



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
MAESTRÍA EN BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
INDUSTRIALIZACIÓN DE ALIMENTOS

Obtención y caracterización de polvos por secado-spray con alta concentración de compuestos bioactivos a partir de jugos de grosella negra (*Ribes nigrum*)

Tesis presentada para optar por el título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Bromatología y Tecnología de la industrialización de Alimentos.

Ing. Hernando de Jesús Toscano Martínez

Director de tesis: Dra. Graciela Edith Leiva.

Co-Director de tesis: Dra. Carolina Claudia Schebor.

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de presentación del ejemplar:

Fecha de Defensa: 05-04-2019

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 5 de abril de 2019

Resumen

El objetivo de esta investigación fue la optimización de la extracción de jugo de grosella negra (*Ribes nigrum*) mediante una maceración enzimática. Posteriormente se obtuvieron polvos a partir de los extractos por secado spray y liofilización con el fin de ser empleados como colorante natural y fuente de compuestos bioactivos. Se caracterizó la fruta para determinar las condiciones iniciales de trabajo y con el fin de optimizar la extracción se utilizó un diseño experimental del tipo Box-Behnken, obteniendo así, un jugo con buen rendimiento y alto contenido de componentes bioactivos. Para el desarrollo de los polvos a partir del jugo óptimo obtenido mediante secado spray y liofilización, se utilizó como matriz carrier maltodextrina en diferentes concentraciones (10 y 20% p/p). De la comparación de las propiedades (fisicoquímicas y funcionales) de los polvos obtenidos por secado por spray y liofilización se desprende que tienen similares características, aunque la temperatura de transición vítrea fue un poco menor en polvo obtenido por secado spray. Finalmente, el polvo de jugo de grosellas negras obtenido en condiciones óptimas se empleó para la elaboración de un postre de gelatina como alimento modelo. Para la aplicación del producto en la elaboración de gelatina se optó por usar el polvo secado por spray dado que éste a escala industrial tiene un menor costo. Se determinó la formulación apropiada y se analizó la estabilidad (compuestos bioactivos, actividad antioxidante, color superficial y sinéresis) del alimento formulado durante 15 días a 4°C. Los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante se mantuvieron estables durante el almacenamiento en refrigeración, no se observó sinéresis y los cambios de color que se produjeron fueron mínimos. Se obtuvo un polvo de jugo de grosellas negras rico en compuestos bioactivos, capaz de ser usado además como colorante natural en alimentos.

Palabras clave: antocianinas, compuestos bioactivos, gelatina, grosella negra, liofilización, secado porspray.

Abstract

The aim of this work was to optimize the extraction process of blackcurrant juice (*Ribes nigrum*) by means of an enzymatic maceration. Subsequently, powders were obtained from the extracts by spray drying and freeze drying in order to be used as a natural colorant and source of bioactive compounds. The fruit was characterized to determine the initial conditions and in order to optimize extraction conditions a Box-Behnken experimental design was used; thus a juice with good yield and high content of bioactive components was obtained. From the optimum juice, powders were obtained by spray and freezer drying, using maltodextrin as carrier matrix in different concentrations (10 and 20% w/w). The comparison of the properties (physicochemical and functional) of the powders obtained by both drying methods showed that they have similar characteristics, although the glass transition temperature was slightly lower in spray dried sample. Finally, the powder of black currant juice obtained under optimal conditions was applied to a jelly dessert as model food. For this application of the product in the jelly dessert, the spray-dried powder was chosen, since it has a lower industrial cost. The appropriate formulation was determined and the stability (bioactive compounds, antioxidant activity, surface color and syneresis) of the formulated food was analyzed for 15 days at 4°C. The bioactive compounds and antioxidant activity remained stable during storage in refrigeration, the product did not present syneresis and the color changes were minimal. A black currant juice powder rich in bioactive compounds was obtained, which can also be used as a natural colorant in foods.

Keywords: anthocyanins, bioactive compounds, jelly dessert, blackcurrant, freeze-drying, spray drying.

ABREVIATURAS

°Bx	Grados Brix
% H	Porcentaje de higroscopicidad
AA	Actividad Antioxidante
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AG	Ácido Gálico
BBD	Diseño Box-Behnken
DA	Densidad aparente
DC	Densidad compactada
DV	Densidad verdadera
EE	Extracto etanólico
EM	Extracto metanólico
FC	Folin-Ciocalteu
FD	Factor de dilución
HR	Humedad relativa
IC	Índice de Carr
IH	Índice de Hausner
MD	Maltodextrina
ppm	Partes por millón
T_g	Temperatura de transición vítrea
TMA	Antocianinas monoméricas totales
TPC	Contenido total de polifenoles

Agradecimientos

*A la **República Argentina**, por en su día a día ayudarme al crecimiento personal, madurez, aprendizaje y aprender a valorar lo maravillosa que es la vida.*

*A la **Universidad de Buenos Aires** por ser un segundo hogar para este crecimiento profesional, por la formación académica que me ofreció y realización de este trabajo de tesis.*

*Especialmente quiero agradecerle a mi directora de tesis **GRACIELA LEIVA** y codirectora **Carolina Schebor**, por su esmero constante a mi trabajo de investigación, por toda la disposición, comprensión, colaboración y paciencia durante todo este proceso. Gracias por haberme permitido trabajar, aprender de ustedes, y que hayan depositado su confianza en mí. Por ser esas personas guías en la investigación y abrirme un espacio en su equipo de trabajo.*

*A mi familia **Iris Martínez, Laura Toscano y El niño**, por ser ese motivo para lograr esta meta. Por servirme de apoyo en la distancia en momentos difíciles. Siempre están en mi corazón con amor.*

*Agradezco infinitamente a **Maite Gagnetten** por su ayuda, tiempo, dedicación, disposición y entrega para la realización de los ensayos que se desencadenaban por esta investigación. A ella enorme agradecimiento.*

*A mis mejores amigas: **Ana González, Katerin Guzmán y Yesenia García**. Personas de trabajo mutuo para cultivar el verbo y significado de amistad; **a la negri (antes era winhouse)**, esto fue una meta conjunta en polos opuestos y ambos cumplimos con el objetivo, más que eso, mi hermana; a **Katy**, no pensé encontrar una amiga tan sincera y para toda la vida en Buenos Aires, desde el primer día hicimos Click-on; **a la mona**, que te puedo decir... ganando, como siempre; sabes que nuestra amistad comenzó desde pequeños y no hay mayor agradecimiento hacia ti que hacerte reír, sentir cada vez que compartimos que el tiempo no ha pasado es lo más gratificante.*

*A aquellos amigos consolidados en todo este tiempo de idas y vueltas (**Tatiana Aguirre, Leonardo Favre, Sharon el Masri, Andrea Ramírez, Natalia Pesquero, Carolina Perdomo, Fernanda Martínez, Silvio Rodríguez, Rocio Corfield, Diego Archaina, Edward Gómez, Naddia DELFINA y Aisha D'enjoy**) fueron muchos o quizás pocos, sin embargo todos son y serán importantes para mí. Les agradezco por su cariño y su amistad.*

DIOS

Iris, Laura y el Niño

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Frutas finas: berries y cherries.....	2
1.1.1 Cultivo de berries en Argentina. Importancia de su consumo.....	3
1.2 Compuestos bioactivos.....	7
1.2.1 Polifenoles.....	7
1.2.2 Antocianinas.....	8
1.2.3. Estabilidad de las antocianinas.....	10
1.3 Extracción de compuestos bioactivos. Obtención de jugos.....	14
1.3.1 Extracción enzimática. Enzimas pectinolíticas.....	14
1.4 Procesos de deshidratación.....	18
1.4.1 Liofilización.....	18
1.4.2 Secado spray.....	20
1.5 Aplicación de polvos de berries como colorantes y como fuente de compuestos bioactivos.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo general.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	25

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Materiales	27
3.2 Caracterización de la fruta.....	28
3.2.1 Contenido de agua.	28
3.2.2 pH	28
3.2.3 Acidez total.....	28
3.2.4 Sólidos solubles	29
3.2.5 Propiedades químicas y funcionales.....	29
3.2.5.1 Antocianinas monoméricas totales (TMA).....	29
3.2.5.2 Obtención de los extractos para la determinación del contenido de polifenoles totales y de la actividad antioxidante.....	33
3.2.5.3 Polifenoles Totales	33
3.2.5.4 Determinación de la actividad antioxidante.	35
3.3 Procesamiento de las muestras	36
3.3.1 Acondicionamiento de la fruta	36
3.3.2 Optimización del proceso de obtención de jugo de grosella negra	36
3.3.3 Proceso de obtención de jugo de grosella negra.....	38
3.3.3.1 Maceración enzimática y obtención de jugo	38
3.3.3.2 Determinación del rendimiento de jugo	39

3.3.4 Obtención de polvos	41
3.3.4.1 Secado por liofilización	41
3.3.4.2 Secado spray	41
3.4 Caracterización del polvo de jugo de grosellas negras	42
3.4.1 Medición de TMA, TPC y AA en el polvo de jugo de grosellas negras	42
3.4.2 Contenido de agua. Método de Karl Fischer	42
3.4.3 Actividad acuosa.....	43
3.4.4 Transición vítrea	43
3.4.5 Isotermas de sorción de agua.....	43
3.4.6 Solubilidad.....	44
3.4.7 Densidad aparente y compactada	44
3.4.8 Cohesividad y fluidez	45
3.4.9 Densidad verdadera y cálculo de la porosidad	46
3.4.10 Higroscopicidad.....	47
3.5 Aplicación del polvo obtenido por secado spray en un alimento	47
3.5.1 Formulación del postre de gelatina.....	47
3.5.2 Medición de TMA, TPC y AA en la gelatina.....	48

3.5.3	Análisis de la vida útil refrigerada.....	49
3.5.3.1	Medición de compuestos bioactivos y actividad antioxidante	49
3.5.3.2	Determinación de color superficial.....	50
3.5.3.3	Evaluación de la sinéresis.....	52
3.6	Análisis estadístico	52
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1	Caracterización de las grosellas negras	55
4.2	Optimización de la extracción enzimática de jugo de grosella negra.....	57
4.2.1	Efecto de la enzima y la temperatura sobre el proceso de extracción	66
4.3	Caracterización de polvos de grosellas negras	69
4.4	Análisis de la formulación para aplicación en alimentos. Gelatina.....	76
4.4.1	Análisis de compuestos bioactivos y actividad antioxidante.....	76
4.4.2	Análisis del color superficial	78
4.4.3	Evaluación de sinéresis.....	82
5.	CONCLUSIONES	85
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	87

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Frutas finas: berries y cherries

Las llamadas “frutas finas” o “frutos del bosque” son denominaciones comerciales que engloban un conjunto de diferentes especies que se caracterizan por su reducido tamaño (comparando con el resto de las frutas) y por su elevado contenido de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

Este grupo de frutas se clasifica en dos subgrupos, que según la denominación en inglés se dividen en berries y cherries y comprenden las siguientes especies según se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las frutas finas (berries y cherries).

Berries	Cherries
Arándano o blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Cereza (<i>Prunus avium</i>)
Frambuesa roja o raspberry (<i>Rubus idaeus</i>)	
Moras y Zarzamoras arbustivas (híbridos del género <i>Rubus</i>)	
Grosellas o gooseberry Grosella Espinosa o Uva Espina (<i>Ribes grossularia</i>) Grosella Negra o Cassis (<i>Ribes nigrum</i>) Grosella Roja o Zarzaparrilla (<i>Ribes rubrum</i>)	Guinda (<i>Prunus cerasus</i>)
Frutilla o strawberry (<i>Fragaria ananassa</i> e híbridos)	

En los últimos años se observó que existe una creciente demanda de los consumidores por alimentos con cualidades promotoras de la salud. En este sentido, las frutas más difundidas son las del denominado grupo “berries”, las cuales poseen un alto contenido de antocianinas y polifenoles que contribuyen a su elevada actividad antioxidante (Teleszko y Wojdyło, 2015; Baiano y Del Nobile, 2016). En este grupo de frutas, las especies de mayor relevancia económica son el arándano, la frambuesa, la mora y la frutilla. Sin embargo, la grosella negra (*Ribes nigrum*), llamada también cassis o blackcurrant en inglés es una berry con gran potencial en ese sentido, cuyo cultivo está en crecimiento en la Argentina y es considerada una de las berries con mayor contenido de compuestos bioactivos (McDougall, 2017).

1.1.1 Cultivo de berries en Argentina. Importancia de su consumo

El cultivo de berries se realiza en forma de producciones intensivas, que son movilizadoras de las economías locales y regionales. Ofrecen varias posibilidades de industrialización y al mismo tiempo, exigen mejorar la productividad y la tecnificación de la producción. El manejo de estas frutas impone requerimientos muy específicos especialmente en la post-cosecha y el transporte debido a su alta perecebilidad (Mitcham, 2007).

Las berries cultivadas en Argentina están representadas principalmente por arándano, frutilla, frambuesa y zarzamora. Otros frutos pequeños de alguna importancia local (especialmente en la Patagonia) son las grosellas blancas, rojas y negras (Informe INTA, 2017). Los arándanos son muy importantes en términos económicos en Argentina que es el segundo productor de arándanos de América del Sur (después de Chile) y del que es

exportador a 26 mercados internacionales (EEUU, Reino Unido y otros países de Europa, entre otros). Las frutillas son cultivadas en prácticamente todas las regiones de Argentina, que es el tercer productor en América del Sur luego de Brasil y Chile. Argentina produce menores cantidades de frambuesa, zarzamora y otras berries, con una superficie cultivada por este grupo de frutos bastante más pequeña que los cultivos de arándanos y frutillas. Más del 70% de la superficie cultivada con frambuesas, moras, grosellas y otras berries se concentra en la región de la Patagonia. Dadas las condiciones edafoclimáticas de la Patagonia (Argentina y Chile), que es donde crecen muchas especies de berries, y a que los polifenoles (en especial los flavonoides) son compuestos cuya síntesis es favorecida por condiciones de estrés, se espera que estas especies presenten contenidos altos de este tipo de antioxidantes (Fredes, 2009). Gran parte de la producción de estas frutas se comercializa localmente (congelada o fresca) y también se utiliza para la producción de mermeladas, dulces, bebidas, licores y helados. En los últimos tiempos existe una creciente demanda de estas frutas en el sector gastronómico “gourmet”, en hoteles, restaurantes y pastelerías.

El gran aumento del consumo de berries se ha debido principalmente a cambios de hábito producidos gracias al descubrimiento de las propiedades de estas frutas (COFECYT, 2016). La información relacionada con dietas saludables ha aumentado la demanda de este tipo de frutas, ya que se le atribuyen propiedades funcionales que son promotoras de la salud, debido principalmente a sus potenciales efectos antioxidantes. A nivel celular, las especies reactivas oxidantes y los radicales libres desencadenan una extensa gama de procesos fisiológicos que están implicados en numerosas patologías; el estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de las especies reactivas oxidantes y la defensa antioxidante, que puede conducir a un daño oxidativo. Esto puede deberse a la insuficiencia

de los mecanismos de defensa antioxidantes o a la producción intensa de las especies reactivas oxidantes. Para enfrentar el estrés oxidativo, el organismo humano ha desarrollado mecanismos para mantener la homeostasis redox. Estos mecanismos antioxidantes pueden ser endógenos, es decir modulados por el propio organismo o exógenos (que podrían ser suministrados por la dieta) mediante compuestos antioxidantes capaces de retardar o prevenir la oxidación. Estos compuestos bioactivos exhiben mecanismos de acción biológicamente significativos sobre las especies reactivas oxidantes, tales como su eliminación o el bloqueo de su producción, y tienen diversos impactos: en el ciclo celular, en la supresión de tumores, en la modulación de la transducción de señales, apoptosis, desintoxicación, y distintos efectos sobre las enzimas y el metabolismo (Paredes-López y col., 2010). Es así como un adecuado consumo de estos compuestos bioactivos podría ofrecer beneficios para la salud que incluyen: retrasar los procesos de envejecimiento y reducir el riesgo de diversas patologías como enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad de Alzheimer, prevención de la inflamación, efectos sobre el tratamiento de la diabetes, mejoras en el perfil lipídico (Nile y Park, 2014; Chang, Alasalvar y Shahidi, 2016; Cassidy, 2017; Cosme y col., 2017; Khoo y col., 2017).

Las grosellas negras han sido consideradas como “superfrutas” debido a que son una importante fuente de compuestos bioactivos promotores de la salud con una fuerte actividad inmunomoduladora, antimicrobiana y antiinflamatoria junto con una significativa acción en la reducción de enfermedades



cardiovasculares, disminución de la presión arterial, reducción del colesterol y en la prevención del cáncer (Gopalan y col., 2012; Nile y Park, 2014).

Algunas veces, concentraciones muy altas de antocianinas en berries dan como resultado un color muy oscuro, tanto que las frutas parecen de color negro a pesar de que los pigmentos son de colores que van desde el rojo al morado. Este hecho dio como resultado que algunas berries se las conociera como negras o black como se las llama en inglés (Zhao, 2007).

La grosella negra (familia: *Grossulariaceae*), es originaria de Europa Central y Oriental, además de algunas partes de Asia. Es un arbusto aromático que crece hasta 1,5-2 metros de altura, tiene hojas lobuladas y flores características (rojizas por dentro y verdes por fuera); El fruto es una baya que nace en racimo de granos negros, pulposos, con piel lisa y bastante aromático. Se cree que primero se cultivó en la región alrededor del mar Báltico a fines del siglo XVI y desde entonces se ha convertido en una de las berries más extendidas en la región; se cultiva desde el siglo XVII y en la actualidad prácticamente no se encuentra en estado salvaje en la naturaleza.

La grosella negra es rica en minerales tales como calcio, zinc, magnesio y potasio, tiene además importantes cantidades de vitamina A, B2 y en lo que respecta a la vitamina C es una de las berries que mayor concentración tiene (Nile y Park, 2014). También cuenta con importantes cantidades de compuestos bioactivos tales como las antocianinas y a su vez, existen estudios en donde se comprueba una marcada actividad antioxidante en estas frutas (Nile y Park, 2014).

1.2 Compuestos bioactivos

1.2.1 Polifenoles

Los polifenoles o compuestos fenólicos están presentes en vegetales y se forman a partir del metabolismo secundario de los mismos, muchas veces como respuesta a situaciones de estrés, por ejemplo: de defensa o estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Otros son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales como por ejemplo reproductivas. Estos compuestos tienen en común que poseen al menos un anillo aromático al que están unidos uno o más grupos hidroxilos (Martín y col., 2017).

Los polifenoles se encuentran en una gran variedad de especies vegetales tanto en frutos, hojas, flores y en algunas semillas, por ejemplo: las leguminosas. Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas gracias a la continua evolución y adaptación a funciones específicas. La biosíntesis de los polifenoles en las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shiquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shiquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina) y de los ácidos cinámicos con sus derivados (ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y los derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas. Químicamente los polifenoles se dividen en cuatro grandes grupos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Figura 1). Los flavonoides y los ácidos fenólicos representan el 60 y el 30% de los polifenoles de la dieta, respectivamente (Martín y col., 2017).

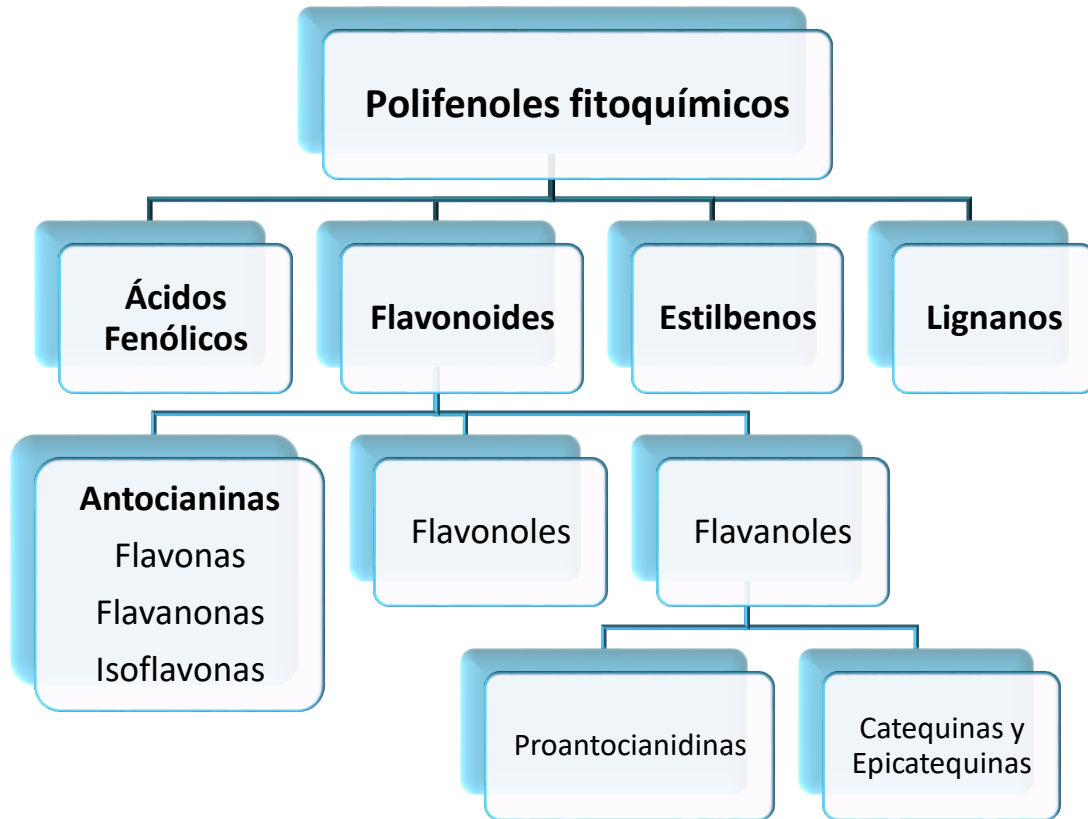


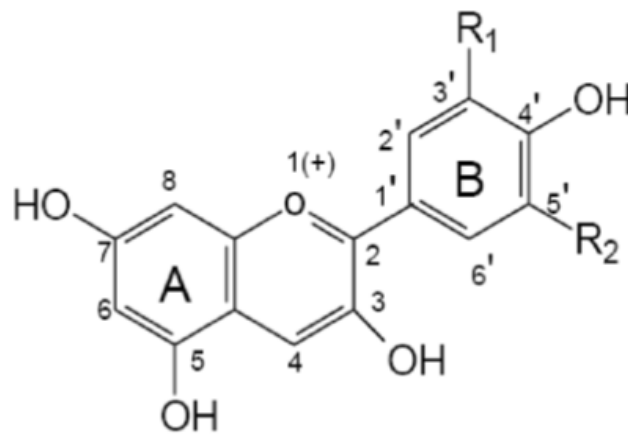
Figura 1. Clasificación de polifenoles fitoquímicos (Martín y col., 2017).

