g)
<b>Galletita GN</b>	<b>4,2</b>
Santa María	2
Maicena	0
DeliCel	0,3
Smams	1
Natuzen	2,4

La fibra está compuesta por una gran variedad de sustancias que incluyen oligo- y polisacáridos y lignina. Se la puede clasificar, según su solubilidad en agua, en fibra soluble y fibra insoluble; o bien según su estructura química o sus efectos fisiológicos, entre otros criterios (Perry y Ying, 2016). La fibra insoluble es menos fermentable y su principal efecto lo ejerce sobre la mecánica intestinal al aumentar el volumen del bolo fecal. La fibra soluble actúa como prebiótico, sosteniendo la microflora del colon e influye en la absorción de nutrientes a través de diversos mecanismos. Aunque cumplen funciones fisiológicas distintas, las actividades de ambas fracciones a veces se solapan y/o actúan de manera sinérgica (Sastre Gallego, 2003). La mayor parte de los alimentos ricos en fibra tienen ambas fracciones de fibra en distinta proporción FDS/FDI. La avena, las ciruelas, el melón, la naranja, y la espinaca, por ejemplo, tienen un contenido de FDS más elevado; mientras que el trigo, las legumbres, y los dátiles, tienen mayores porcentajes de FDI (Sastre Gallego, 2003). Del porcentaje de fibra dietaria de las galletitas GN (**Tabla 4.9**), alrededor del 40% correspondió a FDI, y por consiguiente un 60% a fibra dietaria soluble. Si bien no existe un consenso sobre la proporción de fibra dietaria soluble a fibra dietaria insoluble ideal para una dieta balanceada, en la **Tabla 4.10** puede observarse que la proporción FDI/FDT de las galletitas es afín al de muchas de las frutas estudiadas, las cuales suelen presentar adecuados balances entre ambas fracciones de fibra (Morales de la Peña y col., 2020).

Los resultados de las determinaciones del contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante de la galletita GN versus la galletita C se muestran en la **Figura 4.19**. El CPT y la AA de la galletita GN fueron de  $2,54 \pm 0,03$  y  $1,16 \pm 0,01$  mg EAG/g b.s., respetivamente. Esto representó un aumento del 28% y 30% para cada parámetro

respectivamente en comparación con el control. En base total, el CPT de la galletita GN fue de  $2,25 \pm 0,02$  mg EAG/g, lo cual es comparable al contenido hallado en una manzana (Navarro González y col., 2017). Filipčev y col. (2016) enriquecieron galletitas libres de gluten con jarabe de remolacha en una proporción entre 10 y 40% de sólidos y alcanzaron valores de CPT entre 9,23 y 23,55 mg EAG/g b.s. Žilić y col. (2016) estudiaron el contenido de polifenoles totales en galletitas elaboradas con harina de maíz rico en antocianinas e informaron valores de CPT entre 1,8 y 3,3 mg EAG/g b.s. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la adición del PL puede contribuir, no sólo al aporte de fibra dietaria, sino también a proveer una cantidad interesante de compuestos con potencial actividad bioactiva.

En cuanto al análisis en busca de gluten en la galletita GN, el resultado del enzimoimmunoensayo arrojó un resultado negativo, verificándose la ausencia de gluten en el producto terminado.



**Figura 4.19.** CPT (A) y AA (B) de la galletita control (gris) y la galletita GN (negro).

Diferentes letras en cada gráfico indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Con el objeto de estudiar el comportamiento de estos compuestos luego de la ingesta, se realizó un análisis de digestión *in vitro* y se estudió la AA bioaccesible. En la **Tabla 4.12** se muestran los resultados de estos experimentos junto con los resultados obtenidos por extracción química tradicional. Como era de esperarse, la galletita GN presentó una AA más alta que la galletita C, tanto en la fracción soluble como en la insoluble, resultantes de la simulación digestiva. El contenido de un compuesto en la fracción soluble luego del proceso de digestión simulada puede considerarse una aproximación de



la bioaccesibilidad de dicho compuesto (Verhoeckx y col., 2015). En este análisis, la fracción soluble mostró un leve incremento de la AA en comparación con la extracción química tradicional para la misma muestra, lo cual indica que pudo haber ocurrido una liberación de compuestos con capacidad antioxidante durante el proceso de digestión (Karáš y col., 2017). Archaina y col. (2019), Pastoriza y col. (2011) y Wootton-Beard y col. (2011) reportaron tendencias similares para diferentes matrices alimentarias, aunque no se puede llevar a cabo una comparación directa de los valores absolutos debido a diferencias en la metodología empleada y las unidades equivalentes usadas para expresar los resultados. En cuanto a la fracción insoluble, en este trabajo, la AA hallada fue un orden mayor que la obtenida por extracción química tradicional y la encontrada en la fracción soluble. Además, luego de la digestión *in vitro*, más del 50% de la masa de producto inicial correspondió a esta fracción. Esto sugiere que una importante cantidad de compuestos con capacidad antioxidante lograrían llegar al intestino grueso donde podrían ejercer sus propiedades antioxidantes hasta su excreción. Karáš y col. (2017) explicaron que la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos depende de su interacción con otros componentes de la matriz alimentaria en la que se encuentren. Estos autores describen una interacción con componentes de la fibra dietaria en la que la formación de complejos polifenol-carbohidrato podría tener un efecto positivo en el transporte de compuestos fenólicos a través del tracto digestivo. En concordancia con Karáš y col. (2017), Paturi y col. (2018) explicaron que cuando los polifenoles se consumen junto con fibra dietaria, el efecto protector de esta última ayuda a que los compuestos fenólicos lleguen al intestino grueso donde pueden ser metabolizados por la microbiota, existiendo un efecto sinérgico entre estos dos compuestos. Hoy en día se sabe que la microbiota cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, así como también en el proceso metabólico de compuestos fenólicos (Verhoeckx y col., 2015). En su trabajo, Paturi y col. (2018) reportaron un aumento del número total de bacterias de la microbiota intestinal de ratas alimentadas con extractos de grosella negra, e informaron que el efecto observado era mayor cuando la dieta estaba suplementada con fibra dietaria. Otros estudios muestran que el sistema gastrointestinal se encuentra expuesto a especies de oxígeno reactivas de manera constante (Halliwell y col., 2005). Por consiguiente, la actividad de compuestos antioxidantes que pueden ayudar a mantener el balance redox en estos órganos podría prevenir enfermedades del tracto gastrointestinal relacionadas

con la generación de estas especies de oxígeno reactivas durante el proceso de digestión (Leopoldini y col., 2011).

**Tabla 4.12.** Actividad antioxidante obtenida mediante extracción química tradicional, y en las fracciones soluble e insoluble luego de la digestión *in vitro*.

	Extracción química	Fracción soluble	Fracción insoluble
Galletita C	0,71 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	19 ± 1 <sup>a</sup>
Galletita GN	1,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,27 ± 0,04 <sup>b</sup>	26 ± 2 <sup>b</sup>

Valores expresados como la media ± desviación estándar en mg EAG/g b.s.

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## 4.6. Análisis de las propiedades texturales y estudio de los atributos sensoriales de galletitas de chocolate libres de gluten adicionadas con PL

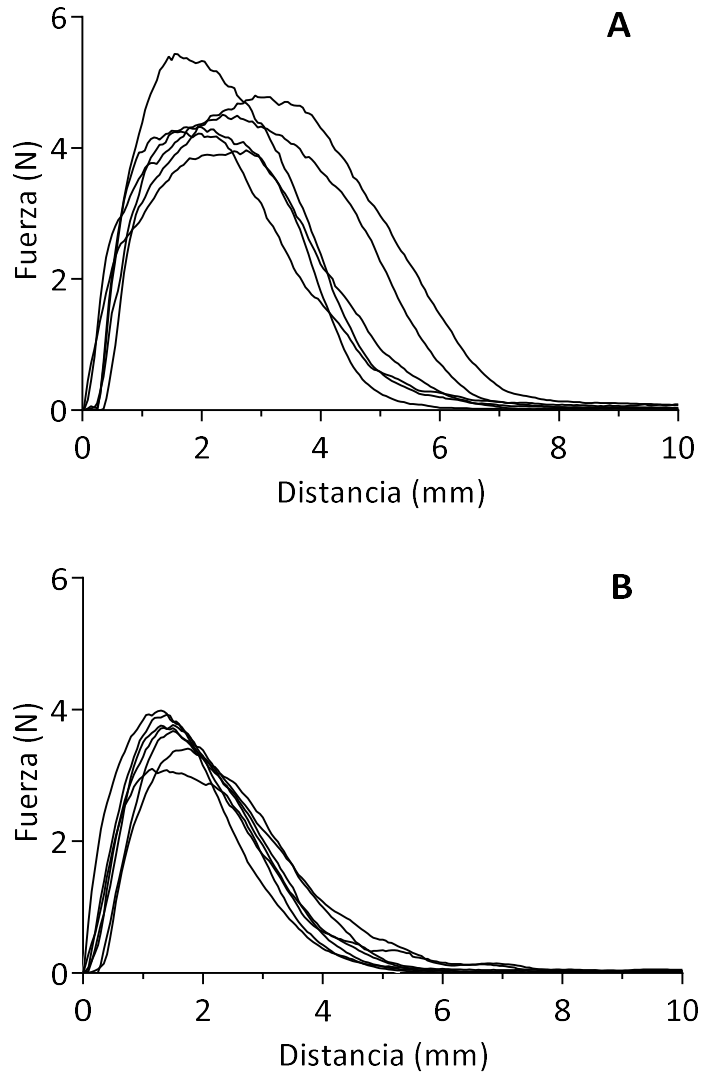
### 4.6.1. Análisis de textura

Las características texturales de las galletitas se evaluaron por análisis instrumental y por análisis de imagen.

#### 4.6.1.a Propiedades mecánicas (análisis instrumental)

En la **Figura 4.20** se muestran las curvas fuerza-distancia características de las dos galletitas estudiadas (C y GN) obtenidas mediante un ensayo de punción. Se puede observar que la fuerza aumentó gradualmente a medida que la punta de medición penetró la muestra, observándose pequeños picos que se asocian a fracturas locales de pequeñas estructuras o capas. Finalmente se alcanzó un valor máximo o fuerza de ruptura luego del cual se produjo una caída abrupta debida a la fractura visible del material. Esta fuerza máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) está relacionada con la firmeza o dureza de la muestra (Šarić y col., 2019)

y representa la resistencia del material a la penetración. La distancia a la cual la fuerza alcanza su valor máximo ( $\Delta F_{\text{máx}}$ ) indica la deformación que sufre el material antes de la ruptura (Sosa y col., 2012) o fracturabilidad de la muestra. Finalmente, el trabajo (W) o área bajo la curva es la energía necesaria para fracturar la muestra, y representa el comportamiento mecánico general de la estructura.



**Figura 4.20.** Curvas de fuerza versus distancia para las galletitas C (A) y las galletitas GN (B).

En la **Tabla 4.13** se presentan los valores promedio de los parámetros mecánicos obtenidos para ambas muestras. Aunque los valores de fuerza hallados fueron bajos para las dos galletitas, la galletita C presentó valores de  $F_{\text{máx}}$  más altos, indicando que ésta

muestra fue significativamente más resistente a la fractura que la galletita GN. Si bien ambas galletitas presentaron una pendiente inicial similar, relacionada con una rigidez equivalente de los materiales, la galletita GN experimentó la fractura a una distancia menor que la muestra control, lo cual sugiere la presencia de una estructura más quebradiza o frágil. Estas diferencias en el comportamiento mecánico de ambas galletitas se reflejan en el trabajo o energía requerida, que en el caso de la muestra control se corresponde con la presencia de picos más altos y redondeados.