1.2.2 Antocianinas

Las antocianinas forman parte del grupo de pigmentos naturales detectables en la región visible por el ojo humano y abarcan desde el color rojo hasta el azul. Estos pigmentos están presentes en varias frutas, vegetales y cereales. Son glucósidos de antocianidinas (aglicona), pertenecen a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B. De las sustituciones en el anillo B resultan seis antocianidinas diferentes (Figura 2) (Garzón, 2008). Como se menciona frecuentemente en bibliografía, las antocianinas coexisten en equilibrio en cuatro formas estructurales diferentes. Su color depende de las condiciones de pH del medio ya que se producen cambios en su estructura

1. INTRODUCCIÓN

que tienen consecuencias directas sobre la absorción de la luz (Nielsen y col., 2003). La alta reactividad de la aglicona es en gran parte la responsable de las diversas modificaciones estructurales que las antocianinas sufren en medio ácido. La naturaleza de los azúcares, los grupos acilo y metoxi tienen poco efecto sobre las reacciones que inducen modificaciones estructurales, pero la ubicación en la molécula del sustituyente en la aglicona puede tener gran influencia (Jackman y col., 1987)



Aglicona	Sustitución		λ_{max} (nm)
	R1	R2	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Figura 2. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).

La influencia del pH sobre el color de las soluciones de antocianinas se debe a su naturaleza anfotérica y resulta en un comportamiento del tipo de indicador de pH. Por debajo de pH 3,

las soluciones de antocianinas tienen su más intensa coloración roja; cuando el pH aumenta, su color rojo normalmente se desvanece al punto de formar soluciones incoloras en el rango de pH de 4 a 5. Aumentos adicionales en el pH dan lugar a soluciones de antocianina que son de color púrpura y azul (Giusti y Wrolstad, 2001). Esta propiedad de las antocianinas frente a los cambios de pH se utiliza como un método para su determinación, los cambios estructurales que se producen serán detallados más profundamente en la sección de Materiales y Métodos.

En cada especie vegetal están presentes varias antocianinas diferentes, pero la composición es hasta cierto punto, específica para cada especie. En grosellas negras, las principales antocianinas son: cianidin-3-glucosido, cianidin-3-rutinosido, delphinidin-3-glucosido y delphinidin-3-rutinosido (Rubinskiene y col., 2005). Estas cuatro antocianinas constituyen más del 97% del contenido total de antocianinas en estas frutas (Slimestad y Solheim, 2002).

1.2.3. Estabilidad de las antocianinas

La estabilidad es un aspecto importante a considerar para el uso de polifenoles y en especial de las antocianinas como antioxidantes y colorantes en los alimentos. Debido a que los pigmentos sintéticos han sido últimamente cuestionados para su uso en alimentos, existe un interés progresivo por el empleo de los pigmentos naturales. Sin embargo, uno de los mayores problemas de los pigmentos naturales es su inherente inestabilidad, especialmente en sistemas complejos como lo son los alimentos. Por lo tanto, es importante un conocimiento de los factores que gobiernan la estabilidad de las antocianinas y los posibles mecanismos por los cuales pueden degradarse, si estos pigmentos se desean utilizar como

ingredientes en la fabricación de productos para los cuales se desea una máxima retención de color durante toda su vida útil.

Se ha estudiado la estabilidad de los polifenoles; especialmente antocianinas, y se ha demostrado que es afectada por el pH, la temperatura, los iones metálicos, la exposición a la luz, el oxígeno y la presencia de enzimas (Bakowska, Kucharska y Oszmiański, 2003).

Las antocianinas tienen alta estabilidad a pH ácido, puesto que el catión flavilio (Figura 3) es predominante en esas condiciones y es la forma más estable.

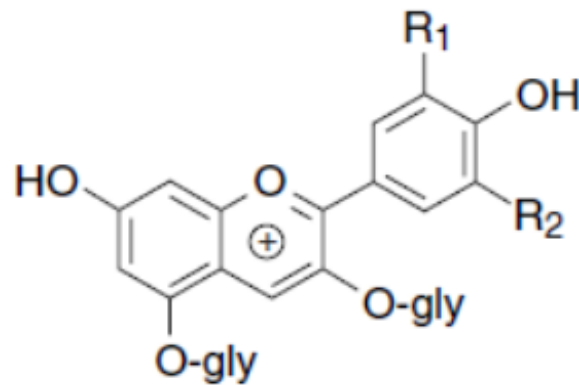


Figura 3. Estructura de catión flavilio formado a pH 1.

Nielsen y col. (2003), estudiaron el efecto del pH (desde 0,6 a 5,5 durante 24 horas) para cuatro antocianinas. Después de 24 horas, más del 90% de las antocianinas permanecieron intactas hasta un valor de pH 3,3, mientras que la inestabilidad se incrementaba en gran medida a los valores de pH superiores a 4,5. Esta gran inestabilidad de las antocianinas con el cambio del valor de pH tiene consecuencias directas sobre el color.

Las antocianinas son vulnerables al aumento de la temperatura, lo cual puede conducir a su degradación durante los procesos elaboración de jugos; además, el largo tiempo almacenamiento altera aún más la composición (Brownmiller, Howard, y Prior, 2008).

Durante el almacenamiento, las antocianinas que son relativamente lábiles en los jugos, experimentan cambios que dan lugar a formas más estables. Estos cambios podrían implicar polimerizaciones. (Marquez, Serratosa, y Merida, 2014; Wilkes y col, 2014). Debido a estas reacciones, el color original de los jugos se distorsiona a medida que las antocianinas se convierten en compuestos poliméricos más pardos. (Rodriguez-Saona, Giusti, y Wrolstad, 1999).

Se demostró que las antocianinas a través de un mecanismo llamado "copigmentación" pueden aumentar su estabilidad (Sari y col., 2012). Un efecto que se deriva de la copigmentación es que el color de estos pigmentos se incrementa debido a que las antocianinas son planas y se asocian con uniones débiles entre sí o con otras moléculas formando estructuras llamadas copigmentos (Zamora, 2003). La reacción se da por interacciones hidrofóbicas de la región plana de la molécula, que son los núcleos aromáticos. Como el ión flavilio tiene forma plana es el único que es capaz de copigmentar y esto trae como consecuencia un efecto intensificador del color (Scheffeldt y Hrazdina, 1978). Se cree que el mecanismo de estabilización se basa en que la copigmentación favorecería las uniones estables de las antocianinas con los flavonoles que serían los cofactores de la polimerización. De esta manera, un alto grado de copigmentación disminuiría la magnitud de la polimerización (Brouillard y Dangles, 1994; Boulton, 2001). Por lo tanto, la formación de compuestos poliméricos pardos estaría inhibida en un sistema que tenga un alto grado de copigmentación. Entre los compuestos que podrían actuar como

copigmentos se incluyen: ácidos fenoles, flavonoides, aminoácidos, nucleótidos, polisacáridos, etc.

La estabilidad de las antocianinas podría mejorarse utilizando tecnologías de microencapsulación, como el secado spray (Ersus y Yurdagel, 2007). La microencapsulación es una técnica mediante la cual los ingredientes sensibles se empaquetan dentro de un material de revestimiento o pared. El material de la pared protege los ingredientes sensibles contra las reacciones adversas y controla la liberación de los ingredientes (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011). Numerosos materiales de pared o agentes de encapsulación están disponibles para la aplicación en alimentos. Los más utilizados son las gomas arábicas, maltodextrinas y algunas proteínas (Mahdavi, Jafari, Assadpoor y Dehnad, 2016). Las maltodextrinas tienen alta solubilidad en agua, baja viscosidad, sabor suave y generan soluciones incoloras (Gibbs y col., 1999).

Franceschinis (2016), en un estudio realizado sobre polvos de jugo de zarzamora, mostró que luego de un año de almacenamiento en un envase adecuado, estos productos podían ser expuestos a diferentes condiciones de luz y temperatura sin perder las características cromáticas y los compuestos bioactivos encapsulados. Además, Franceschinis (2016) sugiere que cuando se desea obtener un polvo de alta capacidad colorante sería recomendable el proceso de liofilización ya que permite obtener polvos formulados con alta concentración de jugo de fruta, con un alto potencial tintóreo. Sin embargo, si se pretende obtener un polvo colorante con menor costo y buenas propiedades físicas se podría utilizar el proceso de secado por spray, pero sería necesario incorporar una mayor concentración de matriz encapsulante.

1.3 Extracción de compuestos bioactivos. Obtención de jugos

Por todo lo expuesto en las secciones anteriores, los compuestos bioactivos, en especial las antocianinas, pueden ser una opción interesante para la industria alimentaria como sustitutos de los colorantes sintéticos y para enriquecer los productos con compuestos beneficiosos para la salud.

Los procesos de extracción del jugo tienen impacto directo sobre el contenido de compuestos bioactivos en el producto final. Para la obtención del jugo se pueden emplear métodos convencionales como la extracción mecánica, o combinar esta técnica con algún otro método que permita obtener un mayor rendimiento de los componentes interesantes del fruto. Desde los últimos tiempos existe un marcado interés en el desarrollo de tecnologías que permitan optimizar la extracción de estos compuestos mediante técnicas combinadas, entre las que se destacan la extracción con microondas, técnicas de ultrasonido y maceración con enzimas.

1.3.1 Extracción enzimática. Enzimas pectinolíticas

El tratamiento de maceración con enzimas es comúnmente empleado como paso previo en el procesamiento de berries para extracción de jugos. Es una metodología que ha tenido importante desarrollo en la industria vitivinícola como paso previo a la producción del vino (Kashyap y col., 2001). Las berries, en especial las grosellas negras, son frutas que tienen altos contenidos de pectinas, lo que genera inconvenientes al momento de procesarlas con el fin de obtener jugos. El procesado mecánico de las frutas ricas en pectinas genera jugos con alta viscosidad. Luego de la separación del jugo, una fracción del mismo permanece

retenida en la pulpa formando parte de una masa gelatinosa. Este hecho dificulta la extracción del jugo por presión o utilizando algún otro método mecánico, generando mermas importantes en el rendimiento. Con la adición de enzimas pectinolíticas, la viscosidad de las frutas disminuye, la estructura gelatinosa se desintegra y el jugo de fruta es fácilmente extraído con mejores rendimientos (Pagan, 2014).

Químicamente, las pectinas son heteropolisacáridos que forman una mezcla de polímeros muy ramificados, con una cadena principal galacturónica y residuos ácidos unidos por enlaces α (1 - 4) (BeMiller y Whistler, 1996). Las cadenas laterales de la molécula de pectina consisten en L-ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa. Los grupos carboxilo del ácido galacturónico están parcialmente esterificados por grupos metilo (Figura 4).

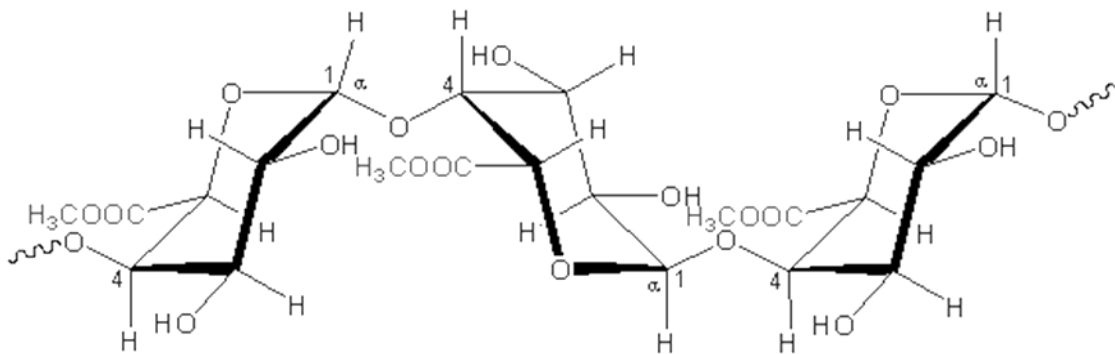


Figura 4. Estructura química de una sección en una molécula de pectina

Las pectinas son el principal componente de la laminilla media de la pared celular y constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. Determinan la porosidad de la pared celular, y por tanto el grado de disponibilidad de los compuestos bioactivos intracelulares. La pared celular se localiza en la parte externa de la

1. INTRODUCCIÓN

membrana plasmática de vegetales. Es una estructura que protege el contenido de la célula, le da rigidez y actúa como compartimiento celular. Las paredes celulares de las plantas están compuestas por microfibras de celulosa; en la parte externa de la capa de microfibras de celulosa se ubica la laminilla media, que es una capa que une las paredes celulares de dos células contiguas. Está formada principalmente por hebras de hemicelulosa embebidas en una matriz de pectinas (Joseleau y Pérez, 2016) (Figura 5).

Las enzimas comerciales utilizadas en la extracción de jugo consisten en paquetes de enzimas pectinolíticas que actúan en diferentes formas catalizando la hidrólisis de sustancias pécticas y celulósicas en las frutas (Figura 6). Hay un gran número de pectinasas comerciales aptas para la aplicación en la industria de jugos de frutas. Es importante conocer la composición enzimática y la capacidad de cada preparación según los objetivos buscados (extracción de compuestos específicos, mejoramiento del rendimiento) para un correcto uso en la industria del jugo (Kashyap y col., 2001; Tapre y Jain, 2014).

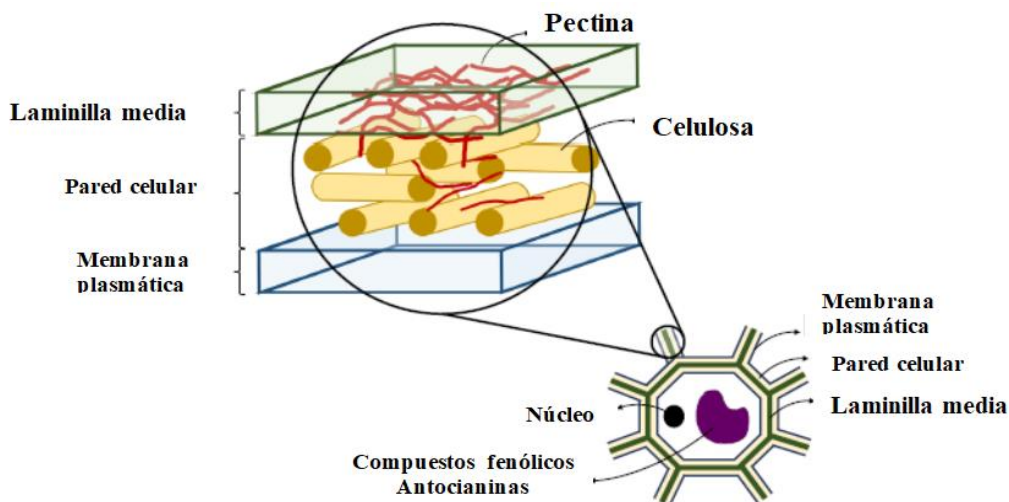


Figura 5. Esquema simplificado de la estructura de la pared celular (Dal Magro y col. 2016).

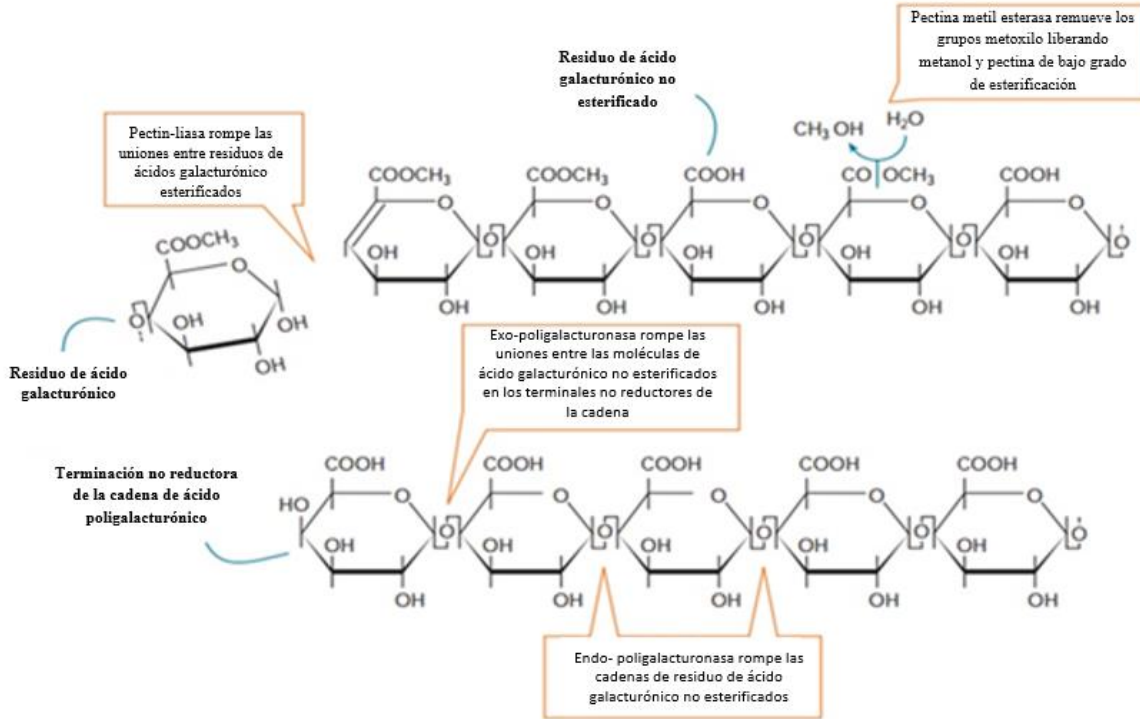


Figura 6. Modo de acción de enzimas comerciales utilizadas en la extracción de jugo (enzimas pectinolíticas).

El complejo pectinolítico está formado principalmente por poligacturonasa, pectina metil esterasa y pectinliasa (Novozymes, 2013). Las preparaciones de enzimas pectinolíticas se utilizan comúnmente en la industria del procesamiento de berries para facilitar la extracción de jugos. Estas enzimas causan la degradación de la matriz de la pared celular, mejorando así el rendimiento del jugo, lo que lleva a una mayor extracción de compuestos fenólicos, particularmente antocianinas y flavonoles (Buchert y col., 2005; Koponen y col., 2008). Estudios sobre grosellas negras han demostrado que el tratamiento enzimático potencia la liberación de antocianinas y otros compuestos fenólicos en jugos (Mieszczakowska-Frac y col., 2012; Petrova y col., 2017).

1.4 Procesos de deshidratación

Los procesos de deshidratación son técnicas ampliamente utilizadas en la industria alimentaria para la preservación de los alimentos. Actúan como métodos de preservación prolongando la vida útil del producto al disminuir el contenido de humedad, limitando el desarrollo microbiano, disminuyendo la reactividad química y previniendo reacciones de deterioro químico y cambios en el estado físico (Bennamoun y Li, 2018).

La tecnología de secado ha evolucionado desde el simple uso de la energía solar hasta la tecnología actual que incluye: secado en horno, de bandejas, en túnel, secado por spray, liofilización, deshidratación osmótica y el uso de microondas (Vega-Mercado y col., 2001).

Algunas ventajas de la aplicación de los métodos de secado, además de garantizar la estabilidad microbiológica de los productos y evitar el riesgo de degradación química y/o biológica, incluyen: disponibilidad de las frutas estacionales en cualquier temporada del año y reducción de los costos de almacenamiento y transporte (Gharsallaoui y col., 2007).