Los valores de  $F_{\text{máx}}$  obtenidos se encuentran en el rango de los reportados en bibliografía para distintas formulaciones de galletitas. Por ejemplo, Kulthe y col. (2017) evaluaron galletitas adicionadas con distintas cantidades de harina de mijo y hallaron valores de dureza (determinados como  $F_{\text{máx}}$ ) de entre 3,76 y 17,39 N según el porcentaje de adición y la variedad de mijo usada. Cherățoiu y col. (2018) analizaron distintas formulaciones de galletitas libres de gluten elaboradas con harina de maíz y de avena libre de gluten y hallaron valores de dureza ( $F_{\text{máx}}$ ) de entre 1,8 y 4,21 N. Torres González y col. (2018) estudiaron la textura de galletitas de limón a base de harina de maíz y hallaron valores de fuerza máxima de entre  $6,97 \pm 1,38$  y  $16,83 \pm 1,12$  N. Li Yang y col. (2020) determinaron la dureza de galletitas adicionadas con un extracto de residuo de soja en distintas proporciones y obtuvieron valores de  $F_{\text{máx}}$  de entre 4,70 y 6,90 N. Bhaduri y Navder (2014) estudiaron galletitas dulces libres de gluten preparadas a base de arroz y de quinoa y adicionadas con un polvo liofilizado de arándanos y hallaron valores de dureza ( $F_{\text{máx}}$ ) de entre 3,4 y 8,1 N. Nugraheni y col. (2017) elaboraron galletitas libres de gluten con diferentes mezclas de harinas y almidones (harina de maíz, de mandioca, de sorgo, de mijo, entre otras) y obtuvieron valores de dureza de alrededor de 8,50 N. El efecto del agregado de puré de fruta liofilizado sobre las propiedades texturales de galletitas ha sido estudiado por otros autores y ha mostrado distintas tendencias. Tańska y col (2016) reportaron un aumento de la dureza en galletitas tipo *shortbread* con el aumento del contenido de puré de grosella negra, mientras que Mildner-Szkudlarz y col. (2013) observaron una disminución de la dureza y la resistencia al incrementar la cantidad de puré de manzana liofilizado adicionado a las galletitas. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en el contenido de agua final del producto, así como a cambios en su microestructura debido al aumento de compuestos de la fibra.

**Tabla 4.13.** Parámetros mecánicos obtenidos a partir de las curvas de fuerza versus distancia.

Muestra	Fuerza máxima (N)	Distancia a la fuerza máxima (mm)	Trabajo (J)
Galletita C	4,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	15 ± 1 <sup>b</sup>
Galletita GN	3,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,9 <sup>a</sup>

Valores expresados como la media ± desviación estándar.

Diferentes letras dentro de cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por otro lado, el número de picos, definidos como variaciones de fuerza de más de 0,02 N, se suele relacionar en este tipo de productos con la crujencia del material (Doporto y col., 2017). Si bien ninguna de las dos muestras presentó curvas demasiado aserradas (o *judgeness* en inglés), la galletita control presentó un mayor número de picos que la galletita GN, sugiriendo una textura levemente más crujiente.

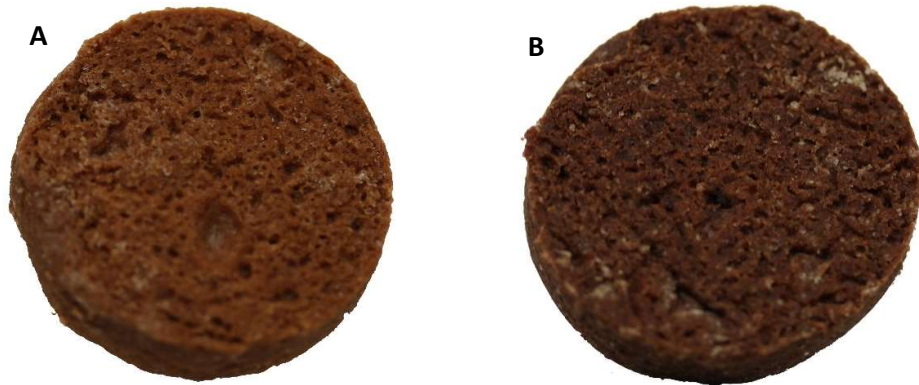
#### 4.6.1.b. Análisis de textura por imágenes

La textura de una imagen se puede entender como los cambios en la dispersión de la luz debida a diferencias en la estructura de la superficie de un objeto (Russ, 2005). En el método de la matriz de co-ocurrencia de grises, la textura de una imagen se describe por la organización espacial de los píxeles de la misma. Este es un método emergente que relaciona de manera empírica los distintos parámetros de imagen (CON, COR, ASM, HOM y ENT) con la textura global y/o con parámetros específicos determinados instrumentalmente mediante distintos ensayos, como ensayos de punción o Análisis de Perfil de Textura (Pieniazek y col., 2018; Roa Andino y col., 2018).

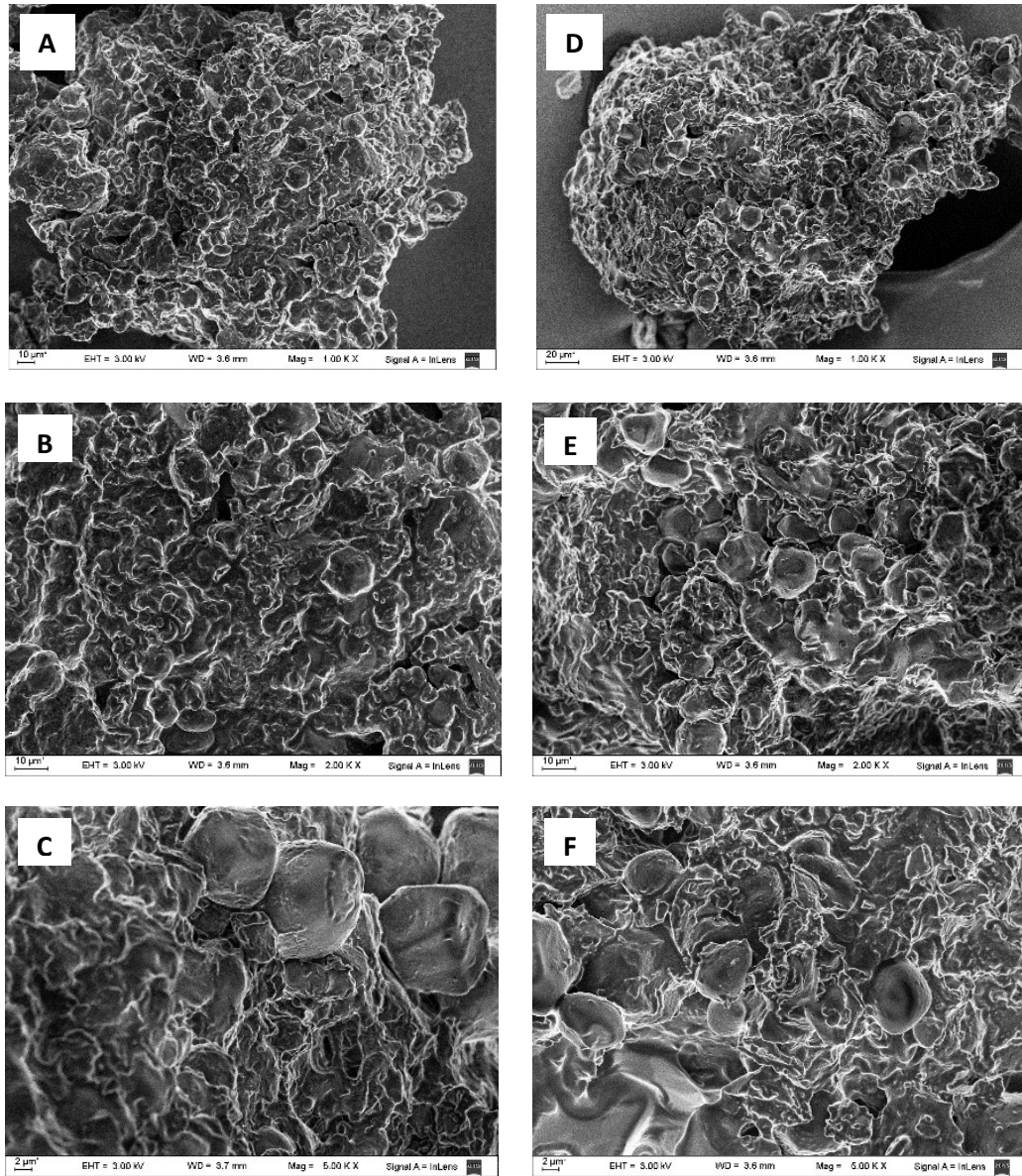
Para realizar un análisis de textura por imagen, el primer paso es seleccionar la metodología a implementar para la toma de las imágenes. El análisis puede hacerse sobre imágenes macroscópicas, tomadas con un sistema de cámara digital o por digitalización por escaneo del material; o bien sobre imágenes microscópicas obtenidas por SEM (Karimi y col., 2012; Laddi y col., 2013; Pieniazek y col., 2018). Según el tipo de muestra y los instrumentos disponibles, un método puede ser conveniente sobre el otro. En este trabajo se decidió estudiar dos métodos de captura de imagen. En la **Figura 4.21** se presentan las fotografías del dorso de ambas galletitas tomadas con una cámara digital,

mientras que la **Figura 4.22** muestra las imágenes SEM obtenidas del interior de ambas muestras de galletitas con los distintos aumentos empleados.

En las imágenes tomadas con la cámara digital se puede apreciar la estructura porosa del dorso de las galletitas, la cual fue similar en el interior de las mismas. Por otro lado, las imágenes de microscopía mostraron partículas independientes de formas redondeadas, y estructuras continuas, irregulares de tamaños diversos. Esta organización heterogénea estaría conformada por gránulos de almidón no gelatinizados, rodeados de una matriz compleja de proteínas, almidón gelatinizado y grasa fundida y vuelta a solidificar (Brites y col., 2019; Duta y Culetu, 2015).



**Figura 4.21.** Fotografías del dorso de las galletitas C (A) y GN (B) tomadas con la cámara digital.



**Figura 4.22.** Imágenes SEM de las galletitas C (A, B y C) y GN (D, E y F) con los distintos aumentos empleados: 1000x (A y D), 2000x (B y E) y 5000x (C y F).

La **Tabla 4.14** muestra los parámetros texturales obtenidos luego de realizar el análisis de las imágenes obtenidas por SEM. Dado que se evaluaron tres aumentos para la adquisición de las imágenes, se hizo un primer análisis para determinar cuál era el más adecuado para el análisis textural de este producto. En primer lugar, al comparar los resultados obtenidos con los distintos aumentos para cada galletita, no se encontraron

diferencias significativas utilizando las magnificaciones 1000x y 2000x. En cambio, con el aumento de 5000x sí se observaron diferencias significativas, probablemente como consecuencia de pérdida de información de la superficie, que presenta estructuras de tamaño del orden 1000x. En general las imágenes capturadas con el aumento de 1000x mostraron ser más homogéneas y tener mejor correlación entre píxeles vecinos por lo que se decidió usar estas imágenes, que además tienen la ventaja de requerir menor potencia de equipamiento. En la **Tabla 4.15** se muestran los valores obtenidos para los cinco parámetros texturales estudiados sobre las muestras C y GN con las imágenes obtenidas por SEM con el aumento 1000x, y empleando la cámara digital. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las imágenes obtenidas por ambos métodos para los cinco parámetros estudiados ( $p < 0,05$ ). Los parámetros COR, ASM y HOM dieron más altos para las imágenes obtenidas con la cámara digital que para las imágenes SEM, mientras que lo opuesto se vio para los parámetros CON y ENT. Esto puede sugerir que un método de adquisición de imágenes es más sensible que el otro para resolver ciertos parámetros, pero menos para otros.

**Tabla 4.14.** Parámetros texturales obtenidos por análisis de imagen de las fotografías SEM con los aumentos 1000x, 2000x y 5000x para las galletitas C y GN.

Muestra	Método de adquisición de imágenes	Parámetros de textura				
		CON	COR	ASM	HOM	ENT
C	SEM 1000x	0,89 <sup>b</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,74 <sup>a</sup>	7,48 <sup>a</sup>
	SEM 2000x	0,89 <sup>b</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,75 <sup>a</sup>	7,49 <sup>a</sup>
	SEM 5000x	0,62 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>	7,11 <sup>b</sup>
GN	SEM 1000x	0,74 <sup>a</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,76 <sup>a</sup>	7,42 <sup>a</sup>
	SEM 2000x	0,82 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,75 <sup>a</sup>	7,44 <sup>a</sup>
	SEM 5000x	0,71 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>	7,42 <sup>a</sup>

Diferentes letras en cada columna para una misma muestra indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



Más allá de estas diferencias, la tendencia observada por ambos métodos de adquisición de imágenes fue la misma. En las **Tabla 4.16** se muestran los mismos parámetros de imagen, pero se comparan los resultados obtenidos para las dos galletitas por un mismo método de adquisición de imágenes. El parámetro CON está relacionado con la dureza de un material. Como puede observarse por ambas técnicas, el valor de este parámetro fue mayor para la muestra C que para la galletita GN, lo cual sugiere que la primera presentó una dureza mayor, tal como se observó por el análisis instrumental (**Figura 4.20** y **Tabla 4.13**). El parámetro ASM, por otro lado, da idea de la uniformidad de una muestra: cuanto mayor es el valor de ASM, más uniforme es su textura, lo cual puede relacionarse con la homogeneidad y su suavidad en determinaciones sensoriales. Esta medida también dio mayor en la muestra C determinada por ambos métodos de captura de imagen. Los parámetros COR, HOM y ENT no mostraron diferencias significativas entre ambas muestras por ninguno de los dos métodos de adquisición de imágenes.

**Tabla 4.15.** Parámetros de textura por análisis de imagen para las galletitas C y GN obtenidos por SEM 1000x y cámara digital (CDC).

Muestra	Método de adquisición de imágenes	Parámetros de textura				
		CON	COR	ASM	HOM	ENT
C	CDC	0,73 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>	6,11 <sup>b</sup>
C	SEM 1000x	0,89 <sup>b</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,74 <sup>b</sup>	7,48 <sup>a</sup>
GN	CDC	0,65 <sup>b</sup>	0,88 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>	6,10 <sup>b</sup>
GN	SEM 1000x	0,74 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,76 <sup>b</sup>	7,42 <sup>a</sup>

Diferentes letras minúsculas dentro de cada columna para una misma muestra indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre métodos de adquisición de imágenes.

Con el fin de estudiar la aplicabilidad del método de GLCM para describir la textura de diferentes alimentos, numerosos trabajos buscan asociar los valores texturales de imagen con los obtenidos de manera instrumental. Si bien, algunos autores relacionan algunos de los parámetros de imagen con ciertas características específicas de textura como la dureza, la suavidad superficial, la uniformidad, entre otros, en general se observó

que los distintos parámetros en su conjunto contribuyen a caracterizar la textura de un alimento. Por lo tanto, para asociar los parámetros obtenidos por métodos instrumentales con estos valores, se suelen hacer correlaciones entre varios parámetros obtenidos por análisis GLCM con un parámetro de textura instrumental. Por ejemplo, Karimi y col. (2012) evaluaron la textura de distintas muestras de pan mediante un ensayo de punción y por GLCM y hallaron muy buena correlación entre la dureza instrumental y los cuatro parámetros de imagen estudiados, tanto de manera individual como en conjunto. Pieniazek y col. (2016) realizaron ensayos instrumentales de TPA (Texture Profile Analysis) y estudios de análisis de imagen por GLCM sobre muestras de lentejas cocidas y liofilizadas. Estos autores obtuvieron coeficientes de correlación elevados entre los parámetros instrumentales dureza, gomosidad, masticabilidad y adhesividad con los cinco parámetros de imagen tanto estudiados de manera independiente, así como también con los cinco parámetros en combinación. De manera análoga, en el presente trabajo se realizó una regresión lineal múltiple (RLM) entre el parámetro  $F_{\text{máx}}$  obtenido por el ensayo instrumental de punción y los parámetros texturales derivados del análisis de imágenes macroscópicas y microscópicas (**Tabla 4.17**).

**Tabla 4.16.** Parámetros de textura por análisis de imagen para las galletitas control (GC) y galletitas adicionadas con grosella negra (GN).

Muestra	Método de adquisición de imágenes	Parámetros de textura				
		CON	COR	ASM	HOM	ENT
C	SEM 1000x	0,89 <sup>b</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,74 <sup>a</sup>	7,48 <sup>a</sup>
GN	SEM 1000x	0,74 <sup>a</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	7,42 <sup>a</sup>
C	CDC	0,73 <sup>b</sup>	0,88 <sup>a</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,95 <sup>a</sup>	6,11 <sup>a</sup>
GN	CDC	0,65 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>

Diferentes letras minúsculas dentro de cada columna para un mismo método de adquisición de imágenes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras.

**Tabla 4.17.** Regresión lineal múltiple entre la textura instrumental y los parámetros de textura obtenidos por análisis de imágenes de las galletitas C y GN.

Muestra	Método de adquisición de imágenes	Ecuación RLM	R <sup>2</sup>
GN	CDC	F=34,18-34,75[CON]-19,31[COR]-8,70[ASM]-12,28[HOM]- 0,87[ENT]	0,99
C	CDC	F=33,27-15,64[CON]-65,70[COR]-27,39[ASM]-42,70[HOM]- 0,14[ENT]	0,83
GN	SEM-1000x	F=58,97-12,50[CON]+30,11[COR]+62,88[ASM]-123,25[HOM]+2,12[ENT]	0,97
C	SEM-1000x	F=14,83+2,18[CON]+30,05[COR]+ 5,50[ASM]-21,98[HOM]-2,94[ENT]	0,95

F = F<sub>máx</sub> determinada por el método instrumental.

La RLM mostró la capacidad del análisis de imágenes de predecir la dureza determinada instrumentalmente (los coeficientes de regresión de las ecuaciones fueron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ )). Los valores de R<sup>2</sup> mostraron que el modelo explicó más del 95% de la variabilidad asociada a los parámetros de imagen e instrumentales [99% (GN-CDC); 83% (C-CDC); 97% (GN-SEM 1000x); 95% (C-SEM 1000x)]. Ello prueba que el análisis de los parámetros de imagen, obtenidos tanto con la cámara digital como por SEM, puede usarse como aproximación de la dureza determinada por el método instrumental.

#### 4.6.2. Análisis sensorial

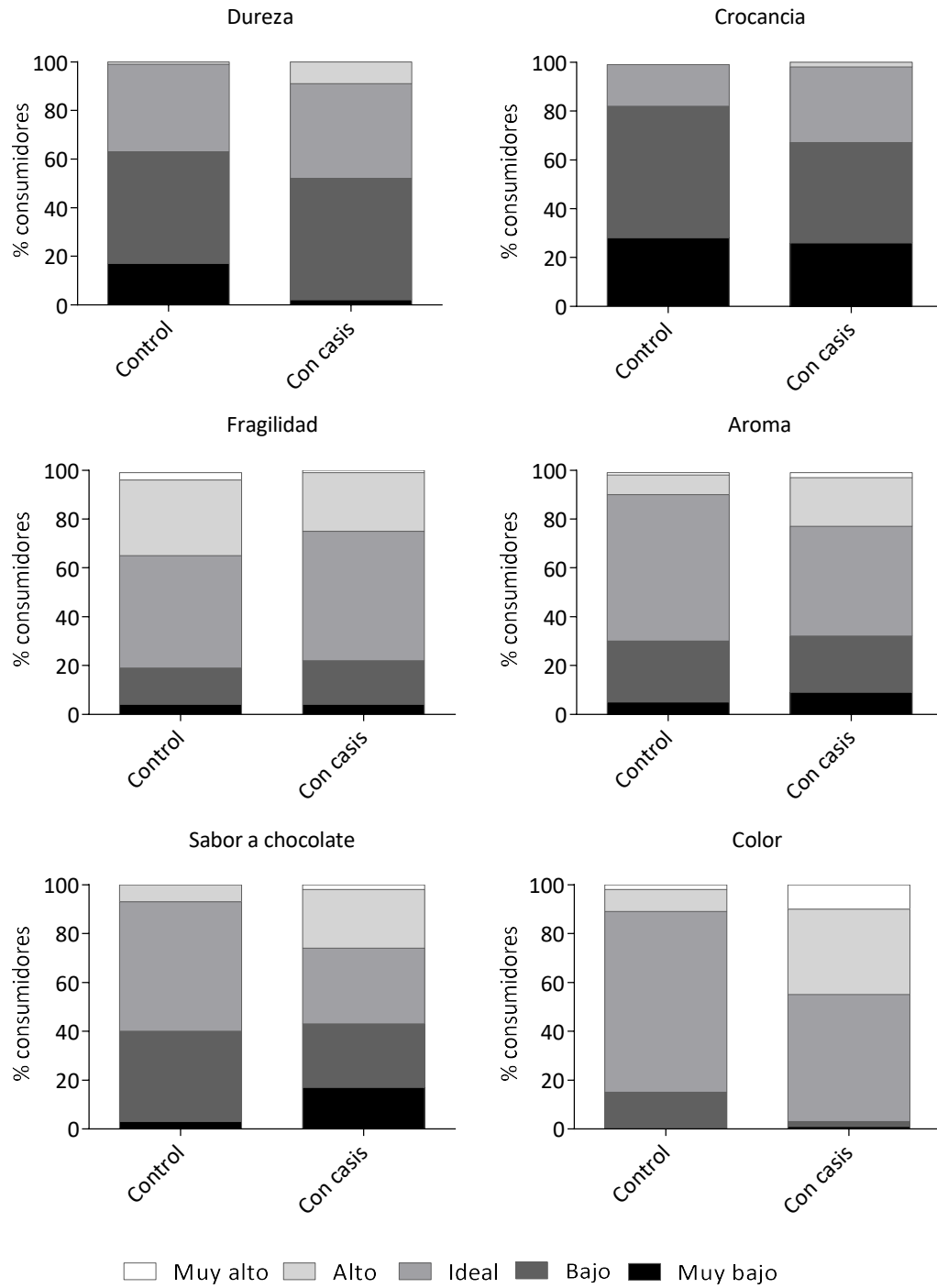
Las propiedades organolépticas como el sabor, el aroma y la textura son propiedades sensoriales que no pueden describirse completamente por una única técnica instrumental. Por consiguiente, los análisis sensoriales cumplen un rol fundamental para estudiar este tipo de características. En este trabajo se realizaron ensayos semi-cuantitativos con consumidores, en los que participaron 95 personas. Los atributos seleccionados para el análisis sensorial estuvieron vinculados a la textura (dureza, crocancia y fragilidad), al *flavor* (sabor a chocolate y aroma), y a la apariencia (color).

En principio se realizó un análisis de intensidad de atributos, cuyos resultados se muestran en la **Figura 4.23**. Ambas galletitas presentaron entre 36 y 39% de consumidores que apreciaron la dureza como ideal, mientras que entre el 52 y el 63% de

los jueces la percibieron más baja del ideal, y sólo entre un 1 y un 9% de los asesores la percibieron más alta de lo ideal. En cambio, la crocancia de la galletita control presentó un 17% de consumidores que la hallaron ideal y un 82% que la señalaron como baja o muy baja, mientras que en la galletita GN el porcentaje de personas que la percibieron como ideal aumentó a 31% y disminuyó el porcentaje de respuestas que la hallaron menor a la ideal, lo que se condice con los picos más agudos en las curvas fuerza-distancia (**Figura 4.20**) correspondientes a esta galletita.