1.4.1 Liofilización

El secado por liofilización es un proceso de deshidratación por sublimación, a bajas temperaturas y alto vacío. En el proceso ocurre simultáneamente transferencia de calor y masa: se entrega calor al producto congelado y se elimina el vapor de agua en forma constante (Karel y Lund, 2003).

La liofilización puede dividirse en tres etapas: la primera etapa es la congelación del producto (enfriamiento). Luego sigue la disminución de la presión circundante hasta un nivel en donde el hielo puede sublimarse. La segunda etapa comienza por el proceso de

sublimación del hielo (secado primario). Una vez que termina el proceso de sublimación, comienza la tercera etapa que se describe por la desorción del agua líquida presente en el alimento (secado secundario). En esta etapa se evapora parte del agua no congelable, que es aquella que interactúa fuertemente con los sólidos y que no se congeló previamente. De esta forma se logra alcanzar muy bajos contenidos de agua. Debido a que el proceso de liofilización se realiza a temperaturas relativamente bajas, el material conserva su calidad y también se vuelve más estable (Ramšak y col., 2017). En la Figura 7 se puede observar un esquema de un equipo de liofilización.

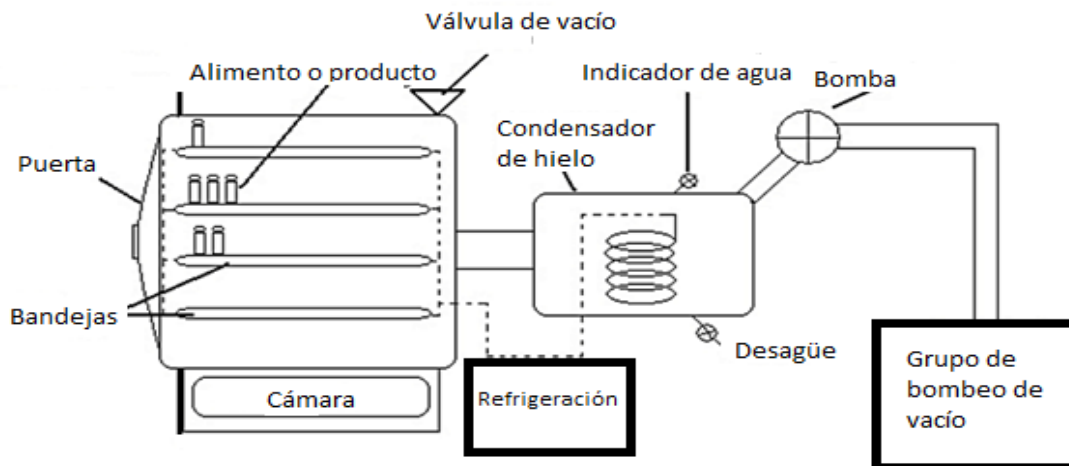


Figura 7. Esquema de un equipo de liofilización. (Parzanese, 2008).

El secado por liofilización se considera uno de los mejores métodos para mantener los atributos de calidad de los materiales sometidos a los procesos de secado, ya que la combinación entre el bajo contenido de agua y la baja temperatura detiene la mayoría de las reacciones de degradación. Cabe resaltar que los productos liofilizados se pueden

reconstituir a su forma y estructura originales mediante la adición de líquido, ya que el material mantiene su forma y la porosidad de los productos liofilizados permite una rehidratación más completa y rápida (Parzanese, 2008).

1.4.2 Secado spray

El secado spray es un proceso de deshidratación por el cual un producto líquido se atomiza en una corriente de aire caliente para obtener en forma instantánea un polvo. Es una operación continua mediante la cual se convierte una solución líquida o suspensión en un polvo seco, debido a la deshidratación de las gotas minúsculas nebulizadas por un atomizador de diámetro comprendido entre 10 a 500 μm . A través del proceso de pulverización el material aumenta considerablemente el área superficial; las pequeñas gotas entran en contacto con el aire caliente en la cámara de secado, el agua se evapora y se van formando partículas secas gradualmente. Por último, el polvo sólido se descarga de la cámara de secado. Cabe señalar que la atomización es la etapa más importante en el proceso de secado spray, ya que al aumentar la superficie de contacto se mejora la transferencia de calor y masa entre el aire seco y la muestra (Gharsallaoui y col., 2007).

En la Figura 8 se representa un esquema de un equipo de secado spray o por aspersion. Está compuesto por: una bomba de alimentación, un atomizador, un calentador de aire, un aspirador de aire, una cámara de secado y un sistema de descarga.

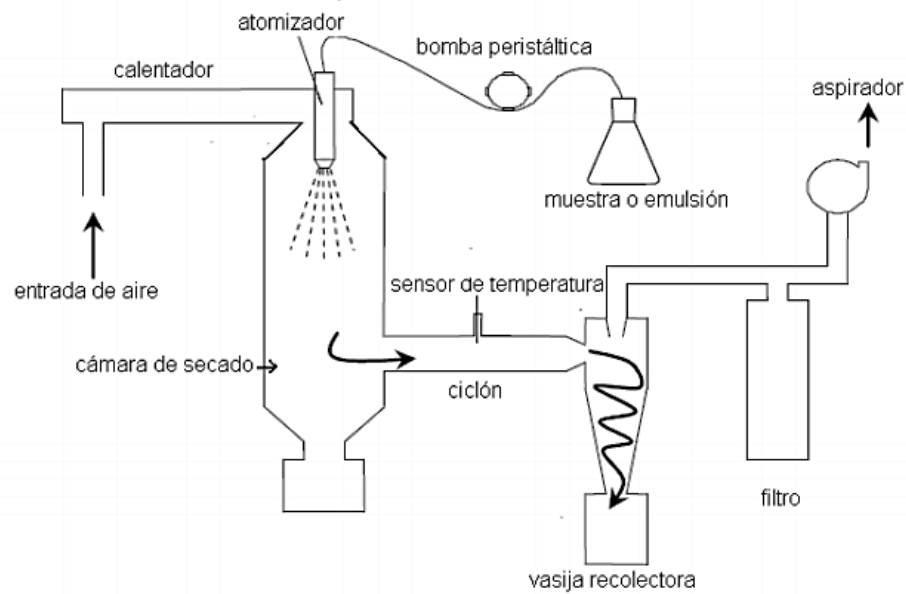


Figura 8. Esquema de secado spray en equipo Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, 2018)

1.5 Aplicación de polvos de berries como colorantes y como fuente de compuestos bioactivos

La industria de alimentos demanda principalmente berries congeladas para transformarlas en dulces, mermeladas, jaleas, conservas, salsas, jugos concentrados, licores, aguardientes, entre otros productos. Cada vez son más las industrias que incorporan berries en sus alimentos, como sucede con los lácteos, golosinas, cereales en barra, bebidas sin alcohol y té.

Por otra parte, el color es uno de los atributos de calidad más importantes de los productos alimenticios que rigen la aceptación del consumidor. Teniendo en cuenta lo anterior, los fabricantes de alimentos a menudo requieren que se agreguen colorantes artificiales a sus productos para garantizar un aspecto deseable durante toda su vida útil. Sin embargo, existe la preocupación por la seguridad toxicológica de los pigmentos sintéticos que ha sido

cuestionada durante varios años, generando mayor interés en el desarrollo de compuestos colorantes naturales estables para su uso como ingredientes alimentarios (Kobylewski y Jacobson, 2010).

Existen numerosos trabajos en donde se estudia la aplicación de las antocianinas como colorantes naturales de fuentes diversas (vegetales), con el doble propósito de aportar color y enriquecer los mismos con compuestos bioactivos: a partir de arroz negro (*Oryza sativa* L., variedad *Artemide*) para productos de panadería (Papillo y col., 2018); a partir de rábanos (*Raphanus sativus*), repollo colorado (*Brassica oleracea*), zanahorias negras (*Daucus carota* L.) y batatas (*Ipomoea batatas*) aplicándolas a sistemas lácteos y jugos (Giusti y Wrolstad, 2003); a partir jugos de arándanos aplicadas en yogurt (Ścibisz y col., 2012), entre otros. Las gelatinas preparadas con jugos de berries pueden ser una excelente opción ya que son frutas muy adecuadas debido a su color y a su acidez, ya que tienen un pH apropiado para la formación de gel (Zhao, 2007).

Es importante recalcar que en diferentes países, incluidos la Argentina, existen diversas restricciones en los aspectos regulatorios de los colorantes en los alimentos (McAvoy, 2014). En general, los concentrados de berries se consideran ingredientes y no se encuentran legislados como colorantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo de esta investigación fue optimizar la extracción de jugos ricos en compuestos bioactivos de grosella negra (*Ribes nigrum*) y posteriormente obtener polvos por secado spray y liofilización. Estos polvos con alta concentración de compuestos bioactivos podrían ser utilizados como fuente de pigmentos naturales e ingredientes funcionales.

2.2 Objetivos específicos

- Optimizar la obtención de jugos ricos en compuestos bioactivos de grosella negra con la asistencia de una maceración enzimática de las frutas.
- Obtener polvos por secado spray y/o liofilización empleando maltodextrina como matriz carrier, para lograr polvos con buena retención de funcionalidad y alta estabilidad al almacenamiento.
- Aplicar el polvo obtenido a un postre de gelatina. Evaluar la estabilidad y el aporte de compuestos bioactivos en el mismo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Se utilizaron grosellas negras (*Ribes nigrum*, variedad Titania) congeladas por el método IQF (Individual Quick Freezing), adquiridas en el mercado local y provenientes de la Patagonia argentina. La fruta se almacenó en un freezer -20°C para su posterior utilización en los análisis correspondientes.

Con el fin de optimizar la extracción de compuestos bioactivos se utilizó una enzima comercial Pectinex® Ultra Color que fue gentilmente donada por Novozymes A/S, (Dinamarca). Pectinex® Ultra Color es un paquete enzimático que tiene actividad de pectinasa y cataliza la escisión del éster metílico del ácido (1,4)-alfa-D-galacturónico (Figura 9) y según consta en el folleto que provee el fabricante, es producida por microorganismos fermentativos.

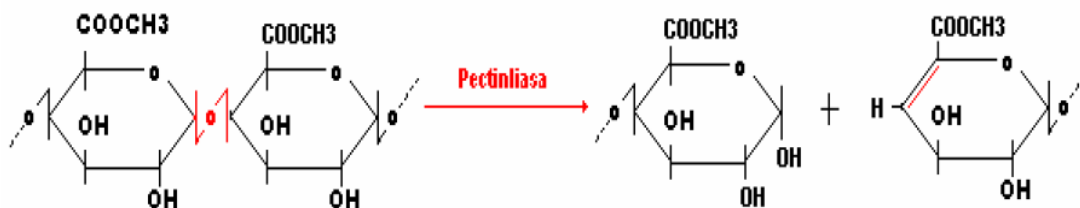


Figura 9. Modo de acción de enzima Pectinex® Ultra Color

El complejo enzimático se almacenó en una heladera a 4°C para su preservación y posterior utilización. En los procesos de secado (liofilización y spray) del jugo de grosella negra se utilizó como matriz carrier maltodextrina (MD) DE 12 (Givaudan S.A., Argentina).

El polvo para preparar gelatina sin sabor marca Royal (Mondelez Internacional, Provincia de San Luis, Argentina) fue adquirido en un mercado local.

Cabe resaltar que el uso de todos los reactivos se ajustó a las normas descritas en las guías de seguridad respectivas. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.2 Caracterización de la fruta

3.2.1 Contenido de agua

Se determinó por secado de la muestra en estufa de vacío AOAC 2000 (920.62), Isotemp 285A, (Dubuque, Iowa, EEUU), a una temperatura de 60-65°C y con una presión menor de 100 mmHg hasta obtener peso constante. Los resultados para la fruta fresca se expresaron en % base húmeda (g de agua/100g de masa total).

3.2.2 pH

El pH (AOAC 2000, 945.27) se determinó con un pH-metro Mettler Toledo Seven Easy (Mettler Toledo, Suiza). Acoplado con un electrodo de vidrio combinado InLab Routine Pro (Mettler Toledo, Suiza), calibrado con soluciones buffer de pH 4,00 y 7,00 (Merck, Argentina).

3.2.3 Acidez total

Se determinó mediante el método AOAC 2000 (945.26). Se pesó una cantidad conocida de muestra de fruta molida y se agregaron 40 mL de H₂O hervida y enfriada. Los jugos se midieron en forma directa. Se valoró con NaOH 0,1N, hasta el punto final (pH 8,1) en un pH-metro Mettler Toledo Seven Easy (Mettler Toledo, Suiza).

3.2.4 Sólidos solubles

Los sólidos solubles se midieron mediante la determinación de °Brix de acuerdo al método AOAC 2000 (932.12), utilizando un refractómetro AR200 (Reichert, NY, Estados Unidos) con valores corregidos a 20°C.

3.2.5 Propiedades químicas y funcionales

Se utilizó un espectrofotómetro Jasco V-630 ultravioleta-visible (Jasco International Co, Ltd, Tokio, Japón) en todas las determinaciones químicas.

3.2.5.1 Antocianinas monoméricas totales (TMA)

El contenido de antocianinas monoméricas totales (TMA) se determinó mediante el método espectrofotométrico de pH diferencial propuesto por Giusti y Wrolstad (2001). Con el fin de medir en forma adecuada a las TMA se realizó una extracción con una solución de etanol 95%:1,5N HCl (85:15). Se preparó un extracto pesando 3,00 g de muestra y luego se mezcló con 35 mL del etanol acidificado en agitador magnético durante 15 min en baño de hielo y protegido de la luz. Posteriormente se filtró con asistencia de vacío utilizando un filtro Whatman (poro: 8-11 µm). El residuo resultante fue sometido a 2 extracciones más utilizando como volumen 10 mL y 5 mL del solvente acidificado para la segunda y tercera extracción, repitiendo de manera idéntica los procedimientos. Los filtrados se unieron en un matraz de 50 mL y se llevó a volumen con el solvente de extracción. El extracto obtenido se almacenó en refrigeración hasta su utilización.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación espectrofotométrica se realizó de la siguiente forma: una alícuota de 1,0 mL del extracto etanólico (EE) se llevó a pH 1,0 con el agregado de 4,0 mL de una solución buffer cloruro de potasio 0,025 M. Se procedió de la misma forma con otra alícuota del EE que se llevó a pH 4,5 utilizando un buffer acetato de sodio 0,4 M. Estas soluciones se diluyeron apropiadamente de modo que la absorbancia a 510 (en pH 1,0) fuera menor a 1. Se dejaron en reposo a temperatura ambiente al resguardo de la luz durante 15 min y se procedió a medir la absorbancia a 510 nm (máxima longitud de onda donde absorben los pigmentos antociánicos) y a 700 nm (para eliminar la interferencia dada por turbidez).

El método se basa en que a pH ácidos (pH 1,0), el catión flavilio presente en las antocianinas (rojo) prevalece y absorbe a 510; cuando el pH aumenta (pH 4,5) hay cambios estructurales en donde prevalecen las formas hemiacetálicas que son incoloras (Figura 10).

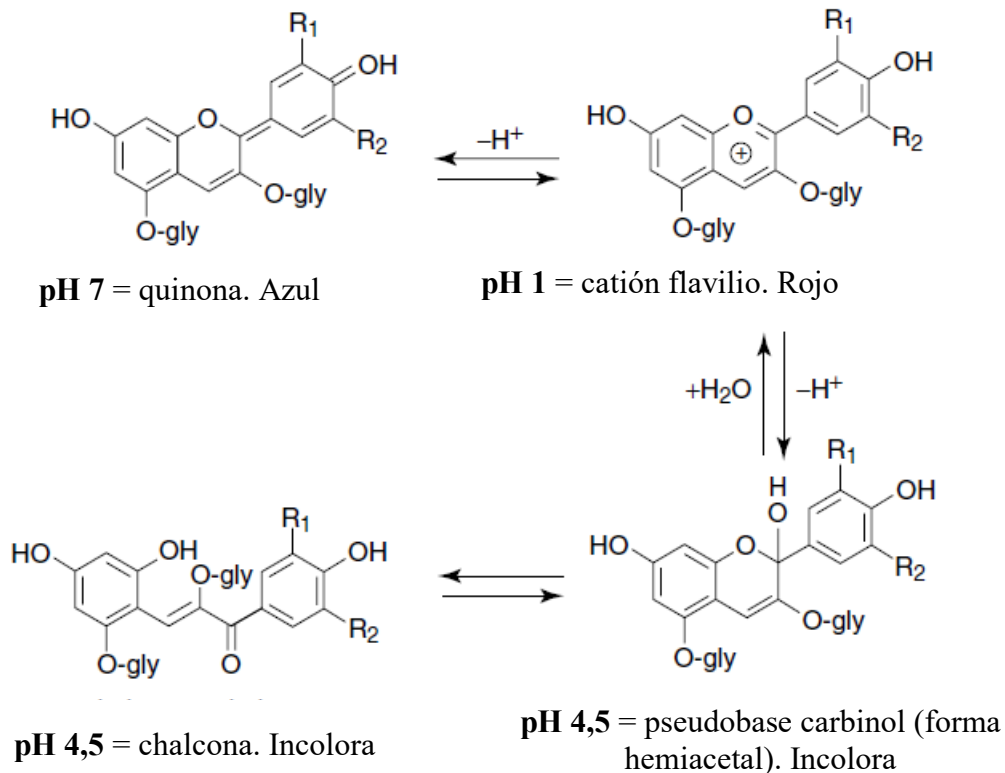


Figura 10. Estructuras predominantes de las antocianinas a diferentes niveles de pH. (Giusti y Wrolstad, 2001)

Bajo condiciones ácidas hay un equilibrio entre el catión flavilio y la pseudobase carbinol de la antocianina, con la existencia de especies transientes como la quinona proveniente de la desprotonación del catión flavilio. La distribución de las cuatro estructuras diferentes de las antocianinas a cada pH en particular bajo condiciones de equilibrio puede llevar a interesantes conclusiones. Se demostró que a valores de pH muy ácidos el catión rojo flavilio existe como la única especie en equilibrio. Con el incremento del pH de la solución la concentración de esta especie disminuye y con ella la pigmentación de la solución. La formación de la chalcona incolora y la quinona azul comienza a pH ligeramente por debajo de la correspondiente constante de disociación (pk) característica del equilibrio entre el

3. MATERIALES Y MÉTODOS

cación de flavilio y la base de carbinol. La proporción de chalcona y quinona aumentan con el pH a expensas de la disminución del catión flavilio. En el rango de pH 4 a 5 las concentraciones de las dos especies coloreadas tienden a ser muy pequeñas pero contribuyen al color de la solución.

La diferencia entre ambas absorbancias medidas a distintos pHs resulta proporcional al contenido de antocianinas monoméricas totales (Wrolstad, 1993) (Ecuación 1 y 2).

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5} \quad \text{Ecuación 1}$$

Finalmente, el valor de TMA se calcula mediante la Ecuación 2.

$$TMA \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{\Delta A . PM . FD . 1000}{\epsilon . L} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

TMA: Antocianinas monoméricas totales; ΔA : Cambio en la absorbancia; PM: Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449,2 g/mol; FD: Factor de dilución; 1000: factor de conversión de gramos a miligramos; ϵ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900 (Giusti y Wrolstad (2001)); L: Longitud de paso de celda, 1cm.

De las berries estudiadas en gran parte de la bibliografía se observa que la mayor parte de las antocianinas presentes corresponden a cianidin-3-O-glucósido (Lee y col., 2015), por esta razón, el contenido de antocianinas monoméricas se expresó como mg de cianidin-3-glucósido/ por g de muestra analizada.

3.2.5.2 Obtención de los extractos para la determinación del contenido de polifenoles totales y de la actividad antioxidante.

Para la determinación del contenido de polifenoles totales y de la actividad antioxidante se obtuvieron los extractos metanólicos (EM) de las correspondientes muestras. Se pesaron 2,50 g de muestra y se le agregaron 7,5 mL de metanol, agitando constantemente durante 3 min utilizando un agitador magnético. El líquido se separó por filtración al vacío y se repitió la operación dos veces más sobre el sólido recuperado. Los extractos obtenidos se combinaron en un matraz volumétrico de 25 mL y se llevaron a volumen con metanol. Todos los procesos para la extracción estuvieron protegidos de la luz y a temperatura de refrigeración.

3.2.5.3 Polifenoles Totales

La determinación del contenido de polifenoles totales (TPC) se llevó a cabo utilizando el método de Folin-Ciocalteu (FC) descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. El reactivo de FC está compuesto por una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico que forma un complejo (ácido fosfomolibdotúngstico) que en medio ácido tiene color amarillo. En presencia de polifenoles y en medio alcalino se reduce formando cromógenos de color azul que absorben a 765 nm (Figura 11).

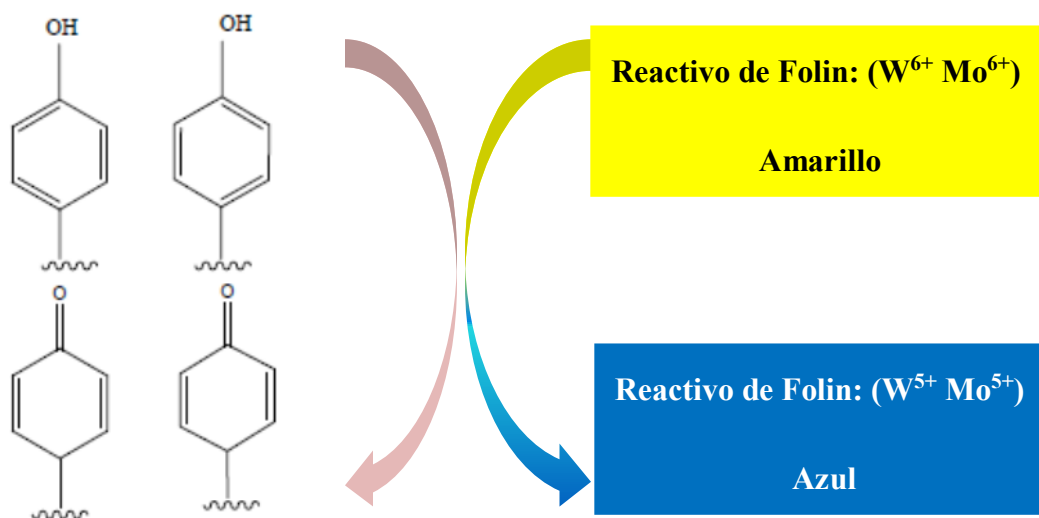


Figura 11. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu

Se mezclaron 100 μL de EM con 900 μL de H_2O destilada, 100 μL de reactivo de FC y 600 μL de Na_2CO_3 al 20% en NaOH 0,1N. Después se realizó la incubación durante 25 min en baño de agua a 40°C. Posteriormente, la solución se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC5C, con rotor SS34 (Sorvall Instruments, Dupont, Estados Unidos) a 12000 g durante 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 765 nm.

Se realizó una curva de calibración con un estándar de ácido gálico (AG) en metanol, utilizando un rango de trabajo de 0,030–0,150 (mg/mL) con la que se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 6,8548 x - 0,0152$, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9841. Los resultados se expresaron como mg de AG por g de muestra analizada.

3.2.5.4 Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante (AA) se determinó sobre el EM, utilizando el método de la decoloración del radical catión del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS⁺) (Coria Cayupán, Ochoa y Nazareno, 2011).

El ABTS⁺, se generó por la interacción de 0,0194 g de reactivo ABTS, 0,0033 g de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y 5,0 mL de agua bidestilada y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h. El persulfato de potasio y el ABTS durante el tiempo de activación reaccionan estequiométricamente en una relación (1:0,5), formando un radical de color verde intenso (ABTS⁺). Posteriormente, la solución se diluyó con buffer fosfato de pH 7,40, hasta obtener una absorbancia cercana a 1,00 medida a 734 nm. Se tomaron alícuotas de 0,1 mL de extracto adicionándole 1,9 mL de solución ABTS⁺ y después de 30 min a 25°C almacenadas en oscuridad, se midió la absorbancia a 734 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺, utilizando la siguiente Ecuación 3:

$$\% I = 100 \times \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

Ac = Absorbancia control: es la absorbancia de la solución de ABTS⁺ conteniendo metanol en lugar de la muestra.

Am = es la absorbancia de la solución ABTS⁺ conteniendo la muestra.

Ab = es la absorbancia de la solución ABTS⁺

Se usaron soluciones de AG en metanol para construir la curva de calibración (0,02-0,12 mg/mL de AG) con un R² = 0,9890. Los resultados se expresaron como mg de AG por g de

muestra analizada. Cabe resaltar que para todas las muestras se realizó una curva de calibración por cada preparación de solución de ABTS, en los intervalos correspondientes.

3.3 Procesamiento de las muestras

3.3.1 Acondicionamiento de la fruta

Como paso previo al tratamiento, la fruta se descongeló y acondicionó. Se colocó en un vaso de precipitado con capacidad de 500 mL en baño de agua a 40°C durante 30 min; posteriormente, usando un procesador manual se trituró durante 90 seg, obteniéndose la pulpa de fruta.

3.3.2 Optimización del proceso de obtención de jugo de grosella negra

Con el fin de mejorar el rendimiento de la obtención de compuestos bioactivos a partir de las frutas, se realizó un tratamiento previo de maceración enzimática con la enzima pectinasa Pectinex® Ultra Color. Para la optimización de las condiciones del tratamiento enzimático en la extracción de jugo de grosella negra, se utilizó un diseño experimental del tipo Box-Behnken (BBD) de tres niveles y tres factores, (Tabla 2), donde se evaluaron los factores: concentración de la enzima (100, 150 y 200 ppm), tiempo de incubación (20, 40 y 60 min) y temperatura del proceso (35, 40 y 45°C). Los límites de los factores se escogieron de acuerdo a las recomendaciones provistas por el proveedor de la enzima. El diseño consistió en un total de dos bloques con 15 puntos experimentales cada uno, incluyendo tres replicados del punto central. Las variables de respuesta fueron: rendimiento, actividad antioxidante (AA) y contenido total de polifenoles (TPC).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Diseño BBD de tres niveles y tres factores

Nº	Temperatura °C	Concentración de Enzima (ppm)	Tiempo (min)
1	-1	-1	0
2	-1	0	-1
3	-1	0	1
4	-1	1	0
5	0	-1	-1
6	0	-1	1
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	1	-1
11	1	1	1
12	1	-1	0
13	1	0	-1
14	1	0	1
15	1	1	0

Los niveles de los factores se codificaron como -1 (bajo), 0 (punto central) y 1 (alto).

Las variables fueron elegidas para determinar las mejores condiciones de tratamiento enzimático. Los resultados se analizaron considerando los diagramas de superficie de las respuestas y los diagrama de Pareto.

3.3.3 Proceso de obtención de jugo de grosella negra

3.3.3.1 Maceración enzimática y obtención de jugo

Para la obtención del jugo de grosella negra mediante el tratamiento enzimático, se partió de la pulpa obtenida de la fruta previamente acondicionada. Esta pulpa se atemperó durante 30 min a la temperatura correspondiente (35, 40 o 45°C) en el recipiente destinado al tratamiento enzimático. Luego se procedió al agregado de la enzima diluida según la concentración correspondiente (100, 150 o 200 ppm) y se dejó actuar durante distintos tiempos de reacción (20, 40 o 60 min), agitando cada 5 min. Al finalizar el tiempo de incubación, la enzima se inactivó aumentando la temperatura del sistema a 70°C en un baño de agua, posteriormente se enfrió la muestra sumergiéndola en un baño de hielo. Una vez enfriada la muestra, se procedió inmediatamente a la separación del jugo mediante centrifugación. Se utilizó una centrífuga refrigerada marca Sorvall RC5C (Sorvall Instruments, Dupont, Estados Unidos), provista con un rotor SS34 a 9700 g y 5°C durante 20 min. El sobrenadante (extracto) obtenido se separó del precipitado (residuo). El resumen del tratamiento completo de la muestra se puede observar en la Figura 12.

Los jugos obtenidos de cada tratamiento enzimático se analizaron según las variables planteadas en el diseño experimental Box-Behnken (BBD) y con ellas se obtuvo un tratamiento enzimático óptimo. Con las condiciones óptimas determinadas y con el procedimiento que se detalló previamente, se realizaron tres extracciones sucesivas sobre el residuo obtenido en cada extracción (al que se le agregó una cantidad de agua igual a la masa de jugo extraída), reuniendo los sobrenadantes logrados en cada uno de los ciclos en un extracto único (Óptimo). El extracto obtenido se almacenó a -20°C para posteriores

análisis o tratamientos. Además, se reservó una alícuota del primer ciclo para posteriores análisis de control. Para evaluar la efectividad del tratamiento enzimático se realizaron dos controles (Control y Control-T) y se los comparó con la alícuota reservada del primer ciclo de extracción del tratamiento óptimo. La muestra denominada Control se realizó sin agregado de enzima y a temperatura ambiente durante el tiempo de tratamiento óptimo. Se realizó para determinar la influencia del proceso enzimático de obtención de jugo sobre el rendimiento y sobre la cantidad de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante. Por otro lado, el Control-T se realizó sin agregado de enzima, pero en las condiciones de tiempo y temperatura del tratamiento óptimo. Se realizó para evaluar la influencia de la temperatura del proceso de obtención de jugo sobre el rendimiento y sobre la cantidad de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante. En ambos casos se realizó solo un ciclo de extracción.

3.3.3.2 Determinación del rendimiento de jugo

Una vez finalizada la centrifugación, se pesó el jugo separado de la pulpa y se calculó el rendimiento relacionando la masa de jugo obtenido con el peso inicial de la fruta molida y se lo expresó como % p/p.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

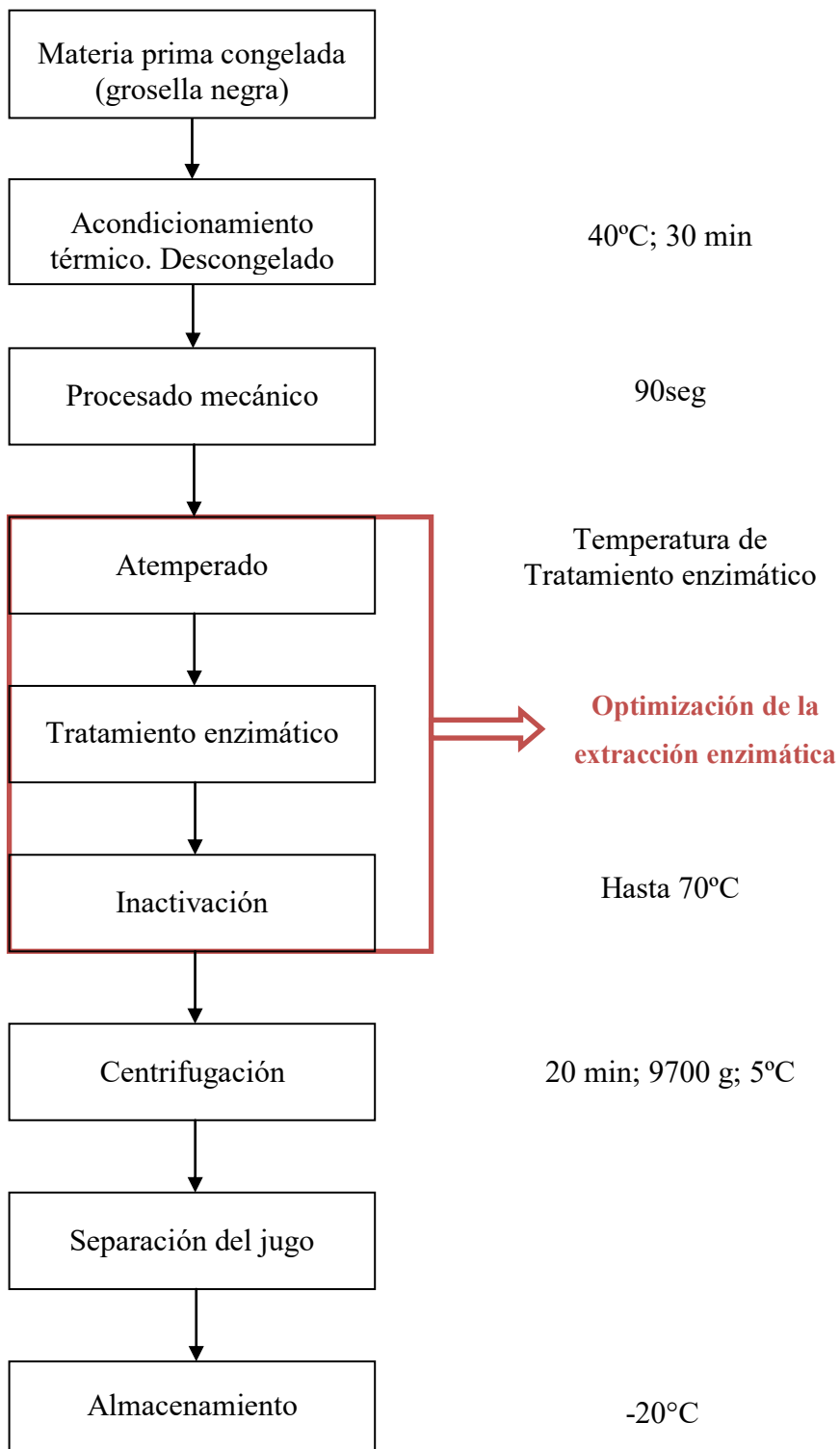


Figura 12. : Diagrama del proceso de obtención del jugo de grosella negra

3.3.4 Obtención de polvos

3.3.4.1 Secado por liofilización

Una fracción de jugo obtenido en las condiciones óptimas se secó por liofilización utilizando dos diferentes concentraciones de matriz carrier (10 y 20% p/p de maltodextrina DE 12). Una vez adicionada la matriz, las muestras fueron congeladas a -20°C . Las muestras se liofilizaron en un liofilizador Alpha 1-4 LD/2-4 LD-2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Alemania) durante 48h a una temperatura de placa condensadora de -55°C y una presión en la cámara de 0,04 mbar. Finalmente se realizó una molienda del producto liofilizado y los polvos obtenidos se almacenaron en freezer en condiciones herméticas hasta sus posteriores análisis.

3.3.4.2 Secado spray

Otra fracción de jugo de grosellas obtenido en condiciones óptimas se secó por spray utilizando como matriz carrier maltodextrina DE 12 en una concentración de 20% p/p. Se llevó a cabo en un secador spray de laboratorio Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Flawil, Suiza). Las condiciones del proceso de secado fueron: temperatura del aire de entrada $170 \pm 3^{\circ}\text{C}$, velocidad de flujo de 8 mL/min, presión de aire 3,2 bar y pulverizador de 1,5 mm de diámetro, la temperatura de salida fue alrededor de 65°C . Las condiciones de secado empleadas fueron optimizadas en trabajos previos con frutas de similares características (Franceschinis y col., 2014).

3.4 Caracterización del polvo de jugo de grosellas negras

3.4.1 Medición de TMA, TPC y AA en el polvo de jugo de grosellas negras

Se determinaron los compuestos bioactivos: TMA, TPC, y AA según los métodos descritos previamente.

Con el objetivo de obtener un jugo con características similares al original, la muestra se reconstituyó en una proporción de polvo:agua, 1:6. Una vez reconstituido, se tomaron 0,50 g de jugo y se disolvieron en 25,0 mL de solvente utilizado para cada determinación.

Cuando se realizó la extracción metanólica del polvo la solución presentó turbidez, por lo que se centrifugó a 27000 g, a 10°C durante 15 min en reemplazo del filtrado.

En las muestras de polvo, el valor de TMA se expresó como mg de cianidina-3-glucósido por 1g de masa seca (mg cn-3-glu/1g.ms), los valores de TPC y AA como mg de AG por 1g de masa seca (mg AG/1g.ms), utilizando la misma curva estándar de AG-metanol descrita previamente para la caracterización de la fruta. Cabe resaltar que para el caso de AA se realizaron curvas de calibración por cada preparación de solución de ABTS, en los intervalos correspondientes.

3.4.2 Contenido de agua. Método de Karl Fischer

El contenido de agua de los polvos se determinó mediante titulación por el método de Karl Fischer. La determinación se llevó a cabo con un titulador automático de Karl Fisher TIM 980 Titration Manager (Villeurbanne Cedex, Francia), utilizando como solvente metanol

anhidro y como reactivo titulante Hydranal - Composite 5 (Riedel-de Haën, Alemania). Los resultados se expresaron en % base seca (g agua/100g de muestra seca).

3.4.3 Actividad acuosa

La a_w se determinó usando un higrómetro de punto de rocío Aqualab Series 3TE (Decagon Devices, Pullman, Washington, Estados Unidos).

3.4.4 Transición vítrea

Se determinó utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) modelo 822e (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza) y los termogramas se evaluaron empleando el software para análisis térmico Star[®] Thermal Analysis System versión 3.1 software (Mettler Toledo AG). El instrumento se calibró con indio (punto de fusión 156,6°C), plomo (punto de fusión 327,5°C) y zinc (punto de fusión 419,6°C). Las determinaciones se realizaron a una velocidad de calentamiento constante de 10°C/min en un rango de temperatura comprendido -80 y 100°C. Todas las mediciones se realizaron en cápsulas de aluminio de 40 µL. Se utilizó una cápsula vacía y perforada como referencia y nitrógeno gaseoso como purga (Para evitar condensaciones en el equipo).

3.4.5 Isotermas de sorción de agua

Se determinaron las isotermas de sorción de agua de los polvos de grosella negra secados por spray y liofilizados, ambos con 20% MD. La determinación se llevó a cabo en un

equipo DVS Intrinsic (Micromeretics, Reino Unido) perteneciente al Laboratorio de Investigación e Ingeniería de Biopolímeros de la Universidad de Los Andes, Santiago de Chile, Chile. El trabajo se realizó en colaboración con los Dres. Paulo Díaz-Calderón y Javier Enrione. Se trabajó con 10,0 mg de muestra equilibrada a entre 0 y 80% de humedad relativa, a 20°C. Se consideró que la muestra alcanzó el equilibrio cuando el valor de dm/dt (pendiente del cambio de masa en función del tiempo) fue menor a 0,0002 (g/min).

3.4.6 Solubilidad

Se determinó acorde al procedimiento descrito por Cano-Chauca y col. (2005), con modificaciones. Se pesaron 0,25 g de polvo en un tubo de 25 mL de capacidad. Se disolvió en 10 mL de agua destilada, luego se llevó a 25 mL con agua destilada y se agitó durante 5 min. A continuación se centrifugó a 3300 g durante 5 min. Se tomaron 10 mL del sobrenadante y se colocaron en una caja de Petri previamente tarada. Finalmente se secó en una estufa San Jor SL70S (Buenos Aires, Argentina), a una temperatura de 105°C hasta registrar peso constante. La solubilidad se calculó por diferencia de peso y se expresó en términos de porcentaje.

3.4.7 Densidad aparente y compactada

La densidad aparente (DA) y compactada (DC) de los polvos de grosella negra se determinaron por los métodos de Santhalakshmy y col. (2015), con algunas modificaciones. Para determinar la densidad aparente (g/mL) se pesó 1,0 g de polvo en una probeta

graduada de 10 mL. Se registró la masa y el volumen ocupado por la misma y se calculó la densidad aparente haciendo la relación de masa/volumen.

Para determinar DC, la probeta graduada conteniendo la muestra de polvo pesada fue agitada durante 1 min en un vórtex, el volumen fue medido nuevamente. Se calculó la densidad compactada haciendo la relación de masa/volumen.

3.4.8 Cohesividad y fluidez

La cohesividad y la fluidez fueron evaluadas por el índice de Hausner (IH) (Tabla 3) y el índice de Carr (IC) (Tabla 4), respectivamente. Se calcularon según la metodología propuesta por Caliskan y col. (2016), según las Ecuaciones 4 y 5 (IH e IC, respectivamente):

$$IH = \frac{DC}{DA} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$IC = \frac{(DC - DA)}{DC} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Tabla 3. Valores para Índice de Hausner

IH	Cohesividad
<1,2	Baja
1,2 – 1,4	Intermedia
>1,4	Alta

Tabla 4. Valores para Índice de Carr

IC	Fluidez
≤15	Muy buena
15-20	Buena
20-35	Regular
35-45	Mala
>45	Muy mala

3.4.9 Densidad verdadera y cálculo de la porosidad

La densidad verdadera (DV) se mide por la relación del volumen ocupado por una masa conocida de polvo, sin incluir el volumen ocupado por los poros internos y los espacios entre las partículas. La determinación de la densidad verdadera se llevó a cabo con un picnómetro de gas (helio) Micromeritics Multivolume Pycnometer 1305 (Micromeritics, Norcross, GA Estados Unidos), perteneciente al Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Tecnológica de la Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile. La determinación formó parte de un trabajo en colaboración con el grupo de trabajo que dirige la Dra Silvia Matiacevich. La porosidad es la medida de los espacios vacíos dentro de un polvo y puede calcularse empleando DV y DA (Ecuación 6) (Michalska y col., 2016).

$$\text{Porosidad} = \left(1 - \frac{DA}{DV}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

3.4.10 Higroscopicidad

Se llevó a cabo de acuerdo con el método de Swaminathan y col. (2015). Se preparó en un desecador una HR de 75% con una solución saturada de NaCl a 75% HR a 25°C, dentro del cual se colocaron las muestras. Se utilizaron cajas de Petri dentro de las cuales se pesó 1,0 g de polvo para asegurar una alta superficie de contacto entre el aire humidificado y el polvo, registrando el peso periódicamente hasta alcanzar el equilibrio. Se graficó la ganancia de peso de las muestras con respecto a la masa seca inicial en función del tiempo. Se calculó el porcentaje de higroscopicidad (% H) como el promedio de los registros de ganancia de peso consecutivos con respecto a la masa inicial en la zona del equilibrio.

3.5 Aplicación del polvo obtenido por secado spray en un alimento

Con el fin de evaluar la aplicabilidad del polvo obtenido en las condiciones óptimas de tratamiento en un alimento, se decidió formular un postre de gelatina, analizar la retención de los compuestos bioactivos, los cambios del color y la formación de sinéresis durante el almacenamiento en refrigeración.