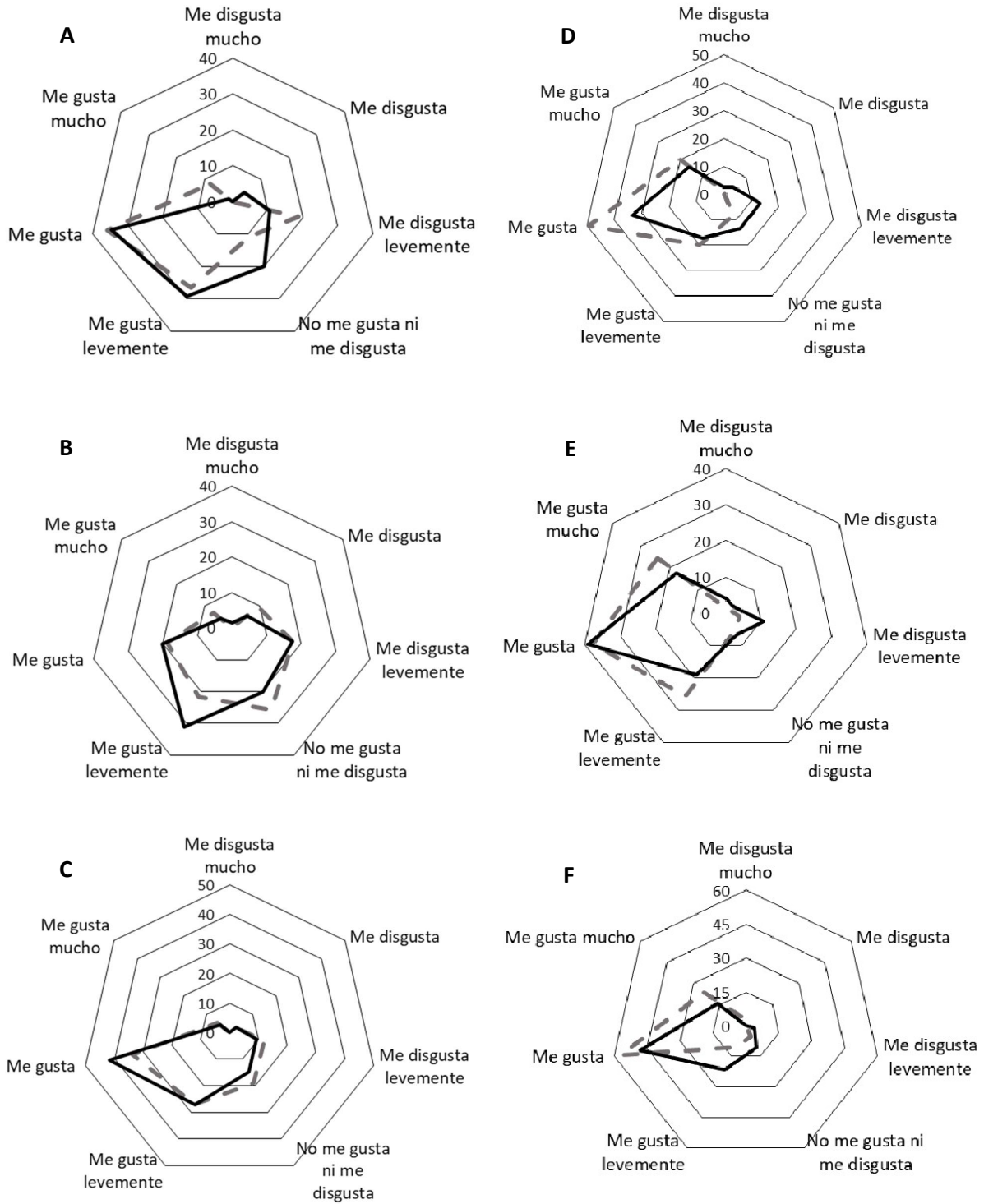
La fragilidad fue señalada como ideal por alrededor del 50% de los consumidores de la población encuestada, siendo la galletita control percibida como levemente más frágil que la GN, lo cual no se correspondería con las determinaciones instrumentales. Doporto y col. (2017) analizaron la textura de galletitas y afirmaron que la relación entre algunos atributos percibidos sensorialmente y los parámetros de textura determinados por métodos instrumentales puede no ser muy clara. Esto normalmente se debe a una interpretación imprecisa de los términos empleados para describir los atributos texturales cuando se trabaja con paneles de consumidores no entrenados.

Respecto al aroma, ambas galletitas presentaron un alto porcentaje de consumidores que lo encontró en un nivel ideal (60% para la galletita control), aunque en la galletita GN este valor fue un 15% menor que en la galletita control. De manera similar, el sabor a chocolate fue percibido como ideal por el 53% de los consumidores en la galletita control, pero este porcentaje disminuyó a 31% en la galletita GN. Estos dos atributos presentaron una respuesta dual, siendo percibidos como más altos que el ideal por unos consumidores y más bajos por otros. En cuanto al atributo color, más de un 50% de las personas encuestadas lo apreciaron como ideal en ambas galletitas, aunque este porcentaje bajó de 74 a 52% entre la galletita control y la GN debido a un aumento del porcentaje de consumidores que lo señalaron como alto o muy alto.



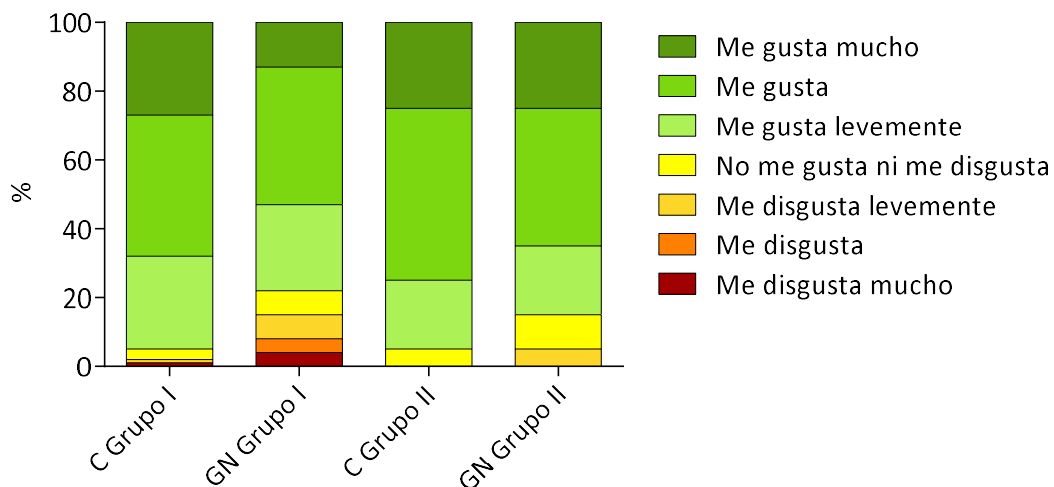
**Figura 4.23.** Nivel de intensidad para cada atributo estudiado en el análisis de intensidad de atributos para las galletitas control y GN.

La **Figura 4.24** muestra los resultados del test de nivel de satisfacción de atributos realizado con una escala hedónica de 7 puntos. Con respecto a la textura, la dureza presentó porcentajes similares en las categorías de agrado (“Me gusta” y “Me gusta levemente”) para ambas galletitas e incluso en la muestra GN disminuyó el porcentaje de desagrado, observándose un viraje de “Me disgusta levemente” a “No me gusta ni me disgusta” (**Fig. 4.24 A**). Para el atributo crocancia (**Fig. 4.24 B**), las galletitas GN también presentaron mayor porcentaje de agrado que las galletitas C, observándose un aumento en la categoría “Me gusta levemente”, en detrimento de las categorías de indiferencia “No me gusta ni me disgusta” y de desagrado. En cuanto a la fragilidad (**Fig. 4.24 C**) predominaron las apreciaciones en las categorías de agrado (“Me gusta” y “Me gusta levemente”) sin diferencias importantes entre ambas galletitas. Al analizar el aroma, la galletita GN (**Figura 4.24 D**) presentó menor porcentaje de agrado que la galletita C, apareciendo una proporción de personas que manifestaron un leve disgusto hacia la muestra GN que no expresaron hacia la muestra C. En cuanto al sabor a chocolate (**Figura 4.24 E**), la mayoría de los consumidores manifestaron agrado por ambas galletitas, observándose un importante predominio en las categorías “Me gusta levemente”, “Me gusta” y “Me gusta mucho”, y solo un bajo porcentaje de personas que indicó que las galletitas GN le disgustaban levemente. Con respecto al color (**Figura 4.24 F.**), ambas galletitas mostraron mayoritariamente categorías de agrado, siendo levemente superior el agrado para las galletitas C respecto de las GN.



**Figura 4.24.** Resultados del test de nivel de satisfacción de atributos: dureza (A), crocancia (B), fragilidad (C), aroma (D), sabor a chocolate (E) y color (F) para las galletitas C (línea punteada gris) y GN (línea continua negra).

Los resultados del test de satisfacción global mostraron que ambas muestras presentaron una muy buena calificación por parte de los consumidores, mostrando más del 79% de las respuestas en las categorías de agrado. Para un mejor análisis de estos resultados se dividió a la población encuestada en dos grupos dependiendo de si seguían o no una dieta libre de gluten. En el grupo I se incluyeron las personas que consumían productos de panadería y repostería tradicionales, mientras que en el grupo II se reunieron a aquellas personas que consumían regularmente productos de panadería y repostería libres de gluten. La **Figura 4.25** muestra los resultados del test de satisfacción global de ambas galletitas para los grupos I y II. A pesar de que el agregado del ingrediente de grosella negra provocó una disminución en el porcentaje de respuestas positivas (“Me gusta levemente”, “Me gusta” y “Me gusta mucho”) del 94% al 79% para el grupo I y de 95 al 85% para el grupo II, ambas muestras fueron globalmente aceptadas por la mayoría de los consumidores.



**Figura 4.25.** Resultados del test de satisfacción global del grupo I: (C Grupo I) galletita C y (GN Grupo I) galletita GN; y para el grupo II: (C Grupo II) galletita C y (GN Grupo II) galletita GN.

Al comparar los resultados del test de satisfacción global obtenidos para los grupos I y II entre sí, se descubrió que el porcentaje de respuestas de las categorías de desagrado fue menor para los encuestados del Grupo II en ambas muestras: 0 y 5% para la galletita



C y GN respectivamente, en relación a un 3 y 15% para las misma muestras en el Grupo I. Incluso entre las categorías de agrado, el número de consumidores que escogió el nivel “me gusta mucho” fue apreciablemente más alto en el Grupo II que en el Grupo I (**Figura 4.26**). Esto podría deberse a que la textura y las características organolépticas de los productos libres de gluten suelen ser diferentes de las de los productos análogos regulares y pueden no ser tan bien aceptadas por personas que no están habituadas a consumir este tipo de alimentos (Doportó y col., 2017; Pagliarini y col., 2010). De todos modos, es importante destacar el elevado nivel de satisfacción global obtenido por parte del total de consumidores para la galletita GN (79% en categorías de agrado), sugiriendo que este producto podría estar orientado no sólo a la población que sigue una dieta libre de gluten, sino también a una población más grande de consumidores que se interesen por su aporte de compuestos bioactivos.



**Figura 4.26.** Test de satisfacción global para el grupo I (línea punteada gris) y el grupo II (línea continua negra) para la galletita GN.

# CONCLUSIONES

## 5. CONCLUSIONES

### Aprovechamiento optimizado del jugo de grosella negra:

#### *Tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF)*

- **La tecnología PEF** demostró ser una técnica con gran potencial para favorecer la extracción de compuestos bioactivos durante la elaboración de jugo de grosella negra. Esta técnica presenta numerosas ventajas frente a otras metodologías de extracción debido a su corto tiempo de aplicación y bajo costo energético, permitiendo además evitar el uso de solventes orgánicos, lo cual resuelve la problemática asociada a la disposición de los mismos.
- **La cámara de electroporación**, diseñada y construida a medida, resultó adecuada para el tratamiento de frutas de grosella negra enteras sin el agregado de solvente. Además, el diseño permitió controlar la temperatura del proceso y observar las muestras durante el tratamiento. También se tuvo en cuenta su mantenimiento, considerando un diseño que permitiera un fácil intercambio de los electrodos en el caso de observar deterioro como oxidación de los mismos.
- **La selección de las condiciones y los parámetros adecuados del proceso PEF** resultaron fundamentales para obtener jugos de grosella negra enriquecidos en compuestos bioactivos. Un tratamiento muy suave, es decir de muy baja energía (debido a una baja intensidad de campo eléctrico o corto tiempo de tratamiento), no resultaría suficiente para aumentar la permeabilidad de la membrana y por ende la extracción de los compuestos de interés no se vería aumentada. Un tratamiento muy severo, es decir de muy alta energía (especialmente por un campo eléctrico muy elevado) puede provocar la degradación de compuestos bioactivos con su consiguiente pérdida de actividad.
- **La temperatura** mostró una gran influencia en el efecto de la electroporación, por lo que este parámetro debe considerarse como una variable adicional al momento

de diseñar un procedimiento de electroporación. Además, es necesario tener en cuenta que el propio tratamiento puede provocar un aumento de la temperatura según las condiciones y el modo de aplicación del mismo, lo cual también influirá en el proceso de extracción. Es importante resaltar que en frutos como las *berries* las características propias de los tejidos, la estabilidad térmica de los compuestos de interés y el uso final del producto pueden requerir un control más estricto de esta variable.