3.5.1 Formulación del postre de gelatina

Se realizaron mezclas físicas en distintas proporciones (1:0,50; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 y 1:5) de una gelatina sin sabor comercial y el polvo obtenido por secado spray. Con las mezclas obtenidas se procedió a elaborar las gelatinas agregando agua en una relación gelatina:agua 1:10, comenzando con la mitad del agua a 100°C y una vez disuelta la mezcla se agregó el

3. MATERIALES Y MÉTODOS

resto del agua a temperatura ambiente. Paralelamente se preparó un control sin polvo de jugo de grosella negra.

La Figura 13 muestra las distintas gelatinas obtenidas con las diferentes proporciones de polvo de grosella negra. Con el fin de seleccionar una de ellas para realizar los estudios de estabilidad, se empleó un panel sensorial interno. El panel, constituido por 8 personas, tuvo que escoger cualitativamente la gelatina que tuviese mayor contenido de polvo de grosella negra conservando una consistencia similar a la del control. La formulación seleccionada fue la que tenía una proporción 1:3 (gelatina: polvo de grosella negra).



Control 1:0,50 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5

Figura 13. Fotografía de las formulaciones de polvo de grosella negra aplicada en gelatina; gelatina:polvo de grosella negra, de izquierda a derecha= Control; 1:0,50; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 y 1:5.

3.5.2 Medición de TMA, TPC y AA en la gelatina

Se determinaron los compuestos bioactivos TMA, TPC y la AA según los métodos descritos previamente. En el caso de la formulación de gelatina, las extracciones para las determinaciones del contenido de TPC y AA se hicieron con el mismo procedimiento que para la determinación del contenido de antocianinas. Esto se debió a que la gelatina precipitaba con metanol y solamente pudo ser disuelta en el etanol acidificado (pH 1,0).

Debido a que la extracción en la gelatina fue con un solvente diferente al utilizado en jugo y polvo de fruta, los resultados no fueron comparables. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron en gelatina fueron comparables entre sí, evaluándose el contenido de los mismos en las distintas formulaciones y la estabilidad de los componentes bioactivos a través del tiempo de almacenamiento.

Para las muestras de gelatina los valores de TMA se expresaron como mg de cianidina-3-glucósido por 1g de gelatina (mg cn-3-glu/1g de gelatina). Los valores de TPC y AA se expresaron como mg de AG por 1g de gelatina. Para TPC se realizó una curva de calibración con estándar de AG en etanol utilizando un rango de trabajo de 0,030–0,150 (mg/mL). La ecuación obtenida fue $y = 8,6005 x - 0,0391$ con un $R^2 = 0,987$. Cabe resaltar que para AA en todas las muestras se realizó una curva de calibración por cada preparación de solución de ABTS, en los intervalos correspondientes.

3.5.3 Análisis de la vida útil refrigerada

Determinada la proporción de polvo/gelatina adecuada, se mezclaron ambos polvos, se preparó la gelatina y luego se distribuyó en viales de vidrio, que se almacenaron a 4°C durante 15 días.

3.5.3.1 Medición de compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Se determinaron los compuestos bioactivos (TMA y TPC) y AA, a los 0 y 15 días de almacenamiento.

3.5.3.2 Determinación de color superficial

Para proceder a la determinación de color superficial de las gelatinas, éstas se dispusieron en viales de 5 mL (Figura 14). Se usó un recipiente cilíndrico blanco para cubrir el vial y estandarizar las mediciones. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado utilizando un fotocolorímetro triestímulo Konica Minolta CM-700d (Konica Minolta Inc, modelo CM-700d, Japón). Los parámetros L^* a^* y b^* del espacio de color CIELAB se obtuvieron utilizando un iluminante D65 y 2° de ángulo de observador estándar.



Figura 14. Muestras de gelatina empleadas en la evaluación de color. Transparentes (control gelatina); Coloreadas (muestras de formulación óptima para gelatina)

Las variables del espacio CIELAB son: L^* que representa la luminosidad, cuyos valores van de 0 a 100, a^* que varía del verde (-) al rojo (+) y b^* que varía del azul (-) al amarillo (+) (Hutchings, 1994; MacDougall, 2002).

Se calcularon las funciones de color croma métrica (C^*ab) (Ecuación 7) y ángulo de tono h^*ab (Ecuación 8). C^*ab y h^*ab se corresponden con los atributos de color: saturación y tono respectivamente (Joshi y Brimelow, 2002; MacDougall, 2002).

$$C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$h_{ab}^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{Ecuación 8}$$

Para el cálculo de la diferencia global de color (ΔE) en la industria suele usarse el sistema CIELAB Sin embargo, con el objeto de mejorar la relación entre los resultados obtenidos con el cálculo y las diferencias percibidas por el ojo humano, la organización CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) recomienda utilizar la fórmula de acuerdo a CIEDE2000 (Ecuación 9). Estas diferencias ocurren debido a la falta de uniformidad en el espacio de color CIELAB (Chung y Chen, 2011). Se calculó la diferencia global de color (ΔE_{00}) utilizando el siguiente cálculo:

$$\Delta E_{00}^* = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L} \right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C} \right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H} \right)^2} + R_T \frac{\Delta C'}{k_C S_C} \frac{\Delta H'}{k_H S_H} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde las diferencias métricas entre los valores iniciales y finales de las muestras, según las siguientes relaciones (sobre las bases recomendadas para el espacio de color CIEDE 2000) son: $\Delta L' = (L_0^* - L^*)$; $\Delta C' = (C_0^* - C^*)$; $\Delta H' = 2 \sqrt{C_0' C_1'} \sin(\Delta h'/2)$. Mientras que, $k_L S_L$, $k_C S_C$ y $k_H S_H$ son factores de ponderación usados para corregir las diferencias en las correspondientes coordenadas. R_T es una función (la llamada función de rotación) que da cuenta de la interacción entre croma y las diferencias de matiz en la región del azul (Luo, Cui y Rigg, 2001; Ghinea y col., 2010).

3.5.3.3 Evaluación de la sinéresis

La sinéresis se determinó midiendo el volumen del líquido exudado por la gelatina al cabo de 15 días de almacenamiento (en refrigeración a 4°C) y comparándolo con el volumen inicial de la gelatina.

Debido a la influencia de los °Brix y el pH sobre la sinéresis de la gelatina se realizaron los siguientes controles:

- Control del efecto del polvo de jugo de frutas: se elaboró la gelatina sin el polvo de jugo de frutas.
- Control de efecto del pH: la gelatina se elaboró siguiendo las instrucciones del envase, pero se llevó al pH de la gelatina formulada con el polvo de jugo de grosella negra ($3,67 \pm 0,01$).
- Control del efecto de la maltodextrina: la gelatina se elaboró siguiendo las instrucciones del envase, pero la cantidad de polvo de jugo óptimo fue reemplazado por maltodextrina, despreciando los sólidos presenten en el jugo.

3.6 Análisis estadístico

El diseño experimental, el análisis de datos y los gráficos de superficie de respuesta se obtuvieron con el programa Statgraphics Centurion XVI statistical program (Virginia, Estados Unidos, 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los resultados fueron analizados considerando los diagramas de superficie de respuesta, diagrama de Pareto, y la validación del método se realizó de acuerdo al porcentaje de desviación estándar del diseño BBD.

Se utilizó el software estadístico GraphPad Prism para evaluar mediante ANOVA las diferencias entre los distintos tratamientos aplicados. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se expresaron en términos del promedio y su desviación estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de las grosellas negras

Las propiedades fisicoquímicas de las grosellas negras (*Ribes nigrum*) se describen en la Tabla 5. Los valores de humedad, °Brix, pH y acidez de la muestra fueron similares a los reportados por Archaina y col. (2018), y por Raudsepp y col. (2010), ambos trabajos llevados a cabo con el mismo cultivar de grosella negra. Otros autores encontraron valores de pH similares para jugos de grosellas negras variedad Titania (Mikulic y col., 2015; Contessa y col., 2013).

Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de la grosella negra (*Ribes nigrum* variedad Titania).

Caracterización fisicoquímica grosella negra	Media ± D.E.
Humedad (% base húmeda)	77 ± 2
Acidez total (% ácido cítrico)	2,92 ± 0,08
Grados Brix (°Bx)	15,50 ± 0,43
pH	2,80 ± 0,10
TMA (mg de cyd-3-glu/g fruta)	2,47 ± 0,16
TPC (mg AG/ g fruta)	4,30 ± 0,18
AA (mg AG/ g fruta)	2,47 ± 0,05

Los valores de TMA, TPC y AA encontrados en bibliografía para berries son altamente variables y aun también específicamente los informados para grosellas negras ya que dependen de innumerables factores tales como condiciones climáticas, época del año, localización y características intrínsecas de la planta como: cultivar y estado de madurez (Vagiri y col., 2013; Krüger y col., 2012; Zheng y col., 2012). Esto se debe a que la síntesis de compuestos bioactivos está regulada por factores tanto medioambientales como

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

posteriores a la cosecha, incluidos las condiciones climáticas, la madurez de la fruta y el almacenamiento (Serra y col., 2011). Por otra parte, muchas veces los valores que se encuentran en bibliografía, a pesar de ser determinados con el mismo método, pueden diferir en la extracción de los compuestos bioactivos y como consecuencia de esto los resultados varían significativamente (Fredes, 2009). La extracción es un paso muy importante en la determinación de estos compuestos y en donde generalmente hay un solvente de extracción involucrado. El tipo y la polaridad de este solvente de extracción, además del tiempo y la temperatura del procedimiento influyen cuantitativamente en los resultados (Naczk y Shahidi 2006). Djordjević y col. (2013), reportó un contenido de TMA de 0,53 mg cyn-3-glu / g de fruta fresca para grosella negra (variedad Titania) aunque estos autores hicieron primero una extracción con metanol y posteriormente diluyeron en etanol acidificado. Moyer y col. (2002), obtuvieron un valor de antocianinas de 2,81 mg por gramo de grosella negra variedad Titania, a partir de un extracto en donde mezclaron agua y cloroformo.

Con respecto al contenido de TPC, se pueden encontrar en bibliografía varios autores que reportan diferentes contenidos en mg de AG para grosella negra variedad Titania usando el método de Folin–Ciocalteu con algunas modificaciones y además con distintos métodos de extracción. Anttonen y Karjalainen (2006), trabajaron comparando distintos métodos de cultivo (orgánico o convencional) en distintas variedades no especificadas de grosella negra y obtuvieron valores de TPC en un rango de 6,67 a 8,00 mg de AG/g de fruta fresca con una extracción asistida por microondas. Balogh y Stefanovits (2010), determinaron para la variedad Titania un contenido de 48,03 mg AG por gramo de masa seca de fruta, en este

trabajo los compuestos bioactivos se extrajeron en agua por medio de agitación en vórtex y luego se diluyeron en metanol.

Los valores obtenidos de TMA, TPC y AA son similares a los obtenidos por Gagneten y col. (2018), para la misma variedad de fruta determinados con los mismos métodos de extracción y medición.

4.2 Optimización de la extracción enzimática de jugo de grosella negra

Se obtuvieron los distintos jugos de grosellas negras correspondientes a las diferentes variables [(temperatura (T), concentración de la enzima ($[E_T]$), tiempo de extracción (t)] planteadas en el diseño experimental descrito en el ítem 3.2.3. Estas variables se optimizaron mediante el uso de superficie de respuesta (diseño experimental: Tabla 6) con el fin de encontrar las mejores condiciones de extracción que maximizaran las respuestas rendimiento, TPC y AA.

La Figura 15 muestra los efectos del tiempo y la temperatura de extracción sobre el rendimiento, los valores de AA y TPC a una $[E_T]$ constante (150 ppm).

En primera instancia, se observó que ambas variables influyeron positivamente sobre el rendimiento, aunque el efecto del tiempo de maceración fue mayor (Figura 15 a). En la Figura 15 b se puede observar que el valor de AA no se vio afectado por ninguna de las dos variables. Los valores de la respuesta TPC aumentaron con ambas variables, principalmente con el tiempo de maceración (Figura 15 c).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Diseño experimental de variables y respuestas. Combinaciones de temperaturas, concentraciones de enzima y tiempos de tratamientos usados en el diseño BBD para la determinación de Rendimiento, AA y TPC.

N°	T °C	[E_T] (ppm)	t (min)	Rendimiento (%)	AA (mg AG/ g extracto)	TPC (mg AG/ g extracto)
1	35	100	40	55,0±0,9	1,52±0,08	5,80±0,13
2	35	150	20	52,7±1,7	1,14±0,11	5,13±0,13
3	35	150	60	62,7±1,9	1,86±0,05	6,07±0,07
4	35	200	40	60,7±1,8	1,71±0,16	5,82±0,27
5	40	100	20	54,4±0,5	1,48±0,12	5,41±0,15
6	40	100	60	60,0±2,3	1,92±0,12	5,81±0,27
7	40	150	40	57,9±0,3	1,50±0,10	5,12±0,35
8	40	150	40	56,6±1,5	1,63±0,08	5,68±0,37
9	40	150	40	57,7±0,2	1,90±0,11	6,37±0,45
10	40	200	20	56,0±0,1	1,64±0,06	5,64±0,28
11	40	200	60	62,7±0,1	2,07±0,14	6,42±0,26
12	45	100	40	59,2±1,7	1,99±0,07	6,25±0,06
13	45	150	20	57,1±0,9	1,74±0,05	6,04±0,10
14	45	150	60	62,4±3,2	1,97±0,08	6,64±0,19
15	45	200	40	64,4±0,6	2,17±0,03	6,67±0,19

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

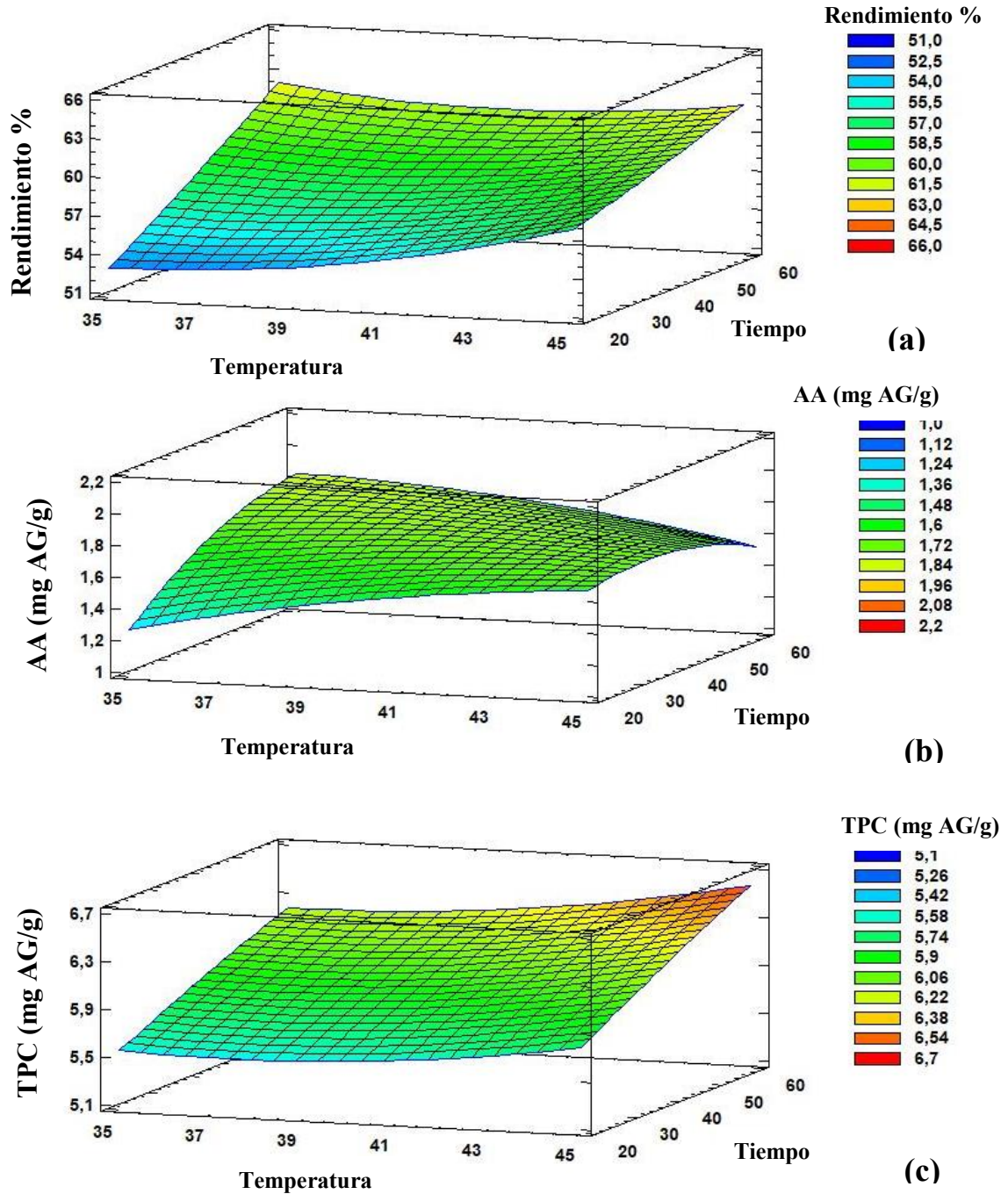


Figura 15. Efecto del tiempo de reacción y temperatura para una concentración de enzima constante (150 ppm) sobre las variables respuestas: Rendimiento % (a), AA (b) y TPC (c).

En la Figura 16 se observa el efecto de la temperatura de trabajo y la $[E_T]$, sobre los valores de respuesta de rendimiento, AA y TPC, a un tiempo de maceración constante de 40 minutos.

El rendimiento aumentó con ambas variables T y $[E_T]$, pero ninguna de los dos variables lo hizo en forma marcada sobre esta respuesta (Figura 16a). Sobre los valores de AA se observó un aumento con el incremento de la concentración de la enzima pero la temperatura de trabajo no afectó el valor de AA (Figura 16b). Por último los valores de TPC aumentaron con el incremento de la concentración de enzima pero no ocurrió lo mismo con el aumento de la temperatura de trabajo (Figura 16c).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

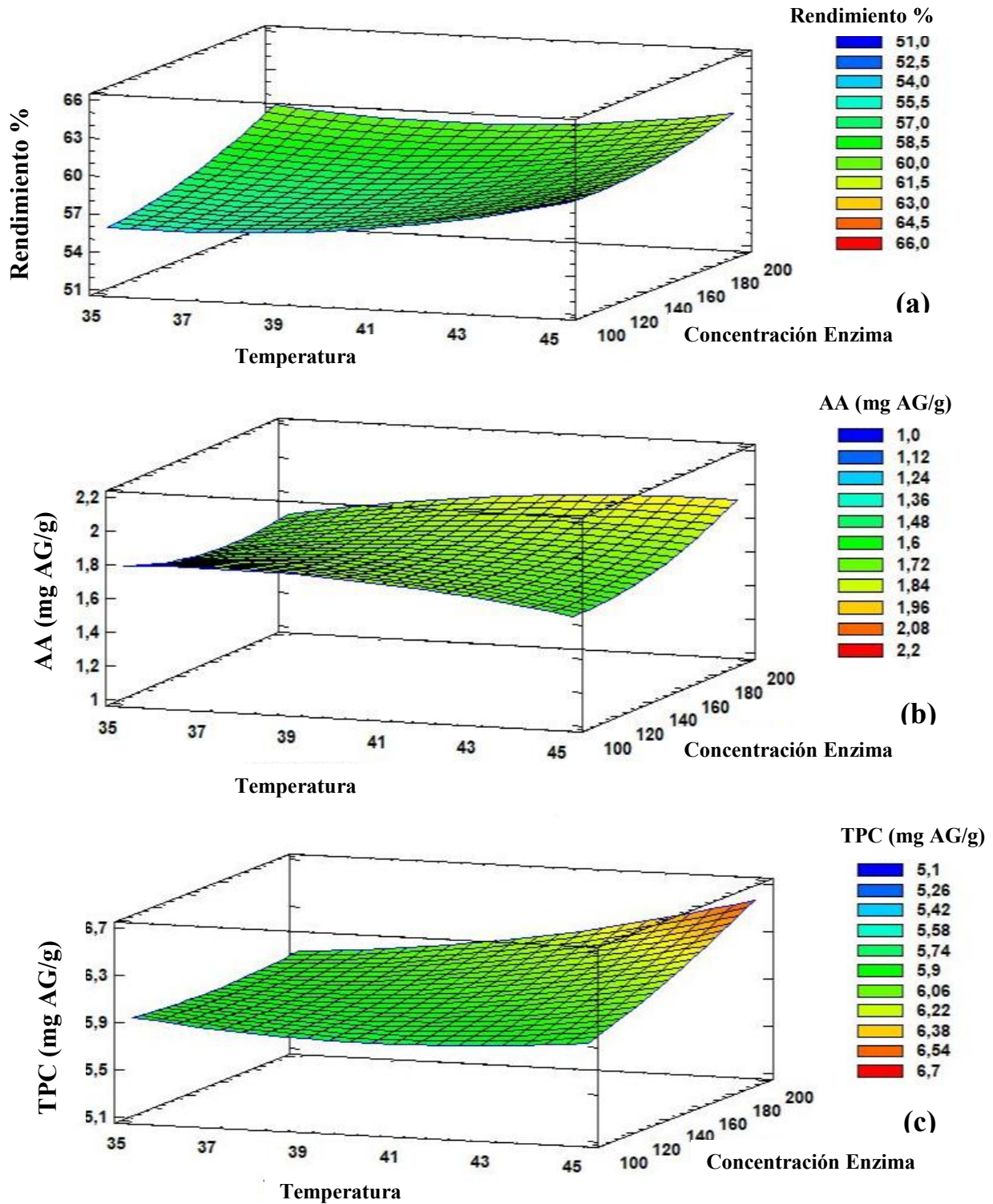


Figura 16. Efecto de la concentración de enzima y la temperatura sobre: Rendimiento % (a), AA (b) y TPC (c) a tiempo constante (40 min)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