- La técnica de superficies de respuesta y la función deseabilidad permitieron **optimizar** las variables de trabajo “campo eléctrico” y “número de pulsos” lográndose producir un jugo con incrementos del 19% para CPT y 45% para AA.
- Fue posible identificar mediante distintas **técnicas analíticas** los principales compuestos bioactivos presentes en el jugo, y evaluar la influencia del tratamiento PEF sobre la concentración final de los distintos grupos de compuestos fenólicos.

### *Ingrediente funcional en polvo*

- El **secado por aspersión** permitió conservar los compuestos bioactivos presentes en el jugo, sugiriendo que las condiciones aplicadas fueron adecuadas para obtener un polvo con buenas propiedades funcionales.
- La aplicación del tratamiento de electroporación no afectó significativamente las **características físicas del polvo** como el contenido y la actividad de agua, la solubilidad y el color, respecto del control. Este hecho sugiere que puede obtenerse un jugo altamente mejorado respecto del aporte de compuestos antioxidantes aplicando la tecnología PEF, sin causar un detrimento en otras variables de gran importancia en polvos.
- Debido a su atractivo color y relativamente buenas propiedades físicas, este polvo podría ser incorporado como un **colorante natural**, así como un **ingrediente funcional** en distintos alimentos.

**Aprovechamiento de residuo de grosella negra:**

- La caracterización del **residuo** evidenció el alto valor nutricional de este material, que es comúnmente desechado por la industria. La torta remanente luego del prensado en frío no sólo presentó un alto contenido de polifenoles y actividad antioxidante, sino también una alta concentración de fibra dietaria lo que posibilitó su utilización como ingrediente funcional para la elaboración de alimentos libres de gluten (galletitas de chocolate).
- Las galletitas adicionadas con el ingrediente obtenido a partir del residuo de grosella negra presentaron 2,5 veces más fibra dietaria total que las galletitas control. El contenido de fibra alcanzado fue de 4,2% en base tal cual, lo cual habilitaría el uso de la declaración “**Fuente de fibra**” según lo establecido en el Código Alimentario Argentino.
- La galletita adicionada con grosella negra además presentó un contenido de **compuestos bioactivos y actividad antioxidante** mucho mayor que la galletita control, e incluso alcanzó valores comparables a los de frutas como la manzana.
- En el ensayo de **digestión *in vitro*** se observó que más del 50% de la masa de galletita ingerida pasó a la fracción insoluble, lo cual indicaría que esa fracción llegaría al intestino grueso. Esto sugiere que una importante cantidad de compuestos con capacidad antioxidante podrían ejercer sus propiedades en este órgano hasta su excreción.
- El **análisis de textura** del producto se realizó mediante un método instrumental y por análisis de imágenes, observándose leves diferencias en la textura entre ambas galletitas. Sin embargo, un análisis sensorial mostró que estos cambios no fueron críticos para la aceptación del producto.
- El **análisis sensorial** realizado con consumidores evidenció que los atributos de sabor a chocolate y aroma fueron los parámetros críticos al adicionar el ingrediente de grosella negra a las galletitas. El análisis de satisfacción global arrojó resultados positivos sobre la galletita adicionada con el ingrediente de grosella negra,

lográndose valores de aceptación del 79% para la población de consumidores acostumbrada a consumir productos de panadería convencionales y un 85% para los consumidores habituados a consumir alimentos libres de gluten. Por otro lado, este último análisis puso de manifiesto la importancia de recurrir a grupos de consumidores que sean representativos de la población *target* del producto en estudio, en este caso, personas habituadas a consumir productos libres de gluten, ya que la percepción sobre un alimento puede cambiar de acuerdo a los hábitos alimenticios de cada individuo.

### **CONCLUSIÓN FINAL:**

En este trabajo de tesis se demostró que un aprovechamiento integral de frutas como la grosella negra puede lograrse combinando distintas técnicas y procesos. Además, se sugirieron dos aplicaciones muy diversas para las distintas fracciones obtenidas, abriendo un abanico de posibilidades para dar distintos usos a este tipo de frutas y sus residuos.

En particular, en la presente tesis se logró obtener un jugo de grosella enriquecido en compuestos fenólicos empleando una técnica emergente no térmica y sin uso de solventes, para luego obtener, a partir del mismo, un ingrediente deshidratado de alta funcionalidad. Adicionalmente, se logró valorizar el residuo remanente de la obtención del jugo, desarrollando un ingrediente rico en fibra y en compuestos fenólicos con buenos resultados para el desarrollo de galletitas de libres de gluten, las cuales mostraron una alta aceptabilidad sensorial.

Para alcanzar satisfactoriamente los objetivos planteados, se hizo uso de varias técnicas de secado de alimentos líquidos y sólidos, así como también numerosas metodologías de análisis de compuestos bioactivos, y de caracterización física y sensorial de los distintos productos obtenidos.

Este aprovechamiento integral de la fruta permitiría agregar valor a su producción local y además contribuir con alternativas para la explotación de los residuos generados a partir de la misma, en vistas de la preocupación mundial por la reducción de pérdidas y desperdicios de alimentos.



Maite Gagnetten

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrositio (2017). Frutas finas: situación de los cultivos en diferentes regiones argentinas. <https://www.agrositio.com.ar/noticia/189025-frutas-finas-situacion-de-los-cultivos-en-diferentes-regiones-argentinas>
- Allwood, J. W., Woznicki, T. L., Xu, Y., Foito, A., Aaby, K., Sungurtas, J., Freitag, S., Goodacre, R., Stewart, D., Remberg, S. F., Heide, O. M., & Sønsteby, A. (2019). Application of HPLC–PDA–MS metabolite profiling to investigate the effect of growth temperature and day length on blackcurrant fruit. *Metabolomics*, 15(1), 12.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67 (4), 188-205.
- Anttonen, M. J., & Karjalainen, R. O. (2006). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Phenolics Grown either Conventionally or Organically. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20), 7530-7538.
- AOAC (2000, 2005, 2006). Official methods of analysis of AOAC international. (18th ed.). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemist.
- Archaina D. A. (2019). Desarrollo de golosinas deshidratadas de alta calidad a partir de grosella negra. Tesis doctoral.
- Archaina, D., Sosa, N., Rivero, R., & Schebor, C. (2019). Freeze-dried candies from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and yoghurt. Physicochemical and sensorial characterization. *LWT*, 100, 444-449.
- Archaina, D., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2018). Physical and functional properties of spray-dried powders from blackcurrant juice and extracts obtained from the waste of juice processing. *Food Science and Technology International*, 24(1), 78-86.
- Astigarraga-Urquiza, J.; Astigarraga-Aguirre, J. (1995). Hornos de alta frecuencia y microondas. Teoría, cálculo y aplicaciones. Mc Graw-Hill.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013).



- Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4), 426-436.
- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., Saraiva, J. A., Raso, J., Martin-Belloso, O., Witrowa-Rajchert, D., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015 a). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77, 773-798.
- Barba, F. J., Galanakis, C. M., Esteve, M. J., Frigola, A., & Vorobiev, E. (2015 b). Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high-added value compounds from blackberries. *Journal of Food Engineering*, 167, 38-44.
- Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845.
- Bhaduri S. & Navder K. P. (2014). Freeze Dried Blueberry Powder Fortification Improves the Quality of Gluten Free Snacks. *Journal of Food Processing and Technology*. 5(12).
- Bobinaitė, R., Pataro, G., Lamanauskas, N., Šatkauskas, S., Viškelis, P., & Ferrari, G. (2015). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5898-5905.
- Bonarska-Kujawa, D., Cyboran, S., Żyłka, R., Oszmiański, J., & Kleszczyńska, H. (2014). Biological Activity of Blackcurrant Extracts (*Ribes nigrum L.*) in Relation to Erythrocyte Membranes. *BioMed Research International*. 1-13.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(7), 3901-3909.
- Brites, L. T. G. F., Ortolan, F., Silva, D. W. da, Bueno, F. R., Rocha, T. de S., Chang, Y. K., & Steel, C. J. (2019). Gluten-free cookies elaborated with buckwheat flour, millet flour and chia seeds. *Food Science and Technology*, 39(2), 458-466.
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812–2831.

- Bruzzone I. (2009). Frambuesas, moras y grosellas. Dirección Nacional de Agroindustria. Cadenas alimentarias.
- Caliskan, G., & Dirim, S. N. (2016). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, 287, 308-314.
- Caminti A. (2013). Cultivo de grosellas. Centro PyME – ADENEU. Agencia San Martín de los Andes. Estación experimental agropecuaria Bariloche. Centro Regional Patagonia Norte. INTA.
- Can Karaca, A., Guzel, O., & Ak, M. M. (2016). Effects of processing conditions and formulation on spray drying of sour cherry juice concentrate: Spray drying of sour cherry juice concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 449-455.
- Carbonell-Capella, J. M., Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). “Ice” juice from apples obtained by pressing at subzero temperatures of apples pretreated by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 187-194.
- Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., & Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564-572.
- Cherățoiu C-M., Ognean M., Ognean C. F. & Danciu I. (2018). Comparative analyses for gluten-free biscuits from Mixture oat and corn. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. Vol. no. 1.
- Choong, Y.-K., Mohd Yousof, N. S. A., Jamal, J. A., & Isa Wasiman, M. (2019). Determination of anthocyanin content in two varieties of Hibiscus Sabdariffa from Selangor, Malaysia using a combination of chromatography and spectroscopy. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 3(2), 067-075.
- Clark, C. J., Cooney, J. M., Hopkins, W. A., & Currie, A. (2018). Global Mid-Infrared Prediction Models Facilitate Simultaneous Analysis of Juice Composition from Berries of Actinidia, Ribes, Rubus and Vaccinium Species. *Food Analytical Methods*, 11(11), 3147-3160.
- Código Alimentario Argentino (CAA). Artículo 1383 - (Resolución Conjunta SPReI N° 131/2011 y SAGyP N° 414/2011).

- Código Alimentario Argentino (CAA). Artículo 1383 - (Resolución Conjunta SPReI N° 131/2011 y SAGyP N° 414/2011).
- Contreras-Lopez, E., Castañeda-Ovando, A., González-Olivares, L. G., Añorve-Morga, J., & Jaimez-Ordaz, J. (2014). Effect of Light on Stability of Anthocyanins in Ethanolic Extracts of *Rubus fruticosus*; *Food and Nutrition Sciences*, 05(06), 488-494.
- Coria Cayupán, Y. S., Ochoa, M. J., & Nazareno, M. A. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. Fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126(2), 514-519.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 9(1), 85-91.
- da Silva, T. F., & Conti-Silva, A. C. (2018). Potentiality of gluten-free chocolate cookies with added inulin/oligofructose: Chemical, physical and sensory characterization. *LWT*, 90, 172-179.
- Delsart, C., Cholet, C., Ghidossi, R., Grimi, N., Gontier, E., Gény, L., Vorobiev, E., & Mietton-Peuchot, M. (2014). Effects of Pulsed Electric Fields on Cabernet Sauvignon Grape Berries and on the Characteristics of Wines. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 424-436.
- Derringer, G. & Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219.
- Djordjević, B., Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Vulić, T., Pljevljakušić, D., & Oparnica, Č. (2013). Biochemical Properties of the Fresh and Frozen Black Currants and Juices. *Journal of Medicinal Food*, 16(1), 73-81.
- Donsì, F., Ferrari, G., Fruilo, M., & Pataro, G. (2010). Pulsed Electric Field-Assisted Vinification of Aglianico and Piediroso Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11606-11615.
- Dopporto, M., Sacco, F., Viña, S. Z., & Alejandra García, M. (2017). Quality and Technological Properties of Gluten-Free Biscuits Made with *Pachyrhizus ahipa* Flour as a Novel Ingredient. *Food and Nutrition Sciences*, 08(01), 70-83.