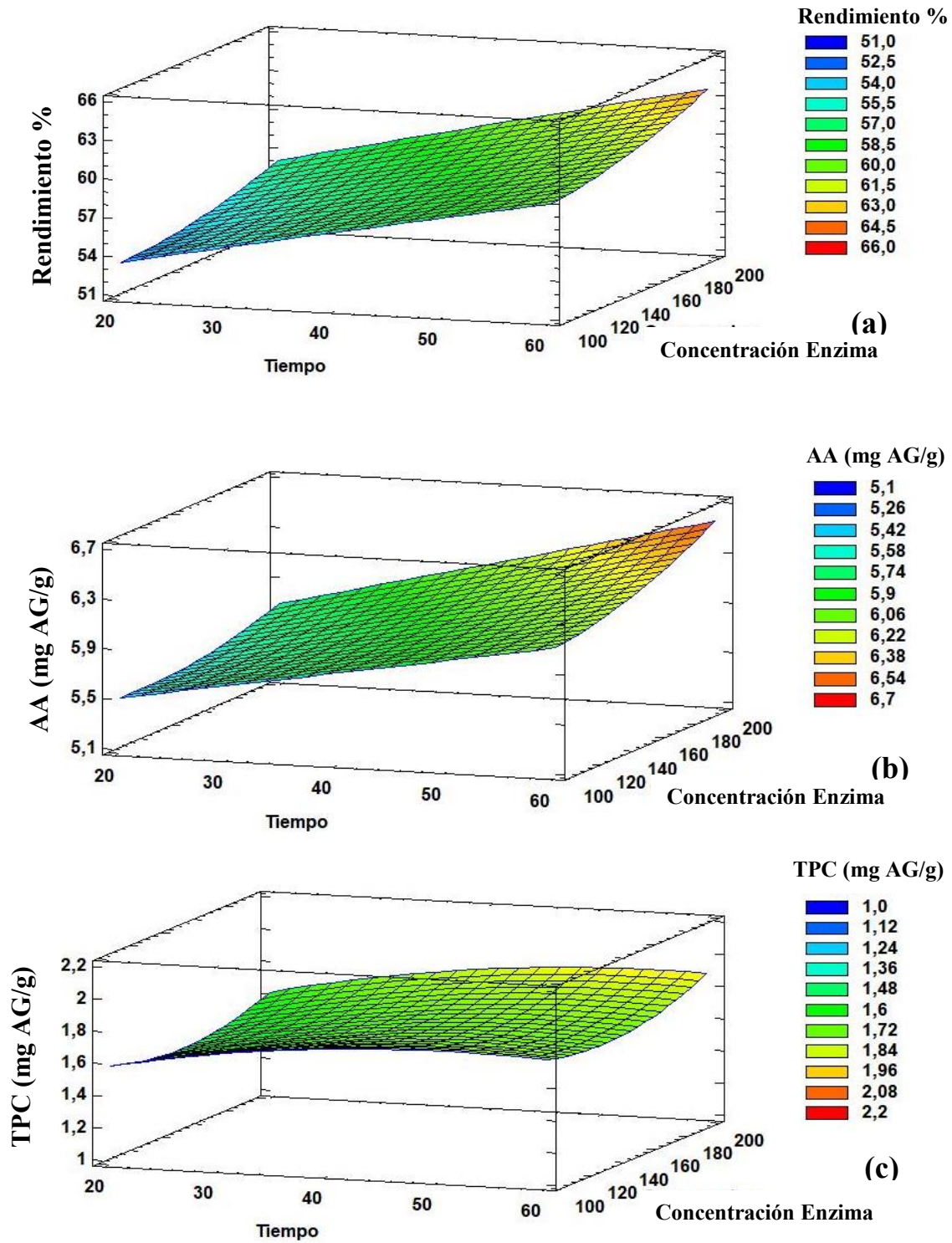


Figura 17. Efecto del tiempo de extracción y la concentración de enzima sobre: Rendimiento (a),

AA (b) y TPC (c) a Temperatura constante (40°C).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 17 se analizó el efecto del tiempo de maceración y la $[E_T]$ a una temperatura de trabajo constante (40°C) sobre las respuestas. En este caso ambas variables afectaron positivamente sobre las tres respuestas en forma marcada (Figura 17 a, b y c).

Con el fin de organizar las variables para asignar un orden de prioridades se utilizó un diagrama de Pareto (Figura 18). En el diagrama se discriminaron las variables de acuerdo a su efecto directo con la respuesta y su significancia.

La Figura 18a muestra que las variables (t), $[E_T]$ y T, tuvieron un efecto positivo y significativo sobre el rendimiento, es decir que contribuyeron al aumento del mismo al momento de la extracción. Para la AA (Figura 18b), las tres variables tuvieron un efecto positivo, sin embargo, estas no tuvieron una contribución significativa en la respuesta. Finalmente, el efecto de las variables sobre el TPC se observa en la Figura 18c. Los tres factores tuvieron efecto positivo, aunque solo en los casos del tiempo de extracción y la $[E_T]$ esta contribución fue significativa. Entre estas dos variables, el aporte de la $[E_T]$ fue menor (baja significancia), en comparación al tiempo de extracción (alta significancia).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

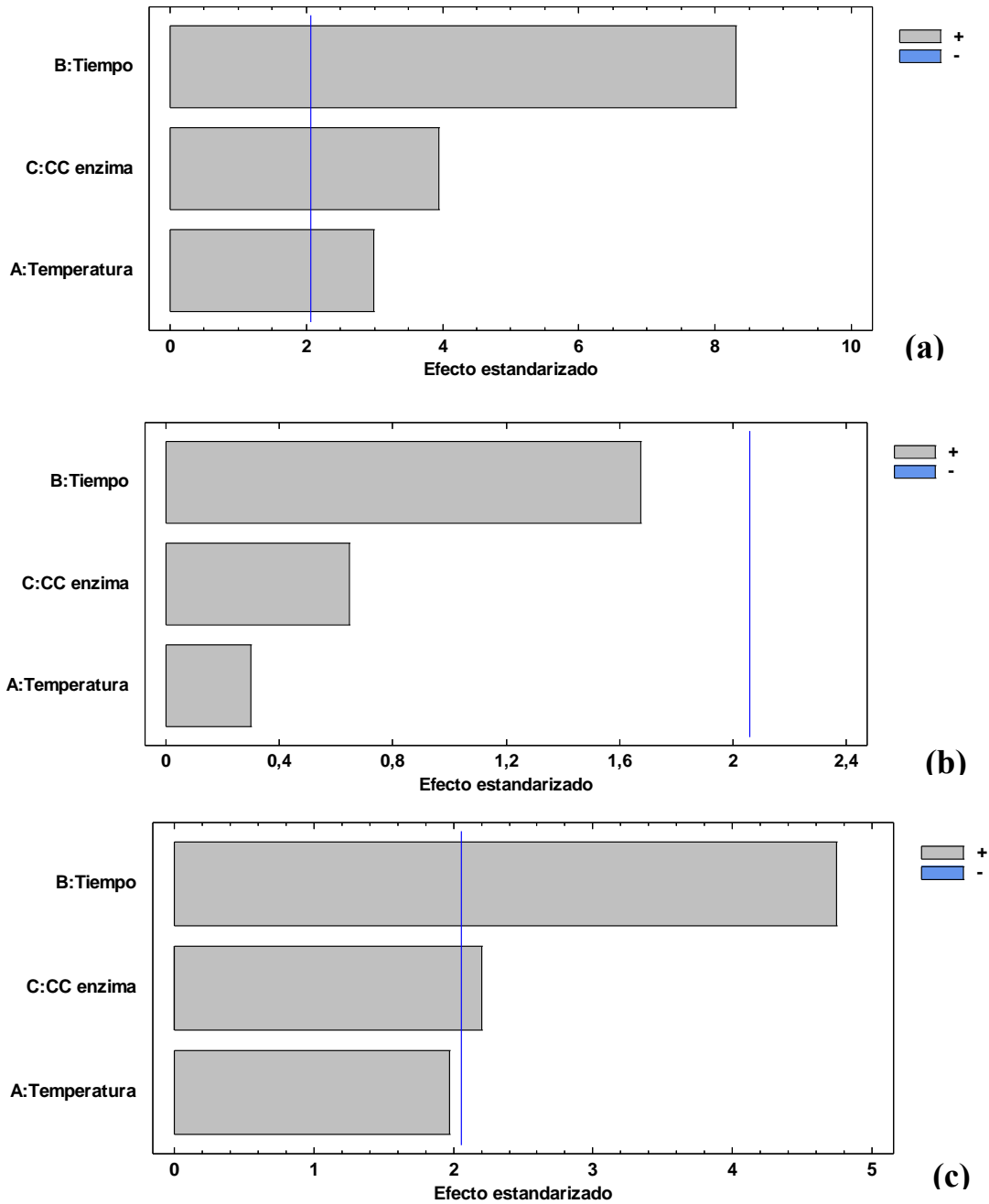


Figura 18. Diagramas de Pareto que discriminan el efecto (positivo o negativo) y la contribución significativa de las variables: tiempo, concentración de enzima y temperatura; sobre las respuestas (a) Rendimiento, (b) AA y (c) TPC.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos para este diseño se definieron las condiciones óptimas de la extracción enzimática (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones óptimas para extracción con enzima.

Factor	Valor
Temperatura (°C)	45
Tiempo (min)	60
Concentración de Enzima (ppm)	200

Los valores predichos por el modelo para las respuestas (rendimiento, AA y TPC) a las condiciones óptimas establecidas por el diseño experimental BBD se compararon con los valores experimentales obtenidos en dichas condiciones con el objetivo de validar el modelo BBD. Estos resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultado de extracción enzimática de acuerdo al diseño BBD

Variables	Valores predichos por BBD	Valores experimentales (Primer ciclo de extracción)
Rendimiento (%)	64,80	64,5±0,6
AA (mg AG/ g extracto)	1,87	2,61±0,18
TPC (mg AG/ g extracto)	6,69	4,99±0,01

En la Tabla 8, se puede observar que el valor obtenido experimentalmente del rendimiento se aproximó en gran medida al valor predicho (99,5% de ajuste). Para las otras respuestas el nivel de ajuste fue menor, obteniéndose para AA un valor experimental 40% más alto y para TPC un valor 25% menor que los predichos.

4.2.1 Efecto de la enzima y la temperatura sobre el proceso de extracción

El efecto de la enzima en el proceso global de la extracción, descrito previamente, se analizó realizando un tercer extracto con las condiciones óptimas de tratamiento enzimático y dos controles paralelos en condiciones específicas: uno denominado Control sin la aplicación de temperatura ni enzima y otro llamado Control-T a la temperatura óptima pero sin el agregado de enzima. Ambos tratamientos control se aplicaron durante el mismo tiempo de maceración óptimo.

En la Figura 19 se muestra el contenido total de compuestos bioactivos obtenidos luego del primer ciclo de extracción expresado por cada 100 g de fruta fresca. Para ello se tuvo en cuenta el total de jugo obtenido (Rendimiento del primer ciclo: $64,48 \pm 0,60$) y la concentración del compuesto bioactivo o valor de actividad antioxidante en el mismo.

En general, se observó que tanto el extracto óptimo como el Control-T presentaron un aumento en la concentración de compuestos bioactivos en comparación con el Control. En este sentido, el aumento de la temperatura del medio, como se esperaba, favoreció la extracción. El extracto óptimo mostró un incremento de AA, TPC y ACY de 2,8, 2,4 y 2,7 veces respecto del control, mientras que con respecto al Control-T los incrementos fueron de 1,5, 1,7 y 1,8 veces, respectivamente. Al analizar solamente el rendimiento de extracto respecto del control, en el caso del óptimo se observó un aumento del 13%, mientras que el Control-T no mostró modificaciones. Sin embargo, en el caso del Control-T cuando se relaciona el rendimiento de jugo con los compuestos bioactivos extraídos, se observó que la

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

temperatura tuvo un efecto positivo, obteniéndose aumentos de 54, 45 y 30 % para TMA, TPC y AA, respectivamente, respecto del control.

Fue evidente que la elevada recuperación de compuestos bioactivos se debería a que la acción enzimática no solamente favorecería el aumento de la obtención de extracto, sino la mayor liberación de compuestos bioactivos desde la fruta hacia el líquido extraído. Otros autores obtuvieron resultados similares en el uso de este tipo de enzimas y lo atribuyeron a la degradación de la matriz de la pared celular (Buchert y col., 2005; Koponen y col., 2008). Los resultados del presente trabajo se corresponden con estudios realizados por Bender y col. (2017), en donde los tratamientos con enzima Pectinex® Ultra Color mejoraron la actividad antioxidante *in vitro* con respecto al tratamiento control. Buchert y col. (2005), obtuvieron jugo de grosella negra mediante prensado utilizando enzimas pectinasas como tratamiento previo. Los autores concluyeron que el tratamiento enzimático influye fuertemente sobre los resultados obtenidos ya que aumentó simultáneamente el rendimiento del jugo y la transferencia de compuestos valiosos en el jugo. Koponen y col. (2008), aplicaron un tratamiento enzimático similar al trabajo anterior sobre grosellas negras y concluyeron que, si bien la extracción aumentó, el perfil de antocianinas se modificó luego de la extracción asistida por enzimas. Cabe aclarar que estas comparaciones se efectuaron solamente en el primer ciclo de extracción debido a que en los siguientes ciclos se repuso el agua que había sido extraída junto con el jugo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

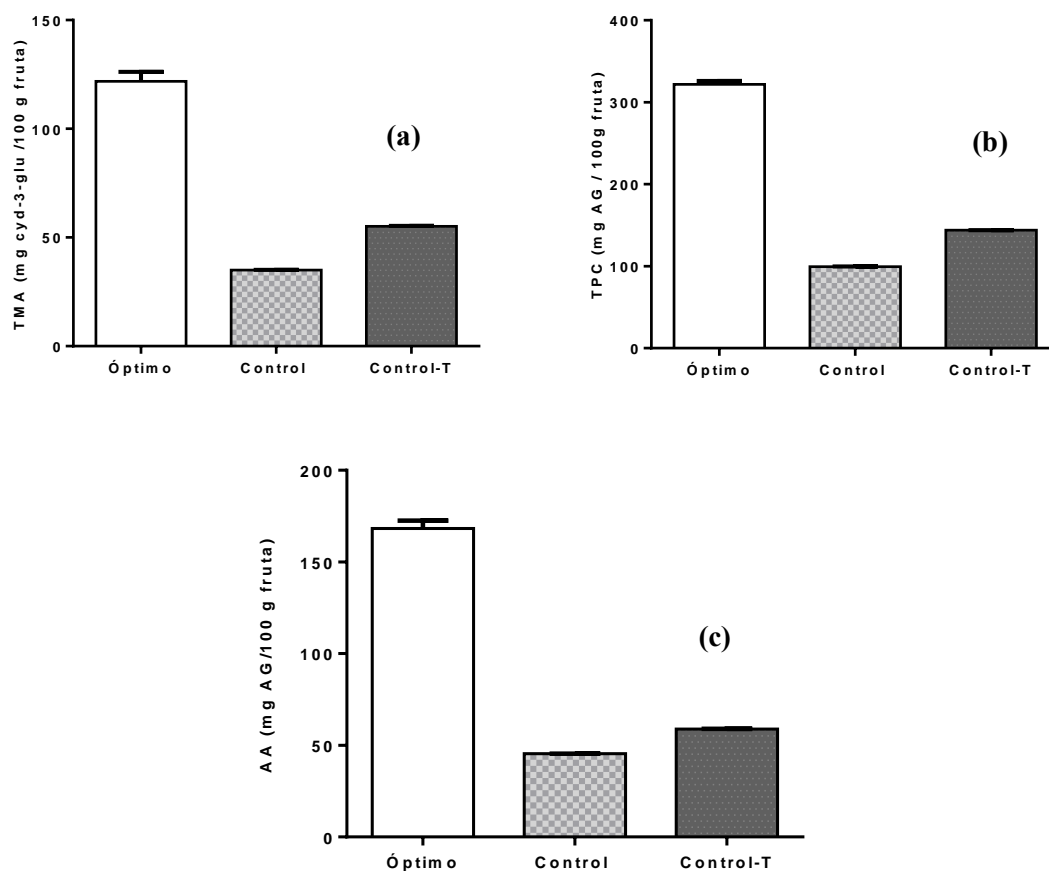


Figura 19. Contenido total de compuestos bioactivos obtenidos luego del primer ciclo de extracción/100 g de fruta fresca para el óptimo y para el Control y el Control-T por 100 g de fruta fresca.: (a) TMA; (b) TPC y (c) AA.

El residuo obtenido luego de la primera extracción mostró una elevada concentración de compuestos bioactivos, por tal motivo se decidió realizar extracciones consecutivas sobre el mismo. Luego de cada extracción se analizó el rendimiento y las concentraciones de AA, TPC y TMA. De acuerdo con estos datos se decidió realizar tres extracciones consecutivas, los valores obtenidos para cada ciclo se puede observar en la Tabla 9.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que los extractos obtenidos a partir del segundo y tercer ciclo tenían concentraciones significativas de los bio-compuestos, representando aproximadamente 40% y 20% (respecto de lo obtenido en el primer ciclo) para el segundo y tercer ciclo, respectivamente. Una vez obtenidos los extractos en cada ciclo, se reunieron en un único extracto, optimizándolos no solo con la extracción asistida con enzima, sino que además por recuperación de procedimiento cíclico.

Tabla 9. Rendimiento y concentraciones de AA, TPC y TMA en cada uno de los ciclos de extracción.

Ciclo	AA (mg AG/ g extracto)	TPC (mg AG/ g extracto)	TMA (mg de cyd-3-glu/g de extracto)
1	2,61±0,18	4,99±0,01	1,99±0,02
2	0,95±0,08	1,83±0,03	0,61±0,01
3	0,45±0,03	0,84±0,07	0,26±0,01

4.3 Caracterización de polvos de grosellas negras

El desarrollo de productos en polvo a partir de jugos de frutas ricas en compuestos bioactivos que puedan ser utilizados como colorantes, podría ser de gran interés en la industria alimentaria como reemplazo de los colorantes sintéticos, pero además también como ingrediente funcional.

El uso del secado spray ha demostrado que mejora la estabilidad de los compuestos bioactivos y aumentan el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas de los extractos

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sometidos a esta acción (Pellicer y col., 2018). Por otra parte Michalczyk, Macura y Matuszak (2009), estudiaron el efecto de distintos métodos de secado sobre la actividad antioxidante en algunas berries y concluyeron que la liofilización es un excelente método para conservar estas propiedades en estas frutas.

Con el fin de obtener un polvo con buenas propiedades funcionales y al mismo tiempo garantizar un mayor tiempo de vida útil de estos componentes hasta su posterior aplicación, los sobrenadantes de los tres ciclos de extracción se reunieron en un único extracto y se realizaron dos tipos de secado: liofilizado y spray. Como agente matriz o carrier para estos procedimientos se utilizó maltodextrina, en diferentes concentraciones. El extracto óptimo se dividió en 3 alícuotas con el fin de adicionarles las diferentes concentraciones de matriz. Para el secado por liofilizado se trabajó con concentraciones de 10 y 20% p/p, mientras que el secado por spray se trabajó con una concentración de 20% p/p. A los tres polvos obtenidos se los caracterizó para determinar sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 10).

En los polvos obtenidos por liofilización se pueden observar menores contenidos de humedad (% b.s.) que en el polvo obtenido por secado spray. El polvo liofilizado con 10% de MD, como era de suponer, presentó los valores más altos de compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Sin embargo, el valor de T_g resultante de $25\pm 1^\circ\text{C}$ sugiere que no puede ser almacenado a temperatura ambiente debido a que existiría un alto riesgo de deterioro si la temperatura aumentara levemente por arriba de la T_g , ya que el polvo originalmente en estado vítreo podría pasar al estado sobreenfriado pudiendo sufrir cambios físicos como apelmazamiento y colapso (Roos, 2010). Los polvos (liofilizado y secado por spray) con 20% de MD dieron valores de T_g por encima de 25°C y valores de a_w bastante bajos, lo que indicaría que podrían almacenarse a temperatura ambiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Caracterización fisicoquímica de polvos de grosella negra deshidratados por liofilización (10 y 20% p/p) y por secado por spray (20% p/p).