- Du, J., Ge, Z.-Z., Xu, Z., Zou, B., Zhang, Y., & Li, C.-M. (2014). Comparison of the Efficiency of Five Different Drying Carriers on the Spray Drying of Persimmon Pulp Powders. *Drying Technology*. 32(10), 1157-1166.
- Duta & Culetu A. (2015). Evaluation of rheological, physicochemical, thermal, mechanical and sensory properties of oat-based gluten free cookies. *Journal of Food Engineering*. 162, 1-8.
- Etzbach, L., Meinert, M., Faber, T., Klein, C., Schieber, A., & Weber, F. (2020). Effects of carrier agents on powder properties, stability of carotenoids, and encapsulation efficiency of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) powder produced by co-current spray drying. *Current Research in Food Science*. 3, 73-81.
- European Food Safety Authority. (2010). Scientific opinion on dietary reference values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA J* 8:1–77.
- FAO (2013). “Estado mundial de la agricultura y la alimentación”. [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications)
- FAO (2015). “Iniciativa mundial sobre la reducción de las pérdidas y el desperdicio de alimentos”. [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications).
- FDA (2014). Food labeling: revision of the nutrition and supplement facts labels
- Feighery, C. (1999). Fortnightly review: Coeliac disease. *BMJ*, 319(7204), 236-239.
- Fennema O. R. (2000). Química de los alimentos. (2<sup>da</sup> edición). Zaragoza, España.
- Ferrari, C. C., Marconi Germer, S. P., Alvim, I. D., & de Aguirre, J. M. (2013). Storage Stability of Spray-Dried Blackberry Powder Produced with Maltodextrin or Gum Arabic. *Drying Technology*. 31(4), 470-478.
- Filipčev, B., Mišan, A., Šarić, B., & Šimurina, O. (2016). Sugar beet molasses as an ingredient to enhance the nutritional and functional properties of gluten-free cookies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(3), 249-256.
- Franceschinis, L., Salvatori, D. M., Sosa, N., & Schebor, C. (2014). Physical and Functional Properties of Blackberry Freeze- and Spray-Dried Powders. *Drying Technology*. 32(2), 197-207.
- Franceschinis L. E. (2016). Propiedades fisicoquímicas y funcionales de productos deshidratados en base a cerezas y zarzamoras de la Patagonia argentina. (Tesis de Doctorado). Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

- Frey, W., Gusbeth, C., Sakugawa, T., Sack, M., Mueller, G., Sigler, J., Vorobiev, E., Lebovka, N., Álvarez, I., Raso, J., Heller, L. C., Malik, M. A., Eing, C., & Teissie, J. (2017). Environmental Applications, Food and Biomass Processing by Pulsed Electric Fields. En H. Akiyama & R. Heller (Eds.), *Bioelectrics* (pp. 389-476). Springer Japan.
- Gagneten, M., Corfield, R., Mattson, M. G., Sozzi, A., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2019). Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. *Powder Technology*. 342, 1008-1015.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*. 15(3-4), 143-152.
- Gan, C. Y. & Latiff, A. A. (2011). Antioxidant *Parkia speciosa* pod powder as potential functional flour in food application: Physicochemical properties' characterization. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1174-1180.
- Giacobone G., Castronuovo L., Tiscornia V. y Allemandi L. (2018). Análisis de la cadena de suministro de frutas y verduras en argentina. Fundación Interamericana del Corazón – Argentina.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1-F1.2.13.
- Gökmen, V., Serpen, A., & Fogliano, V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: The 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology*, 20(6-7), 278-288.
- Gopalan, A., Reuben, S. C., Ahmed, S., Darvesh, A. S., Hohmann, J., & Bishayee, A. (2012). The health benefits of blackcurrants. *Food & Function*, 3(8), 795.
- Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Folta, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zemser, M., Weisz, M., Trakhtenberg, S., & Martín-Belloso, O. (2001). Comparative Contents of Dietary Fiber, Total Phenolics, and Minerals in Persimmons and Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(2), 952-957.
- Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2011). Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*. 103(1), 52-61.

- Guardiola-Márquez C. E., Santana-Gálvez J. & Jacobo-Velázquez D. A. (2020). Association of Dietary Fiber to Food Components. En Science and Technology of Fibers in Food Systems. Editor: Barbosa-Cánovas G. V. Ed. Springer.
- Gül, H., Hayit, F., Acun, S., & Tekeli, S. G. (2018). Improvement of Quality Characteristics of Gluten-Free Cookies with the Addition of Xanthan Gum. *“Agriculture for Life, Life for Agriculture” Conference Proceedings*. 1(1), 529-535.
- Halliwell, B., Rafter, J., & Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1), 268S-276S.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (1995). Anthocyanins and Other Flavonoids. *Natural product reports*. 19.
- Ho, T. M., Truong, T., & Bhandari, B. R. (2017). Methods to characterize the structure of food powders – a review. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 81(4), 651-671.
- Islam Shishir, M. R., Taip, F. S., Aziz, N. Ab., Talib, R. A., & Hossain Sarker, Md. S. (2016). Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM. *Food Science and Biotechnology*. 25(2), 461-468.
- Jaeger, H., Schulz, M., Lu, P., & Knorr, D. (2012). Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 14, 46-60.
- Jenshi roobha J., Saravanakumar M., Aravindhan K. M. & Suganya devi P. (2011). The effect of light, temperature, ph on stability of anthocyanin pigments in *Musa acuminata* bract. *Research in Plant Biology*. 1(5): 05-12.
- Jiang, M., Jiao, Y., Wang, Y., Xu, L., Wang, M., Zhao, B., Jia, L., Pan, H., Zhu, Y., & Gao, X. (2014). Quantitative Profiling of Polar Metabolites in Herbal Medicine Injections for Multivariate Statistical Evaluation Based on Independence Principal Component Analysis. *PLoS ONE*. 9(8), e105412.
- Jimenez-Garcia, S. N., Guevara-Gonzalez, R. G., Miranda-Lopez, R., Feregrino-Perez, A. A., Torres-Pacheco, I., & Vazquez-Cruz, M. A. (2013). Functional properties

- and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International*. 54(1), 1195-1207.
- Jinapong, N., Supphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*. 84(2), 194-205.
- Kammerer, D. R. (2016). Anthocyanins. En *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*. 61-80. Elsevier.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., & Gordon, M. H. (2006). Extraction of Polyphenols from Processed Black Currant (*Ribes nigrum L.*) Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(11), 4016-4021.
- Karaś, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Złotek, U., & Zielińska, E. (2017). Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *International Journal of Food Science & Technology*. 52(2), 291-305.
- Karimi, M. Fathi M., Sheykhoslam Z., Sahraiyani B. & Naghipoor F. (2012). Effect of Different Processing Parameters on Quality Factors and Image Texture Features of Bread. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 02(05).
- Keraité, Sivakova & Kiuberis, (2017). Investigation of the impact of organic and inorganic halides on the ageing stability of paper with iron gall ink. *Chemija*. Vol. 28. No. 3. P. 137–147
- Khursheed P Navder, S. B. (2014). Freeze Dried Blueberry Powder Fortification Improves the Quality of Gluten Free Snacks. *Journal of Food Processing & Technology*. 5(12).
- Koc B., Eren I., Kaymak F. & Ertekin L. (2008). Modelling bulk density, porosity and shrinkage of quince during drying: The effect of drying method. *Journal of Food Engineering*. 85, 340–349.
- Kulthe A. A., Thorat S. S. & Lande, S. B. (2017). Evaluation of Physical and Textural Properties of Cookies Prepared from Pearl Millet Flour. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(4), 692-701.
- Laczko-Zöld, E., Komlósi, A., Ülkei, T., Fogarasi, E., Croitoru, M., Fülöp, I., Domokos, E., Ștefănescu, R., & Varga, E. (2018). Extractability of polyphenols from black currant, red currant and gooseberry and their antioxidant activity. *Acta Biologica Hungarica*. 69(2), 156-169.

- Laddi, A., Sharma, S., Kumar, A., & Kapur, P. (2013). Classification of tea grains based upon image texture feature analysis under different illumination conditions. *Journal of Food Engineering*. 115(2), 226-231.
- Laroze, L., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M. & Domínguez, H. (2010). Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*. 231 (5), 669-677.
- Lawless, H.T. & Heymann, H. (2010). Sensory evaluation of food: principles and practices. (2<sup>nd</sup> ed.). Nueva York, Estados Unidos.
- Lebovka, N. I., Praporscic, I., & Vorobiev, E. (2003). Enhanced expression of juice from soft vegetable tissues by pulsed electric fields: Consolidation stages analysis. *Journal of Food Engineering*. 59(2-3), 309-317.
- Leopoldini, M., Chiodo, S. G., Russo, N., & Toscano, M. (2011). Detailed Investigation of the OH Radical Quenching by Natural Antioxidant Caffeic Acid Studied by Quantum Mechanical Models. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(12), 4218-4233.
- Li, Yang., Sun, Y., Zhong, M., Xie, F., Wang, H., Li, L., Qi, B., & Zhang, S. (2020). Digestibility, textural and sensory characteristics of cookies made from residues of enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans. *Scientific Reports*, 10(1), 4222.
- Li, B. W., Andrews, K. W., & Pehrsson, P. R. (2002). Individual Sugars, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber Contents of 70 High Consumption Foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 15(6), 715-723.
- Ling, B., Tang, J., Kong, F., Mitcham, E. J., & Wang, S. (2015). Kinetics of Food Quality Changes During Thermal Processing: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 8(2), 343-358.
- Lu, R., & Abbott, J. A. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. *Texture in Food*. (109-145).
- Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 17, 79-84.
- Luo, M. R., Cui, G., & Rigg, B. (2001). The development of the CIE 2000 colour-difference formula: CIEDE2000. *Color Research & Application*. 26(5), 340-350.



- MacDougall, D. B. (2002). Colours in food, Improving quality, Chapter 3: Colour measurement of food, Principles and practice. BD MacDougall, Woodhead Publishing in Food Science and Technology, Cambridge, England, 44, 33-60.
- Mahnič-Kalamiza, S., Vorobiev, E., & Miklavčič, D. (2014). Electroporation in Food Processing and Biorefinery. *The Journal of Membrane Biology*. 247(12), 1279-1304.
- Marlett, J., & Vollendorf, N. (1994). Dietary fiber content and composition of different forms of fruits. *Food Chemistry*. 51(1), 39-44.
- Marlett J. & Cheung T. (1997). Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*. 97. 10. 1139-1152.
- Mattila, P. H., Hellström, J., Karhu, S., Pihlava, J.-M., & Veteläinen, M. (2016). High variability in flavonoid contents and composition between different North-European currant (*Ribes* spp.) varieties. *Food Chemistry*. 204, 14-20.
- Maupoey P. T., Andrés Grau A. M., Barat Baviera J. M. & Albors Sorolla A. M. (2016). Introducción al secado de alimentos por aire caliente. Ed. Universitat Politècnica de Valencia.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc.
- Meilgaard, M., Thomass Carr, B., & Vance Civille, G. (2006). Sensory evaluation techniques. (4<sup>th</sup> ed.). Nueva York, Estados Unidos.
- Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R., & Górecka, D. (2013). White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits: Addition of white grape pomace to wheat biscuits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(2), 389-395.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*. 5(6), 1113-1124.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2019). Nota: Se reglamentó el Plan Nacional de Reducción de Pérdidas y Desperdicios de Alimentos y la Ley Donal.

- <https://www.argentina.gob.ar/noticias/se-reglamento-el-plan-nacional-de-reduccion-de-perdidas-y-desperdicios-de-alimentos-y-la>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Parzanese M. Tecnologías para la Industria Alimentaria Liofilización de alimentos. Ficha N° 3.
- [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_03\\_Liofilizados.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf).
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Brkic M. Nota: Alimentos libres de gluten. Una oferta que se multiplica.
- <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=30>.
- Morales-de la Peña M., Odriozola-Serrano I., Oms-Oliu G. & Martín-Belloso O. (2020). Dietary Fiber in Fruits and Vegetables. En Science and Technology of Fibers in Food Systems. Editor: Barbosa-Cánovas G. V. Ed. Springer.
- Morata, A., López, C., Tesfaye, W., González, C., & Escott, C. (2019). Anthocyanins as Natural Pigments in Beverages. En *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages*. 383-428. Elsevier.
- Mudgil, D., & Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 61, 1-6.
- Muzaffar, K., Dinkarrao, B. V., & Kumar, P. (2016). Optimization of spray drying conditions for production of quality pomegranate juice powder. *Cogent Food & Agriculture*. 2(1).
- Nugraheni, M., . S., Purwanti, S., & Handayani, T. H. W. (2017). Development of Gluten-free Cookies Rich in Resistant Starch Type 3 from *Maranta arundinacea*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 16(9), 659-665.
- Namiesnik, J., Vearasilp, K., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Ham, K.-S., Kang, S.-G., Park, Y.-K., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., & Gorinstein, S. (2014). Comparative assessment of two extraction procedures for determination of bioactive compounds in some berries used for daily food consumption. *International Journal of Food Science & Technology*. 49(2), 337-346.
- Navarro González, I., Periago, M.J. and García Alfonso, F.J. (2017). Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 21(4): 320-326

- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 30(2), 134-144.
- Nour, V., Stampar, F., Veberic, R., & Jakopic, J. (2013). Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry*. 141(2), 961-966.
- Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2011). Ascorbic acid, anthocyanins, organic acids and mineral content of some black and red currant cultivars. *Fruits*. 66(5), 353-362.
- Nugraheni, M., . S., Purwanti, S., & Handayani, T. H. W. (2017). Development of Gluten-free Cookies Rich in Resistant Starch Type 3 from *Maranta arundinacea*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 16(9), 659-665.
- Öksüz, T., & Karakaş, B. (2016). Sensory and textural evaluation of gluten-free biscuits containing buckwheat flour. *Cogent Food & Agriculture*. 2(1).
- Orrego Alzate, C. E. (2009). Congelacion y liofilizacion de alimentos. Universidad Nacional de Colombia.
- Ou X., Pan W., & Xiao P. In vivo skin capacitive imaging analysis by using grey level co-occurrence matrix (GLCM). *International Journal Pharmaceutics.*, vol. 460, 28–32, 2014.
- Pagliarini, E., Laureati, M., & Lavelli, V. (2010). Sensory evaluation of gluten-free breads assessed by a trained panel of celiac assessors. *European Food Research and Technology*. 231(1), 37-46.
- Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Rufián-Henares, J. A. (2011). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry*. 129(4), 1926-1932.
- Pataro, G., Bobinaitė, R., Bobinas, Č., Šatkauskas, S., Raudonis, R., Visockis, M., Ferrari, G., & Viškelis, P. (2017 a). Improving the Extraction of Juice and Anthocyanins from Blueberry Fruits and Their By-products by Application of Pulsed Electric Fields. *Food and Bioprocess Technology*. 10(9), 1595-1605.
- Pataro, G., Carullo, D., Bobinaite, R., Donsi, G., & Ferrari, G. (2017 b). Improving the extraction yield of juice and bioactive compounds from sweet cherries and their by-products by pulsed electric fields. *Chemical Engineering Transactions*. 1717–1722.

- Paturi, G., Butts, C. A., Monro, J. A., & Hedderley, D. (2018). Effects of Blackcurrant and Dietary Fibers on Large Intestinal Health Biomarkers in Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 73(1), 54-60.
- Paunović S. M., Mašković P., Nikolić M. & Miletić R. (2017). Bioactive compounds and antimicrobial activity of black currant (*Ribes nigrum L.*) berries and leaves extract obtained by different soil management system. *Scientia Horticulturae* 222. 69–75
- Pérez, S., Matta, E., Osella, C., de la Torre, M., & Sánchez, H. D. (2013). Effect of soy flour and whey protein concentrate on cookie color. *LWT - Food Science and Technology*. 50(1), 120-125.
- Perry JR. and Ying W. (2016). A Review of Physiological Effects of Soluble and Insoluble Dietary Fibers. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 06(02).
- Pieniazek, F., Sancho, A., & Messina, V. (2016). Texture and Color Analysis of Lentils and Rice for Instant Meal Using Image Processing Techniques: Quality of Lentils and Rice for Instant Meal. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5), 969-978.
- Pieniazek, F., Roa Andino, A., & Messina, V. (2018). Prediction of texture in different beef cuts applying image analysis technique. *British Food Journal*. 120(8), 1929-1940.
- Pieniazek, F. & Messina, V. (2018). Texture Analysis of Freeze Dried Banana Applying Scanning Electron Microscopy Combined with Image Analysis Techniques. *International Journal of Food Engineering*. Vol. 4, No. 2, (127 – 131).
- Poojary, M. M., Lund, M. N., & Barba, F. J. (2020). Pulsed electric field (PEF) as an efficient technology for food additives and nutraceuticals development. *Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable Food for Tomorrow*. 65-99.
- Programa de agronegocios y alimentos (2010). Frutas finas. Sistemas agroalimentarios. (2010). Newsletter N° 12. Facultad de agronomía. Universidad de Buenos Aires. Disponible en [www.agro.uba.ar](http://www.agro.uba.ar).
- Ramakrishnan, Y., Adzahan, N. M., Yusof, Y. A., & Muhammad, K. (2018). Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation. *Powder Technology*. 328, 406-414.
- Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J., & Miklavčič, D. (2016). Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of

- application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 37, 312-321.
- Reißner, A.-M., Al-Hamimi, S., Quiles, A., Schmidt, C., Struck, S., Hernando, I., Turner, C., & Rohm, H. (2019). Composition and physicochemical properties of dried berry pomace: Composition and technofunctional properties of berry pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1284-1293.
- Redondo-Cuenca A., Villanueva-Suárez M. J. & Goñi I. (2016). Healthy Dietary Fibers from Plant Food By-Products. *Handbook of Vegetable Preservation and Processing, Second Edition*. (s. f.). 978. Editores: Hui y Özgül Evranuz.
- Rivas A., Blengino C., Alvarez de Toledo B., & Franco D. (2015). Ejercicio de estimación de las pérdidas y desperdicio de alimentos (PDA) en Argentina. Área de Sectores Alimentarios - Dirección de Agroalimentos - Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Roa Andino A., Pieniazek F. & Messina, V. (2018). Texture of Bananas Submitted to Different Freeze Drying Cycle Applying Scanning Electron Microscopy with Image Analysis Techniques. *Food Biophysics*. 14(1), 13-21.
- Rodriguez-Amaya D. B. (2016). Vegetables as Sources of Nutrients and Bioactive Compounds: Health Benefits. *Handbook of Vegetable Preservation and Processing, Second Edition*. (s. f.). 978. Editores: Hui y Özgül Evranuz.
- Rohm H., Brennan C., Turner C., Günther E., Campbell G., Hernando I., Struck S. & Kontogiorgos V. (2015). Adding value to fruit processing waste: innovative ways to incorporate fibers from berry pomace in baked and extruded cereal-based foods—A SUSFOOD project. *Foods*. 4, 690-697.
- Różyło R., Wójcik M., Dzikowski D., Biernacka B., Cacak-Pietrzak G., Gawłowski S., & Zdybel A. (2019). Freeze-dried elderberry and chokeberry as natural colorants for gluten-free wafer sheets. *International Agrophysics*. 33, 217-225
- Rubinskiene, M., Viskelis, P., Jasutiene, I., Viskeliene, R., & Bobinas, C. (2005). Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International*, 38(8-9), 867-871.
- Russ, J. (2005), "The need for stereology", *Image Analysis of Food Microstructure*, CRC LLC, Taylor and Francis, Boca Raton, FL. 1-20.

- Santhalakshmy, S., Don Bosco, S. J., Francis, S., & Sabeena, M. (2015). Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder. *Powder Technology*. 274, 37-43.
- Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D., & Supratman, U. (2012). Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*. 132(4), 1908-1914.
- Šarić, B., Dapčević-Hadnađev, T., Hadnađev, M., Sakač, M., Mandić, A., Mišan, A., & Škrobot, D. (2019). Fiber concentrates from raspberry and blueberry pomace in gluten-free cookie formulation: Effect on dough rheology and cookie baking properties. *Journal of Texture Studies*. 50(2), 124-130.
- Sastre Gallego, A. (2003). Fibra y prebióticos: Conceptos y perspectivas. *Gastroenterología y Hepatología*. 26(Supl.1), 6-12.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*. 117(4), 538-544.
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V., & Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 16(6), 823-836.e2.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178).
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (2000). Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*. 65(2), 357-364.
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition*. 3(4), 506-516.
- Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., & Martín-Belloso, O. (2009). Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 20(11-12), 544-556.

- Sosa, N., Salvatori, D. M., & Schebor, C. (2012). Physico-Chemical and Mechanical Properties of Apple Disks Subjected to Osmotic Dehydration and Different Drying Methods. *Food and Bioprocess Technology*. 5(5), 1790-1802.
- Suárez, C., Soba, A., Maglietti, F., Olaiz, N., & Marshall, G. (2014). The Role of Additional Pulses in Electroporation Protocols. *PLoS ONE*. 9(12), e113413.
- Sun, J., Bai, W., Zhang, Y., Liao, X., & Hu, X. (2011). Effects of electrode materials on the degradation, spectral characteristics, visual colour, and antioxidant capacity of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside during pulsed electric field (PEF) treatment. *Food Chemistry*. 128(3), 742-747.
- Swaminathan S., Sowriappan J. D. B., Sneha F., Mallela S. (2015). Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder, *Powder Technology*. 274. 37–43.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 63(4), 147-156.
- Tańska M., Roszkowska B., Czaplicki S., Borowska E. J., Bojarska J. & Dąbrowska A. (2016). Effect of Fruit Pomace Addition on Shortbread Cookies to Improve Their Physical and Nutritional Values. *Plant Foods Human Nutrition*. 71:307–313
- Tarek M. (2018). Molecular Dynamics Simulations of Lipid Membranes Electroporation. Proceedings of the Electroporation-Based Technologies and Treatments International Scientific workshop and postgraduate course. Editado por Kramar, Miklavčič, Mir. Liubliana, Eslovenia.
- Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science & Technology*. 63, 91-102.
- Torres Gonzalez, J. D., Gallo, R. T., Correa, D. A., Gallo-Garcia, L. A., & Castillo, P. M. (2018). Instrumental assessment of textural parameters of Colombian lemon biscuits. *Contemporary Engineering Sciences*. 11(22), 1085-1102.
- Tungland, B. C., & Meyer, D. (2002). Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1(3), 90-109.

- Vagiri M. (2012). Black currant (*Ribes nigrum L.*) – an insight into the crop. A synopsis of a PhD study. Introductory Paper at the Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Balsgård Swedish University of Agricultural Sciences.
- Vagiri, M., Ekholm, A., Andersson, S. C., Johansson, E., & Rumpunen, K. (2012). An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(42), 10501-10510.
- Vagiri, M., Ekholm, A., Öberg, E., Johansson, E., Andersson, S. C., & Rumpunen, K. (2013). Phenols and Ascorbic Acid in Black Currants (*Ribes nigrum L.*): Variation Due to Genotype, Location, and Year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(39), 9298-9306.
- Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Chacana, M., Vergara, J., Martínez-Monzó, J., García-Segovia, P., Lemus-Mondaca, R., & Di Scala, K. (2012). Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*. 132(1), 51-59.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (Eds.). (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing.
- Viva de Toledo, N. M. V., Nunes, L. P., da Silva, P. P. M., Spoto, M. H. F., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2017). Influence of pineapple, apple and melon by-products on cookies: Physicochemical and sensory aspects. *International Journal of Food Science & Technology*. 52(5), 1185-1192.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2010). Enhanced Extraction from Solid Foods and Biosuspensions by Pulsed Electrical Energy. *Food Engineering Reviews*. 2(2), 95-108.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2017). Selective Extraction of Molecules from Biomaterials by Pulsed Electric Field Treatment. En D. Miklavčič (Ed.), *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing. 655-670.
- Watts, B., Ylimaki, G., Jeffery, L., & Elías, L. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación sensorial de alimentos*. Ottawa: Internacional Development Center.