Caracterización fisicoquímica de polvos de grosella negra	Liofilizado 10% MD	Liofilizado 20% MD	Secado Spray 20% MD
Humedad (% base seca)	2,60±0,30	2,04±0,015	3,40±0,03
Actividad de agua (a _w)	0,25±0,01	0,11±0,01	0,13±0,001
Temperatura de Transición vítrea - T _g (°C)	25±1	46±1	40±1
TPC (mg AG/ g b.s.)	13,4±0,40	8,6±0,1	8,6±0,5
AA (mg AG/ g b.s.)	5,50±0,34	4,52±0,09	4,63±0,07
TMA (mg de cyd-3-glu/g b.s.)	5,89±0,03	4,06±0,03	4,20 ±0,11
Densidad aparente (g/mL)	--	--	0,29±0,01
Densidad compactada (g/mL)	--	--	0,40±0,02
Densidad verdadera (g/mL)	--	--	1,45±0,12
IH	--	--	1,36±0,05
IC	--	--	27,5±0,1
Porosidad	--	--	80,0±0,1
Higroscopicidad (H%)	--	--	18,3±0,3
Solubilidad (%)	--	--	96,1±0,0

El valor de T_g para el polvo secado por spray fue más bajo que el obtenido por Gagneten y col. (2018), para polvo de grosella negra obtenido con las mismas condiciones de secado y matriz, con un esquema similar de extracción (3 ciclos de extracción) pero asistida por

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ultrasonido en lugar de enzimas. Sin embargo, cuando se compara el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidantes resultó que TMA fue 4 veces mayor y AA y TPC tres veces superior en los polvos respecto de este trabajo al obtenido por Gagneten y col. (2018). Lo que podría sugerir que durante la extracción enzimática hay una mayor extracción de compuestos bioactivos y podrían además extraerse o formarse otros compuestos de bajo peso molecular que influyan en la disminución del valor de la T_g . En este sentido, Koponen y col. (2008), trabajando en grosellas negras con enzimas pectinolíticas similares a las utilizadas en este trabajo, observaron hidrólisis de los glucósidos de flavonoides, aunque sin observarse pérdidas significativas de compuestos bioactivos en el resultado final. Del análisis de los polvos obtenidos se desprende que se obtuvieron polvos con muy buena concentración de compuestos bioactivos y muy buena actividad antioxidante.

De la comparación de los valores de TPC, AA, TMA y T_g entre el polvo liofilizado y secado por spray con la misma concentración de matriz se desprende que tienen similares características, aunque la T_g es un poco menor en el secado por spray debido a que este polvo posee un mayor contenido de agua. Para la aplicación del polvo en la gelatina se optó por el polvo secado por spray dado que éste a nivel industrial tiene menor costo. Por esta razón, las propiedades de flujo se analizaron únicamente en el polvo obtenido por secado spray. Los resultados obtenidos de IC e IH muestran que se obtuvo un polvo de fluidez regular y de cohesividad intermedia (Caliskan y col., 2016; Santhalakshmy y col., 2015).

La obtención de la densidad verdadera de la partícula y su relación con la densidad aparente permitió el cálculo de la porosidad del polvo obtenido. Valores altos de porosidad pueden indicar espacios libres en donde puede haber reacciones de deterioro (Santhalakshmy y col.,

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2015). Santhalakshmy y col. (2015), encontraron valores superiores a los obtenidos en este trabajo: entre 90,77 y 92,60%, en jugo de jambul (*Syzygiumcumini*) secado con maltodextrina como carrier. Tonon, Brabet y Hubinger (2010), informaron que el polvo de açai secado por aspersión producido con almidón de tapioca presentó valores de porosidad más bajos que los obtenidos con maltodextrina y goma arábica. En el caso del polvo elaborado con almidón de tapioca la porosidad fue $68,33 \pm 0,30$ % y los producidos con maltodextrina y goma arábica fueron $75,49 \pm 1,07$ y $74,70 \pm 0,72$ %, respectivamente.

El carácter higroscópico de los alimentos está relacionado con su capacidad para absorber la humedad de un ambiente. El estudio de la higroscopicidad del polvo se realizó a 75% HR ya que este nivel de humedad es frecuente en Buenos Aires. Estas condiciones fueron escogidas con el fin de estudiar el comportamiento del polvo expuesto a la atmósfera para evaluar la necesidad de envasado.

La Figura 20 grafica el aumento de peso (% p/p) en función del tiempo de almacenamiento en una atmósfera a 75% HR a 25°C. Se observó una cinética de sorción de agua con un crecimiento exponencial hasta llegar a un plató en donde se calculó el porcentaje de ganancia de peso (g H₂O/100 g de polvo) que se informó como higroscopicidad (H%) (Tabla 10). Es interesante notar que la velocidad de sorción de agua en los tiempos iniciales fue muy elevada, indicando que este tipo de polvo requiere un buen envase protector de la humedad ambiental (Figura 20, recuadro). Santhalakshmy y col. (2015), en un trabajo en donde buscaban condiciones óptimas para secado spray en jugo de jambul, encontraron valores de higroscopicidad entre 17,00 y 25,33% en un rango de temperatura de entrada para el secado spray entre 140 y 160°C. Gagnetten y col. (2018), obtuvieron valores menores de higroscopicidad para polvo de grosella negra en condiciones iguales de secado

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

spray, pero con diferencias en la extracción de jugo. La mayor proporción de compuestos de bajo peso molecular extraídos empleando la asistencia de enzimas condujo a un producto de mayor higroscopicidad.

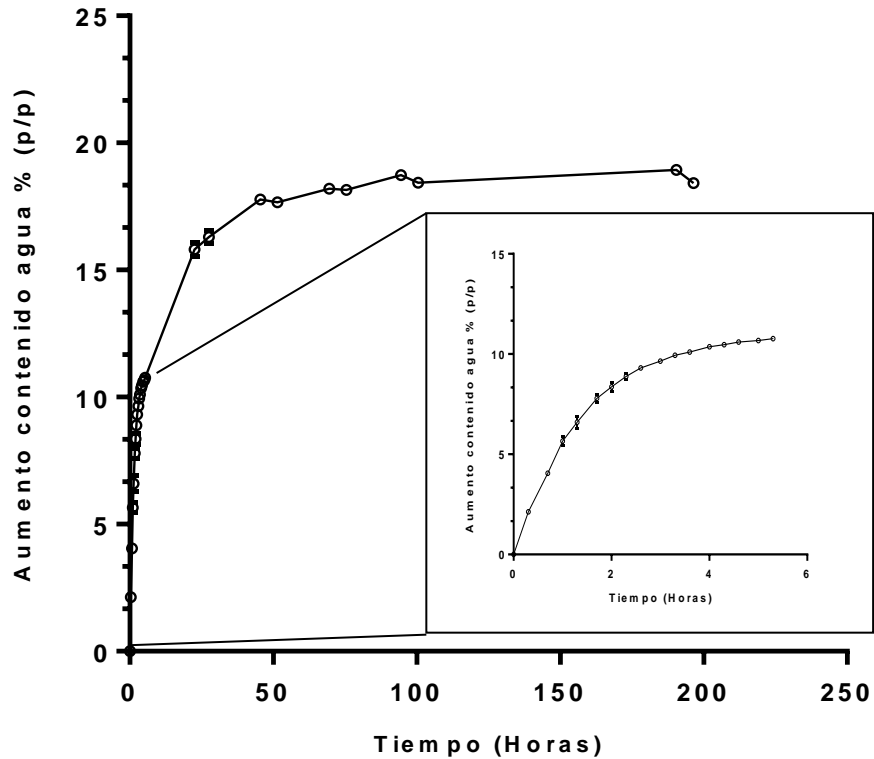


Figura 20. Cinética de adsorción de vapor de agua a 25°C a 75% HR de polvo de grosella negra obtenido por secado spray. Recuadro insertado, primeras horas de la cinética

En cuanto a la solubilidad, se obtuvo un valor elevado y comparable con datos de bibliografía para polvos similares. Santhalakshmy y col. (2015), obtuvieron valores de solubilidad % entre 87,67 y 99,67% para polvo de jambul secados por spray con maltodextrina como matriz carrier. Archaina y col. (2017), y Gagneten y col. (2018),

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

obtuvieron para polvo de grosella negra valores de solubilidad de 94,25 y 92,50%, respectivamente, ambos polvos fueron obtenidos mediante secado por spray y usando maltodextrina como carrier.

En la Figura 21 se puede observar la isoterma de sorción de agua a 20°C para los polvos de grosellas negras obtenidos por liofilización y por secado spray (20% p/p). A pesar de haber sido obtenidos por diferentes métodos de secado sólo se observaron pequeñas diferencias en el comportamiento de sorción de agua de los polvos. Gagneten y col. (2018), obtuvieron similares características de sorción de agua en polvo de jugo de grosellas negras, aunque la determinación de la isoterma de sorción de agua se realizó con otro método.

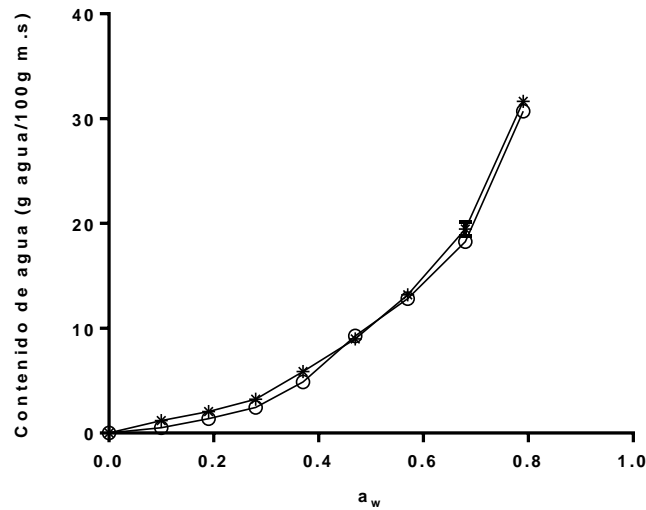


Figura 21. Isoterma de sorción de agua a 20°C para polvos de grosella negra secados por spray y

liofilizados. Secado spray * y liofilizado ⊖

4.4 Análisis de la formulación para aplicación en alimentos. Gelatina

A partir de la proporción seleccionada para la mezcla física del polvo obtenido por secado spray y de la gelatina sin sabor comercial, se procedió a elaborar la gelatina según las instrucciones del envase. La proporción de polvo de jugo de grosella negra:gelatina escogida fue 3:1, y se preparó una cantidad de producto suficiente para que alcanzara para poder evaluar en el tiempo (0 y 15 días) los compuestos bioactivos (antocianinas y polifenoles), actividad antioxidante, color superficial y ocurrencia o no de sinéresis.

4.4.1 Análisis de compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Los resultados obtenidos del análisis de compuestos bioactivos y actividad antioxidante para el tiempo 0 y la gelatina almacenada durante 15 días en heladera se pueden observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados para TMA, TPC y AA en muestras de gelatina a diferentes tiempos de almacenamiento a temperatura de refrigeración. Medias ubicadas en la misma columna con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tiempo (días)	TMA (mg cn-3-glu/g gelatina)	TPC (mg AG/ g gelatina)	AA (mg AG/ g gelatina)
0	0,20±0,02 ^a	0,56±0,03 ^a	0,16±0,02 ^a
15	0,19±0,01 ^a	0,54±0,02 ^a	0,16±0,01 ^a

Como se puede observar en la Tabla 11, del análisis de los compuestos bioactivos y actividad antioxidante no existen diferencias significativas entre el tiempo 0 y la gelatina

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

almacenada. Los valores de TMA y TPC para el control (sin agregado de polvo de jugo de grosella negra) no se informan ya que no pudieron ser detectados en dicha muestra. Cabe aclarar que para la determinación de la AA se realizó un blanco de ABTS con gelatina control.

Rubio-Arreaez y col. (2016), formularon una gelatina a partir de jugos de frutas cítricas, y evaluaron la actividad antioxidante durante el almacenamiento en refrigeración durante 15 días. Estos autores observaron que la disminución en la actividad antioxidante en las muestras almacenadas fue entre 33 y 52% respecto del tiempo inicial. La amplia diferencia observada con la disminución observada en la AA entre la gelatina elaborada con jugo y la gelatina con polvo de grosellas negras probablemente se deba a la protección que ejerce la maltodextrina sobre los compuestos bioactivos en el polvo. Ersus y Yurdagel (2007), extrajeron y microencapsularon antocianinas de zanahorias negras utilizando maltodextrina como material encapsulante. Estos autores concluyen que la estabilidad de las antocianinas podría mejorarse mediante técnicas de secado spray y en consecuencia ser adecuados para emplearse como colorantes naturales en jaleas, gelatinas y postres ya que se incrementa su vida útil. Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk (2011), utilizaron maltodextrinas como material encapsulante para jugos de grosella negra y analizaron la estabilidad del polvo en el almacenamiento a -20°C durante 9 meses. Concluyeron que la conservación de los compuestos bioactivos fue excelente y que sus resultados resultan prometedores en lo que respecta la incorporación de estos polvos como aditivos en alimentos funcionales.

Estos niveles de compuestos bioactivos que serían aportados por la gelatina a la dieta se pueden comparar con los aportados por algunas frutas de consumo habitual. En el caso de TPC la gelatina aportaría 0,563 mg de AG por g de gelatina, que es la mitad de lo que

aporta por gramo de fruta fresca una pera (1,08 mg AG/g) y un cuarto de lo que aporta una manzana (2,00 mg AG/g) (Navarro González y col., 2017). Da Silva Pinto y col. (2007), estudiaron la degradación de los compuestos fenólicos en la elaboración de mermelada de frutillas y vieron que el contenido de polifenoles en las frutillas frescas variaba entre 1,59 y 2,89 mgAG/g de fruta fresca, mientras que en las mermeladas entre 0,58 y 1,36 mg AG/g de mermelada. Se considera la porción de mermelada 6 g (una cucharada), por lo tanto el aporte por porción sería entre 3,48 y 8,16 mg AG/porción de mermelada. Se considera que la porción de gelatina es 100 g por lo que el aporte por porción sería 56,3 mg AG/porción de gelatina.

4.4.2 Análisis del color superficial

En la Tabla 12 se muestran las coordenadas cromáticas (L^* , a^* y b^*) y los valores de C^*ab y h^*ab para la gelatina formulada con polvo de jugo de grosellas antes y después de los 15 días de almacenamiento en temperatura de refrigeración. Con el fin de descartar posibles cambios de color de la gelatina, se realizó un control paralelo de gelatina sin polvo de grosella negra. Durante los 15 días de almacenamiento no se registraron cambios significativos en el control, por lo tanto se puede descartar un aporte de la gelatina a los cambios de color.

En la Tabla 12 se pueden observar pequeñas variaciones aunque significativas en L^* , a^* , b^* y C^*ab y una diferencia mayor para h^*ab .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* del espacio CIELAB y valores de C^*ab y h^*ab de la formulación de gelatina a tiempo 0 y 15 días; a 4°C. Medias ubicadas en la misma columna con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tiempo (días)	L^*	a^*	b^*	C^*ab	h^*ab
0	5,4±0,7 ^b	4,3±0,2 ^a	-1,6±0,4 ^a	4,63±0,02 ^a	339±5 ^b
15	3,4±0,3 ^a	5,2±0,3 ^a	0,8±0,1 ^b	5,2±0,3 ^a	8±2 ^a

Del análisis de la variación de los parámetros se puede observar que el parámetro L^* disminuyó levemente ($\Delta L = 2,00$) lo que significa que la muestra se oscureció. Del cálculo del ΔC^*ab (-0,57) se desprende un ligero aumento de la intensidad del color, ya que cambia desde el centro hacia la periferia del círculo cromático. Con respecto al cambio observado en el ángulo de tono ($\Delta h^*ab = |29|$), se ve influenciado por el cambio en el parámetro b^* desde un valor en el cuadrante correspondiente al color azul a un valor en cuadrante del color amarillo (Figura 22).

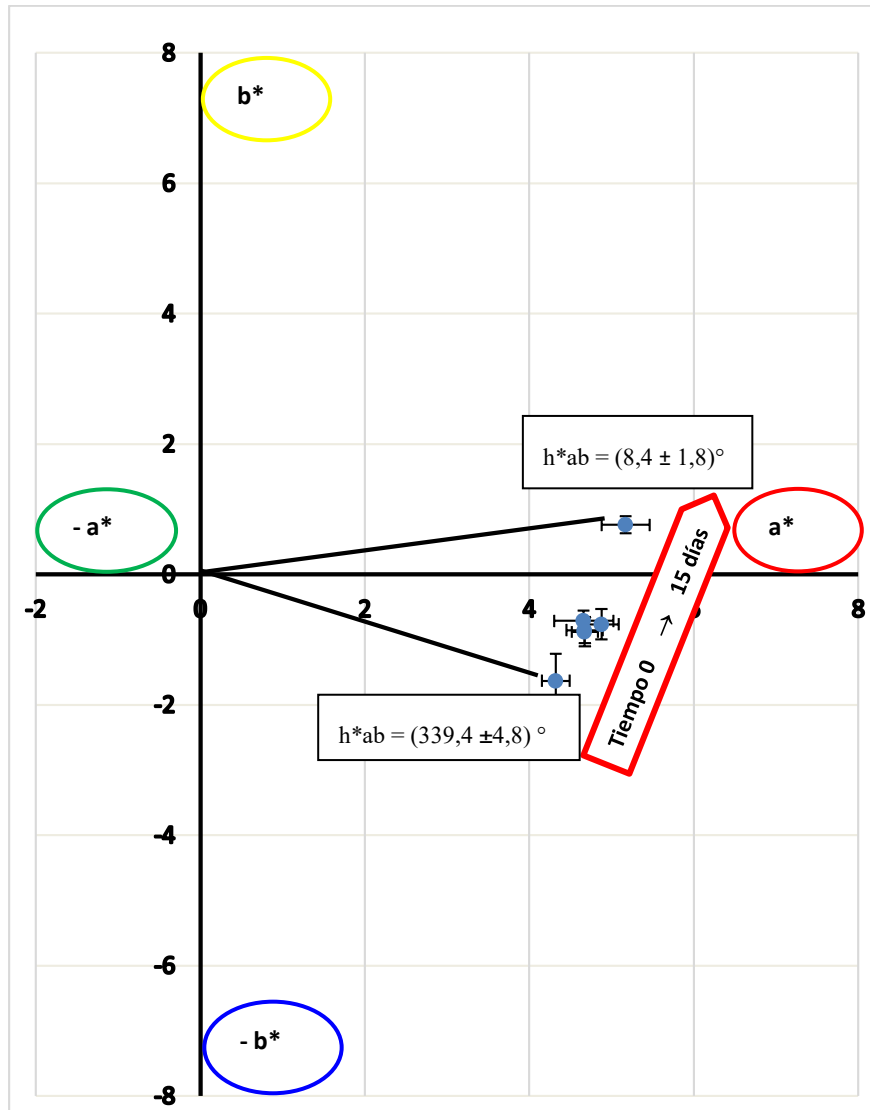


Figura 22. b^* en función de a^* para la gelatina almacenada en temperatura de refrigeración.

*Evolución de h^*_{ab} con el almacenamiento.*

Esta variación indica el aumento del componente amarillo durante el almacenamiento en refrigeración de la gelatina. De la comparación con los resultados obtenidos de compuestos bioactivos durante el almacenamiento en refrigeración para la gelatina elaborada con polvo de jugo de grosella negra, se destaca el cambio de color a pesar de que no hubo variación

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

significativa del contenido de antocianinas. La variación del ángulo de tono debido al aumento del componente amarillo, sugiere un leve pardeamiento del producto almacenado.

La fórmula de CIEDE2000 para el cálculo de la diferencia global de color (ΔE^*_{00}) se recomienda especialmente para los casos en que L^* es similar y hay un cambio significativo de h^*_{ab} , como es el caso que estamos analizando. Por lo tanto, se calculó el ΔE^*_{00} durante los 15 días de almacenamiento a 4°C y los resultados se pueden observar en la Figura 23. Se observa que el valor sufre un cambio al comienzo del almacenamiento, luego se mantiene sin variar hasta el día 12 de almacenamiento y luego vuelve a cambiar.

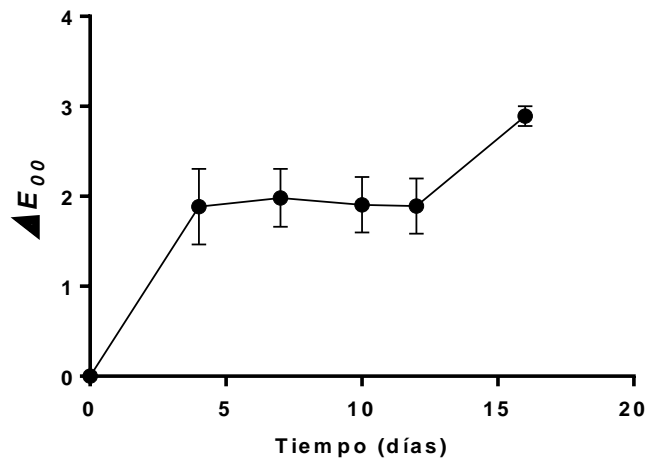


Figura 23. Valores de ΔE^*_{00} durante el almacenamiento de la gelatina a 4°C.