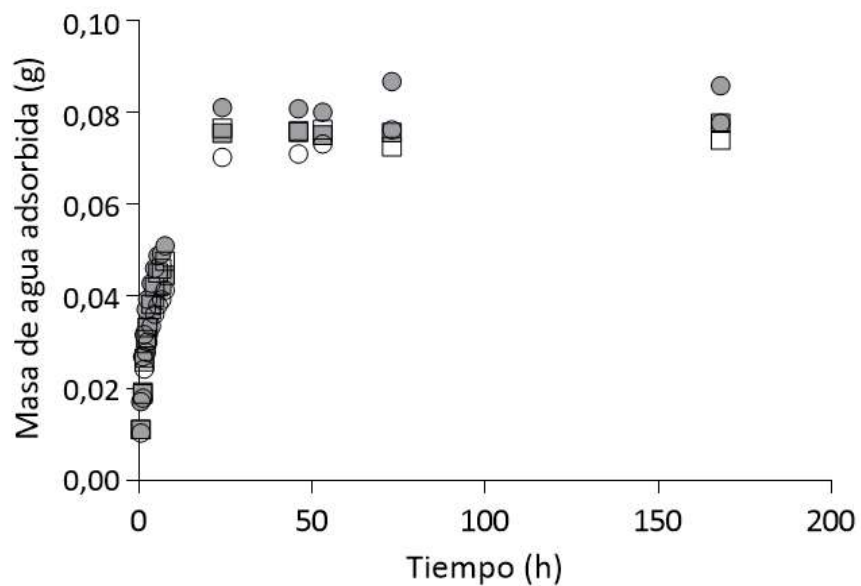


- Wiktor, A., & Witrowa-Rajchert, D. (2017). Pulsed Electric Fields as Pretreatment for Subsequent Food Process Operations. En D. Miklavčič (Ed.), *Handbook of Electroporation*. 2439-2454.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*. 44(1), 217-224.
- Xu, Y., Guo, Y., Duan, S., Wei, H., Liu, Y., Wang, L., Huo, X., & Yang, Y. (2018). Effects of ultrasound irradiation on the characterization and bioactivities of the polysaccharide from blackcurrant fruits. *Ultrasonics Sonochemistry*. 49, 206-214.
- Zaffino, C., Bruni, S., Russo, B., Pilu, R., Lago, C., & Colonna, G. M. (2016). Identification of anthocyanins in plant sources and textiles by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): Identification of anthocyanins in plant sources and textiles. *Journal of Raman Spectroscopy*. 47(3), 269-276.
- Zheng, X., Hu, Y., Anggreani, E., & Lu, X. (2017). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of blueberries using Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy and Raman spectroscopy. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11(4), 1909-1918.
- Žilić, S., Kocadağlı, T., Vančetović, J., & Gökmen, V. (2016). Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compound stability, antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn flour. *LWT - Food Science and Technology*. 65, 597-603.

# ANEXO

## 7. ANEXO

### 7.1. Figuras



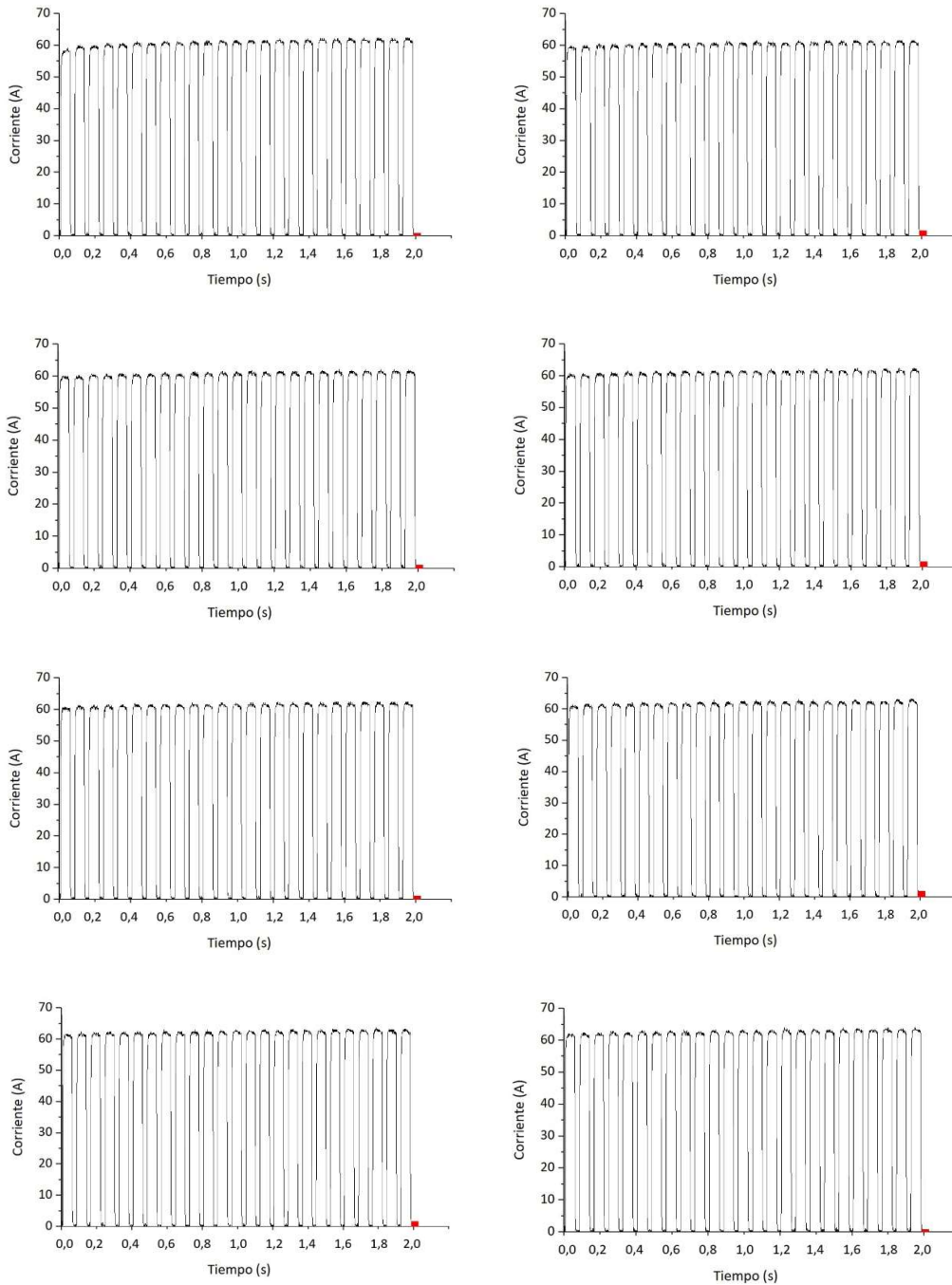
**Figura 7.1.** Masa de agua adsorbida a lo largo del tiempo, registrada en el ensayo de higroscopicidad del PS. Marcadores grises: muestras obtenidas a partir del extracto control, marcadores blancos: muestras obtenidas a partir del extracto óptimo.



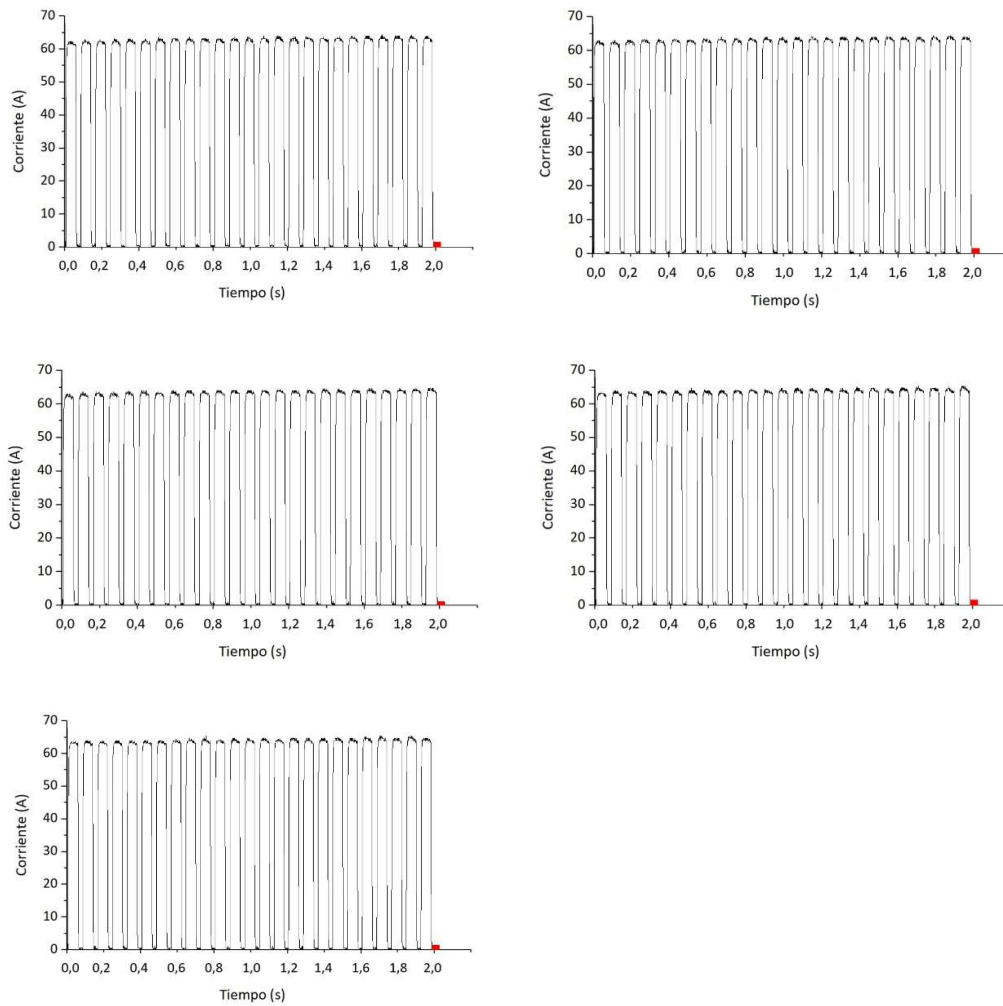
**Figura 7.2.** Disposición de las muestras presentadas a los consumidores en el análisis sensorial



**Figura 7.3.** Una consumidora realizando el análisis sensorial.



**Figura 7.4.** Corriente registrada durante la aplicación de los pulsos eléctricos del tratamiento óptimo. Cada gráfico corresponde a un tren de 25 pulsos. En orden consecutivo, de izquierda a derecha y arriba hacia abajo se muestran todos los trenes de pulsos aplicados.



**Figura 7.4. (cont.).** Corriente registrada durante la aplicación de los pulsos eléctricos del tratamiento óptimo. Cada gráfico corresponde a un tren de 25 pulsos. En orden consecutivo, de izquierda a derecha y arriba hacia abajo se muestran todos los trenes de pulsos aplicados.

## 7.2. Planillas

**Planilla 7.1.** Talón de consentimiento informado firmada por los participantes de la encuesta sensorial.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Me dirijo a usted para solicitar su participación en la realización de una prueba sensorial de galletitas de chocolate libres de gluten adicionadas con fibra de grosella negra. Los productos que se degustarán son elaborados con todos ingredientes sin TACC (trigo, avena, cebada y centeno).

Esta investigación es llevada a cabo por la Lic. Maite Gagneten con el propósito de recabar información sobre dichos productos, en el marco de su tesis doctoral.

Acepto

Firma: .....

Fecha: .....

Nombre: .....

Edad: .....

**Planilla 7.2.** Formulario entregado a los participantes de la encuesta de análisis sensorial.

**Fecha:** .....

**Nombre y Apellido:** .....

**Edad:** .....

**¿Sigue usted una dieta libre de gluten habitualmente?**      Sí                      No

Si su respuesta anterior es "Sí":

**¿Hace cuánto tiempo?**

.....

**¿Por qué motivo?**

.....

Usted ha recibido 2 muestras, una correspondiente a una galletita de chocolate libre de gluten y otra correspondiente a una galletita de chocolate libre de gluten adicionada con fibra de grosella negra. Su tarea consiste en consumir cada una y evaluar el nivel de intensidad de cada atributo.

**PRUEBA DEL NIVEL DE INTENSIDAD DE ATRIBUTOS**

Marque con una X el nivel de intensidad percibido para cada atributo.

**Textura: dureza**

Muestra	Muy bajo	Bajo	Ideal	Alto	Muy alto
561					
342					

**Textura: crocancia**

Muestra	Muy bajo	Bajo	Ideal	Alto	Muy alto
561					
342					

**Textura: fragilidad**

Muestra	Muy bajo	Bajo	Ideal	Alto	Muy alto
561					
342					

**Aroma**

Muestra	Muy bajo	Bajo	Ideal	Alto	Muy alto
561					
342					

**Sabor a chocolate**

Muestra	Muy bajo	Bajo	Ideal	Alto	Muy alto
561					
342					

**Color**

Muestra	Muy bajo	Bajo	Ideal	Alto	Muy alto
561					
342					