Estos valores de ΔE^*_{00} se pueden comparar en la Tabla 13 (Keraitè, Sivakova y Kiuberis, 2017), que es utilizada para diversos fines industriales y que puede servir de guía para correlacionar la medida instrumental del color con la percepción del ojo humano. Según los valores obtenidos para la gelatina durante el almacenamiento, hasta el día 12 la diferencia de color sería solamente perceptible por observación cercana y luego, al final del almacenamiento sería perceptible a simple vista. Paralelamente a las mediciones de color,

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

se realizó una apreciación visual de las muestras por comparación (que se llevó a cabo con un panel interno en el laboratorio, colocando las muestras sobre fondo blanco y con la misma iluminación). Durante todas esas observaciones a lo largo del almacenamiento no se apreció cambio alguno, a pesar de los resultados obtenidos de las mediciones de los parámetros de color con el fotocolorímetro.

Tabla 13. Valores de ΔE_{00} en escala de percepción

ΔE_{00}	Percepción
≤ 1.0	No perceptible por los ojos humanos.
1 - 2	Perceptible por observación cercana.
2 - 10	Perceptible a simple vista.
11 - 49	Los colores son más similares que opuestos.
100	Los colores son opuestos.

4.4.3 Evaluación de sinéresis

La capacidad de retención de agua de un gel es una medida de la cantidad del líquido que puede quedar atrapado en su red. La sinéresis, que se produce a partir de una contracción espontánea de un gel ocurre mediante la exudación del solvente (comúnmente agua). Es uno de los problemas que se presenta frecuentemente en la elaboración de postres tipo gelatina, y es determinante en la aceptación o rechazo del producto por parte del consumidor. La sinéresis se puede medir mediante el volumen de agua que se expulsa espontáneamente hacia el exterior del gel y se puede informar como un porcentaje respecto de la masa total de gelatina.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó la aparición o no de la sinéresis y su magnitud en la gelatina al término del periodo de 15 días en refrigeración, comparándose con una gelatina control elaborada sin polvo de jugo de grosellas negras. Con el fin de evaluar la influencia del pH y de la matriz, se elaboraron dos controles sin polvo de grosella negra: uno llevando el pH al mismo valor que el de la gelatina con polvo de jugo de grosella negra y el otro reemplazando el polvo de la formulación por maltodextrina.

Se observó que la gelatina que había sido formulada con polvo de jugo de grosella negra no presentaba sinéresis al final del periodo de almacenamiento en refrigeración, mientras que en la muestra de gelatina control se observó un porcentaje de sinéresis de un $12\pm 3\%$ (Figura 24).

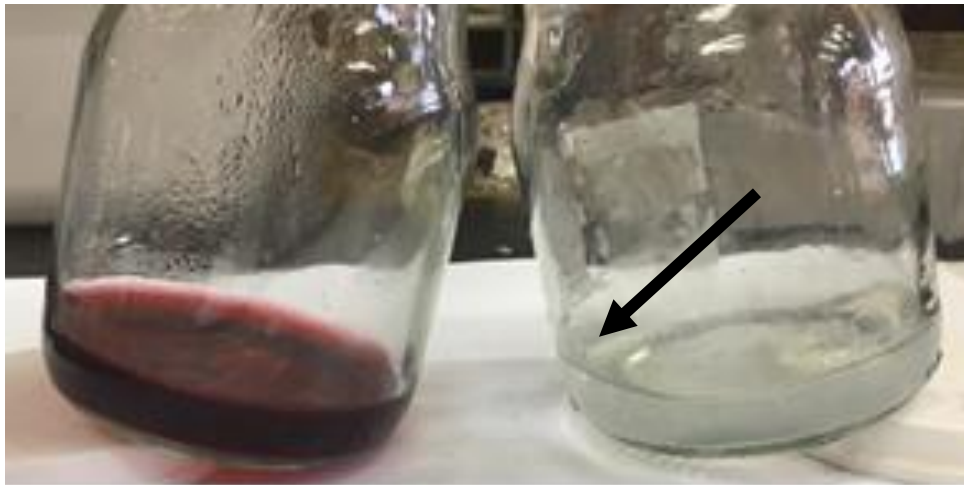


Figura 24. Formación de sinéresis. Formulación de gelatina y control de gelatina.

Se determinó el pH de la gelatina control sin polvo y el de la gelatina con polvo de jugo de grosella negra y fueron: $5,65\pm 0,03$ y $3,67\pm 0,01$, respectivamente. Con el fin de analizar la influencia del pH sobre la retención de agua en la gelatina, se elaboró una gelatina a pH

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3,67 ±0,01 para el control de la influencia de pH. Se observó que durante los 15 días de almacenamiento en refrigeración el control de pH no presentó una sinéresis significativa. El pH tiene una influencia importante en la retención de agua en la gelatina, ya que la contracción del gel depende de la microestructura del mismo, la cual está estrechamente influenciada por el pH de la solución de la cual se partió para su formación (Scherer, 1989). La formación y estabilidad de los geles se controlan por pH, siendo la acidez un determinante de sus propiedades reológicas; la mayoría de las berries tienen una acidez sumamente elevada por lo que son muy apropiadas para este tipo de productos (Zhao, 2007).

Con respecto al control de gelatina con maltodextrina, no se observa un porcentaje significativo de sinéresis en los 15 días de refrigeración. La presencia de maltodextrina podría estar contribuyendo en la formulación de la gelatina a disminuir la magnitud de la sinéresis durante el almacenamiento. Mahdavi, Jafari, Assadpour y Ghorbani (2016), formularon una gelatina con polvo de jugo de agracejo (*Berberis vulgaris*) por secado spray utilizando diferentes matrices carriers y encontraron que independientemente de la matriz empleada (entre las cuales se encontraba la maltodextrina), la sinéresis disminuía con respecto al control sin polvo de frutas en el almacenamiento durante 30 días a 25°C.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se recalca el aprovechamiento de una fruta de la Patagonia argentina poco utilizada debido a su elevada acidez y su alta perecebilidad, pero de gran potencial en cuanto a sus propiedades funcionales como es la grosella negra.

Adicionalmente, se destaca el empleo de la técnica de extracción asistida con enzimas, que si bien es un método tradicional, permite mejorar notablemente el aprovechamiento de los compuestos valiosos de la fruta con un costo reducido y adecuado para pequeñas industrias. La maceración con enzimas pectinolíticas no solamente favoreció el rendimiento de la extracción de jugo, sino que principalmente aumentó la extracción de compuestos bioactivos de grosella negra. Por otra parte, el empleo de extracciones sucesivas permitió incrementar el aprovechamiento de los principios activos como antioxidantes de la grosella negra.

La obtención de un colorante natural con base a las antocianinas de las grosellas negras resulta una alternativa muy interesante para el reemplazo de colorantes artificiales, actualmente cuestionados por los consumidores cada vez más conscientes del consumo de productos naturales. En este sentido, se obtuvo un polvo con buenas propiedades físicas con 20% de MD, por dos métodos de secado: liofilización y secado spray.

Los postres de gelatina usualmente están coloreados con colorantes artificiales y no ofrecen un aporte significativo de compuestos bioactivos. En este trabajo se elaboró una gelatina enriquecida con compuestos valiosos como polifenoles y antocianinas de la grosella negra. Adicionalmente, el agregado del polvo de grosella negra aportó un color muy agradable a la gelatina y contribuyó a obtener un producto estable durante 15 días de almacenamiento en refrigeración, evitando la sinéresis.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFIA

- Anttonen, M. J. y 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). Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemist.
- Archaina, D., Leiva, G., Salvatori, D. y 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.
- Baiano, A. y Del Nobile, M. A. (2016). Antioxidant compounds from vegetable matrices: Biosynthesis, occurrence, and extraction systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12), 2053-2068.
- Balogh, E., Hegedűs, A. y Stefanovits-Bányai, É. (2010). Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 332-336.
- Bakowska-Barczak, A. M. y Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1301-1309.
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z. y Oszmiański, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81(3), 349-355.
- BeMiller, J.N. y Whistler, R.L. (1996). Carbohydrates. En *Fennema's Food Chemistry*, Third Edition. Editado Owen Fennema, University of Winsconsin, Estados Unidos. Pp 17-94.

- Bender, C., Killermann, K. V., Rehmann, D. y Weidlich, H. H. (2017). Effect of mash enzyme and heat treatments on the cellular antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum*), raspberry (*Rubus idaeus*), and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juices. *CyTA-Journal of Food*, 15(2), 277-283.
- Bennamoun, L. y Li, J. (2018). Drying process of food: Fundamental aspects and mathematical modeling. En *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes* (pp. 29-82).
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines: a critical review. *American Journal of Viticulture and Enology*, 52(2): 67 – 87.
- Brouillard, R. y Dangle, O. (1994). Anthocyanins molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*, 51(4): 365 – 371.
- Brownmiller, C., Howard, L. y Prior, R. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73, H72–H79.
- Buchert, J., Koponen, J. M., Suutarinen, M., Mustranta, A., Lille, M., Törrönen, R. y Poutanen, K. (2005). Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2548-2556.
- Büchi, (2018). B-290 Mini Spray Dryer Operation Manual. https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/B-290_OM_en_I_0.pdf?cf595fc09d939d0eb8f2bee907c35bca8feeee47

- Caliskan, G. y 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.
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M. y Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 420-428.
- Cassidy, A. (2018). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 76-82.
- Chang, S. K., Alasalvar, C. y Shahidi, F. (2016). Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 21, 113-132.
- Chung, R., & Chen, P. H. (2011). Determining CIEDE2000 for Printing Conformance. En Iarigai Research Conference, Budapest, Hungría.
<https://artdesign.rit.edu/media/uploads/faculty-projects/709/documents/64/determining-ciede2000-for-printing-conformance.pdf>
- COFECYT: www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pcias_pdfs/.../UIA_frutas_finas_08.pdf
- Contessa, C., Mellano, M. G., Beccaro, G. L., Giusiano, A. y Botta, R. (2013). Total antioxidant capacity and total phenolic and anthocyanin contents in fruit species grown in Northwest Italy. *Scientia Horticulturae*, 160, 351-357.
- Coria Cayupán, Y. S. C., Ochoa, M. J. y 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.

- Cosme, F., Gonçalves, B., Bacelar, E. A., Inês, A., Jordão, A. M. y Vilela, A. (2017). Genotype, environment and management practices on red/dark-colored fruits phenolic composition and its impact on sensory attributes and potential health benefits. *In Phenolic Compounds-Natural Sources, Importance and Applications*. InTech.
- Da Silva Pinto, M., Lajolo, F.M. y Genovese, M.I. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacity of strawberry jams. *Plant Foods for Human Nutrition* 62:127–131.
- Dal Magro, L., Goetze, D., Ribeiro, C. T., Paludo, N., Rodrigues, E., Hertz, P. F., Poletto, M. y Rodrigues, R. C. (2016). Identification of bioactive compounds from *Vitislabrusca* L. variety concord grape juice treated with commercial enzymes: improved yield and quality parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 9(2), 365-377.
- Djordjević, B., Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Vulić, T., Pljevljakušić, D. y Oparnica, Č. (2013). Biochemical properties of the fresh and frozen black currants and juices. *Journal of Medicinal Food*, 16(1), 73-81.
- Durst, R. W. y Wrolstad, R. E. (2001). Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. En: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R.E., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner,
- Ersus, S. y Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 805-812.
- Franceschinis, L., Salvatori, D. M., Sosa, N. y 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 con base a cerezas y zarzamoras de la Patagonia argentina (tesis de

- doctorado). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Fredes, C. (2009). Antioxidantes en berries nativos chilenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6).
 - Gagneten, M., Corfield, R., Mattson, M. G., Sozzi, A., Leiva, G., Salvatori, D. y Schebor, C. (2018). Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. *Powder Technology* 342, 1008-1015.
 - Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
 - Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
 - Ghinea, R., Pérez, M. M., Herrera, L. J., Rivas, M. J., Yebra, A. y Paravina, R. D. (2010). Color difference thresholds in dental ceramics. *Journal of Dentistry*, 38, e57-e64.
 - Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. y Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.
 - Giusti, M. M., y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. En: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R.E., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner,

- Giusti, M. M. y Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217-225.
- Gopalan, A., Reuben, S. C., Ahmed, S., Darvesh, A. S., Hohmann, J. y Bishayee, A. (2012). The health benefits of blackcurrants. *Food & Function*, 3(8), 795-809.
- Hutchings, B. (1994). *Food Color and Appearance*, Blackie Academic & Professional.
- Informe INTA (2017): <https://inta.gov.ar/noticias/situacion-de-las-frutas-finis-berries-en-diferentes-regiones-argentinas>.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A. y Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as food colorants—a review. *Journal of Food Biochemistry*, 11(3), 201-247.
- Joseleau, J. P., y Pérez, S. (2016). *The Plant Cell Walls: Complex Polysaccharide Nano-Composites*. <http://www.glycopedia.eu/e-chapters/the-plant-cell-walls/article>
- Joshi, P. y Brimelow, C. J. B. (2002). Colour measurement of foods by colour reflectance. En *Colour in Food* (pp. 80-114).
- Karel, M. y Lund, D.B. (2003). Dehydration. En: *Physical Principles of Food Preservation*. Parte II, Capítulo 10. Segunda edición. Marcus Karel, Owen R. Fennema, and Daryl B. Lund, (Marcel Dekker, Inc.) Ed.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S. y Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215–227.
- Keraitè, G., Sivakova, B. y Kiuberis, J. (2017). Investigation of the impact of organic and inorganic halides on the ageing stability of paper with iron gall ink. *Chemija*, 28(3), 137-147.

- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T. y Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779.
- Kobylewski, S. y Jacobson, M. F. (2010). *Food Dyes, A rainbow of risks*. Washington: Center for Science in the Public Interest.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Auriola, S., Kontkanen, H., Buchert, J., Poutanen, K. S. y Törrönen, A. R. (2008). Characterization and fate of black currant and bilberry flavonols in enzyme-aided processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3136-3144.
- Krüger, E., Dietrich, H., Hey, M. y Patz, C. D. (2012). Effects of cultivar, yield, berry weight, temperature and ripening stage on bioactive compounds of black currants. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84(1), 40.
- Lee, S. G., Vance, T. M., Nam, T. G., Kim, D. O., Koo, S. I. y Chun, O. K. (2015). Contribution of anthocyanin composition to total antioxidant capacity of berries. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 427-432.
- Luo, M. R., Cui, G. y Rigg, B. (2001), The development of the CIE 2000 colour - difference formula: CIEDE2000. *Color Research and Application*, 26: 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.*

- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpour, E. y Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpour, E. y Ghorbani, M. (2016). Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. *Journal of Food Engineering*, 181, 59-66.
- Marquez, A., Serratosa, M. P. y Merida, J. (2014). Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chemistry*, 146, 507–514.
- Martín, J., Navas, M. J., Jiménez-Moreno, A. M. y Asuero, A. G. (2017). Anthocyanin pigments: Importance, sample preparation and extraction. In *Phenolic Compounds-Natural Sources, Importance and Applications*. InTech.
- McAvoy, S. A. (2014). Global regulations of food colors. *The Manufacturing Confectioner*, 94(9).
- McDougall, G. J. (2017). Phenolic-enriched foods: Sources and processing for enhanced health benefits. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(2), 163-171.
- Michalczyk, M., Macura, R. y Matuszak, I. (2009). The effect of air-drying, freeze-drying and storage on the quality and antioxidant activity of some selected berries. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(1), 11-21.
- Michalska, A., Wojdyło, A., Lech, K., Łysiak, G. P. y Figiel, A. (2016). Physicochemical properties of whole fruit plum powders obtained using different drying technologies. *Food Chemistry*, 207, 223–232.

- Mieszczakowska-Frać, M., Markowski, J., Zbrzeźniak, M. y Płocharski, W. (2012). Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 251-256.
- Mikulic-Petkovsek, M., Rescic, J., Schmitzer, V., Stampar, F., Slatnar, A., Koron, D. y Veberic, R. (2015). Changes in fruit quality parameters of four Ribes species during ripening. *Food Chemistry*, 173, 363-374.
- Mitcham, E. (2007). Quality of berries associated with preharvest and postharvest conditions. En: *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*. Zhao, Y. (Ed.) Boca Raton: CRC Press.
- Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B. y Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 519-525.
- Naczki, M. y Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Navarro González, I., Periago, M.J. y 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. y Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.
- Nielsen, I. L. F., Haren, G. R., Magnussen, E. L., Dragsted, L. O. y Rasmussen, S. E. (2003). Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple

- high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5861-5866.
- Novozymes, (2013). Enzymes at work. https://www.novozymes.com/-/.../Enzymes_at_work.pdf.
 - Pagán, J. (2014). Utilization of Enzymes in Fruit Juice Production. En *Juice Processing* (pp. 170-189). CRC Press.
 - Papillo, V. A., Locatelli, M., Travaglia, F., Bordiga, M., Garino, C., Arlorio, M. y Coisson, J. D. (2018). Spray-dried polyphenolic extract from Italian black rice (*Oryza sativa* L., var. Artemide) as new ingredient for bakery products. *Food Chemistry*, 269, 603-609.
 - Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M. y Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 299-308.
 - Parzanese, M. (2008). Tecnología para la industria alimentaria: Liofilización de alimentos (No. H2720). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires (Argentina).
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf
 - Pellicer, J. A., Fortea, M. I., Trabal, J., Rodríguez-López, M. I., Carazo-Díaz, C., Gabaldón, J. A. y Núñez-Delicado, E. (2018). Optimization of the microencapsulation of synthetic strawberry flavour with different blends of encapsulating agents using spray drying. *Powder Technology*, 338, 591-598.

- Petrova, K., Petrova, T., Ivanova, P., Ruskova, M., Bakalov, I., Mihalev, K. y Penov, N. (2017). Optimizing enzymatic maceration of blackcurrant mash by response surface methodology. *Modern Agricultural Science and Technology, Volume 3*, No. 1-2, pp. 48-53
- Ramšak, M., Ravnik, J., Zadavec, M., Hriberšek, M. y Iljaž, J. (2017). Freeze-drying modeling of vial using BEM. *Engineering Analysis with Boundary Elements*, 77, 145-156.
- Raudsepp, P., Kaldmäe, H., Kikas, A., Libek, A. V. y Püssa, T. (2010). Nutritional quality of berries and bioactive compounds in the leaves of black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars evaluated in Estonia. *Journal of Berry Research*, 1(1), 53-59.
- Rodriguez - Saona, L., Giusti, M. y Wrolstad, R. (1999). Color and pigment stability of red radish and red - fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science*, 64, 451-456.
- Roos, Y. H. (2010). Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 469-496.
- Rubinskiene, M., Viskelis, P., Jasutiene, I., Viskeliene, R. y Bobinas, C. (2005). Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International*, 38(8-9), 867-871.
- Rubio-Arreaez, S., Capella, J. V., Castelló, M. L. y Ortolá, M. D. (2016). Physicochemical characteristics of citrus jelly with non-cariogenic and functional sweeteners. *Journal of Food Science and Technology*, 53(10), 3642-3650.

- Santhalakshmy, S., Bosco, S. J. D., Francis, S. y 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. y 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: 1908–1914.
- Scheffeldt, P. y Hrazdina, G. (1978). Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *Journal of Food Science*, 43: 517-520.
- Scherer, G. W. (1989). Mechanics of syneresis I. Theory. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 108(1), 18-27.
- Ścibisz, I., Ziarno, M., Mitek, M. y Zaręba, D. (2012). Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanins in blueberry yoghurts. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 208-212.
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R. y Duarte, C. M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125(2), 318-325.
- Singleton, V. y Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Slimestad, R. y Solheim, H. (2002). Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3228-3231.

- Swaminathan, S., Sowriappan, J.D.B., Sneha, F. y Mallela, S. (2015). Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder, *Powder Technology*, 274 (2015) 37–43.
- Tapre, A. R. y Jain, R. K. (2014). Pectinases: enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, 21(2), 447–453.
- Teleszko, M. y Wojdyło, A. (2015). Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *Journal of Functional Foods*, 14, 736-746.
- Tonon, R. V., Brabet, C. y Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpeoleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907-914.
- Vagiri, M., Ekholm, A., Öberg, E., Johansson, E., Andersson, S. C. y 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-Mercado, H., Góngora-Nieto, M. M. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2001). Advances in dehydration of foods. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 271-289.
- Wilkes, K., Howard, L. R., Brownmiller, C. y Prior, R. L. (2014). Changes in chokeberry (*Aroniamelanocarpa* L.) polyphenols during juice processing and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4018–4025.
- Wrolstad, R. E. (1993). Color and pigment analyses in fruit products. Corvallis, Oregon Agricultural Experiment Station. Oregon State University. Agricultural Experiment Station. Station Bulletin 624.

- Zhao, Y. (2007). Berry fruit: value-added products for health promotion. CRC press.
- Zamora, F. (2003). El color del vino tinto. En: AMV Ediciones and Mundi-Prensa. Elaboración y crianza del vino: Aspectos científicos y prácticos. Madrid, España, 13 – 46.
- Zheng, J., Yang, B., Ruusunen, V., Laaksonen, O., Tahvonen, R., Hellsten, J. y Kallio, H. (2012). Compositional differences of phenolic compounds between black currant (*Ribes nigrum L.*) cultivars and their response to latitude and weather conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(26), 6581-6593.