



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Láminas de manzana y acáchul reducidas en calorías y suplementadas con un ingrediente de proteínas lácteas y ácido fólico: vehículo alternativo de vitamina B9 orientado a poblaciones con regímenes especiales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Industrial

Lic. Rocío Corfield

Directora de tesis: Dra. Carolina Schebor.

Co-directora: Dra. Daniela Salvatori

Consejera de estudios: Dra. Florencia Mazzobre

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

Ciudad de Buenos Aires, 2021

Láminas de manzana y acáchul reducidas en calorías y suplementadas con un ingrediente de proteínas lácteas y ácido fólico: vehículo alternativo de vitamina B9 orientado a poblaciones con regímenes especiales

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una golosina suplementada con vitamina B9 (ácido fólico). Para ello, en la primera etapa, se desarrolló una golosina en forma de lámina, constituida por una mezcla deshidratada de manzana Granny Smith, polvo de acáchul (*Ardisia compressa* Kunth), jarabe de maltitol y estevia. Estas láminas resultaron ricas en fibra, bajas en calorías y presentaron alta concentración de compuestos antioxidantes con elevada bioaccesibilidad. Adicionalmente, los estudios sensoriales mostraron que este producto podría ser aceptado satisfactoriamente por los consumidores. En una segunda etapa, se desarrollaron dos ingredientes: 1) β lg-AF, a base de ácido fólico (AF) y β -lactoglobulina (β lg), y 2) WPI-AF, conformado por un aislado de proteína de suero (WPI) y AF. Estos ingredientes se caracterizaron contemplando un régimen diluido y otro concentrado y deshidratado. En el régimen diluido se observó mayor biodisponibilidad de la vitamina, para el sistema WPI-AF comparando con β lg-AF y AF libre. En cuanto al régimen concentrado, los estudios realizados brindaron información sobre las interacciones entre las proteínas y el AF. Finalmente, en la tercera etapa, se suplementó la golosina formulada en la primera etapa con el ingrediente WPI-AF concentrado desarrollado en la segunda etapa. Se estudió la bioaccesibilidad de la vitamina en las láminas con WPI-AF y en láminas control con AF libre. Las láminas conteniendo WPI-AF conservaron un 50% de AF luego del secado y la digestión *in vitro* de la golosina, siendo los valores más elevados de bioaccesibilidad de AF obtenidos. Este estudio ofrece una alternativa para vehicular la vitamina B9 a través de un alimento novedoso y mediante un ingrediente que protege al AF. Estas golosinas resultan una opción interesante y saludable para poblaciones con regímenes especiales, como las que siguen dietas hipocalóricas o personas gestantes en el caso de las adicionadas con el ingrediente formulado.

Palabras clave: Láminas de fruta, compuestos bioactivos, vitamina B9, proteínas lácteas, bioaccesibilidad.

Apple and acáchul leathers reduced in calories and supplemented with an ingredient composed of dairy proteins and folic acid: alternative vitamin B9 vehicle aimed at populations with special diets

SUMMARY

The objective of this work was to develop a sweet snack supplemented with vitamin B9 (folic acid). For this purpose, in the first stage, a sheet-shaped snack was developed, consisting of a dehydrated mixture of Granny Smith apple, acáchul (*Ardisia compressa* Kunth) powder, maltitol syrup, and stevia. These fruit-leathers were rich in fiber, low in calories and provided a high concentration of antioxidant compounds with high bioaccessibility. Furthermore, sensory studies showed that this product could be satisfactorily accepted by consumers. In a second stage, two ingredients were developed: 1) β lg-AF, based on folic acid (AF) and β -lactoglobulin (β lg), and 2) WPI-AF, made up of a whey protein isolate (WPI) and AF. These ingredients were characterized in a diluted regime and a concentrated and dehydrated regime. In the diluted regime, greater bioavailability of the vitamin was obtained for the WPI-AF system compared to β lg-AF and free AF. Regarding the concentrated regime, the carried-out studies provided information on the interactions between proteins and FA. Finally, in the third stage, the leather formulated in the first stage was supplemented with the concentrated WPI-AF ingredient developed in the second stage. The bioaccessibility of the vitamin was studied in the WPI-AF leathers and in control samples containing free AF. The leathers containing WPI-AF ingredient conserved 50% of AF after drying and *in vitro* digestion, being the highest values of bioaccessibility of AF obtained. This study offers an alternative to transport vitamin B9 through a novel food and by means of an ingredient that protects FA. These sweet snacks are an interesting and healthy option for populations with special diets, such as those who follow low-calorie diets, or pregnant people in the case of those added with the formulated ingredient.

Keywords: fruit leathers, bioactive compounds, vitamin B9, whey protein, bioaccessibility.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a cada una de las personas que hicieron esto posible.

A mi directora, la Dra. Carolina Schebor, por guiarme en este arduo camino, por depositar su confianza en mí, por su paciencia, su apoyo, su generosidad y sobre todo por contagiarme su pasión por la investigación.

A mi codirectora, la Dra. Daniela Salvatori, por su acompañamiento y sus valiosos aportes científicos.

Al Dr. Oscar Pérez, por integrarme a su grupo de investigación, por compartir sus conocimientos y sus instalaciones, por depositar su confianza en mí y por toda la ayuda que me brindó durante todo este recorrido. Además, agradecer a todos los y las integrantes del Laboratorio Interdisciplinario de Dinámica celular y Nanoherramientas, por sus contribuciones en mi trabajo.

A la Dra. Mariana Allievi y a la Dra. Karina Martínez, por su buena predisposición, sus ganas de investigar, sus múltiples y valiosos aportes que hicieron a este trabajo y por todo el cariño que me brindaron durante este tiempo.

A la Dra. Pilar Buera por la formación brindada y por permitirme ser parte del equipo del Laboratorio de Propiedades y Conservación de Biomoléculas. También quiero agradecer a Florencia, Patricio, Cristina, Graciela y Verónica por su compañerismo y colaboración en el trabajo diario.

A la Dra. Natalia Sosa, por su amistad, su entusiasmo por la ciencia y por su ayuda invaluable en este recorrido. También agradezco a los integrantes del laboratorio de Dymacrer (UNER): Diego, Roy y Tamara por su compañerismo y por la ayuda que me brindaron.

A las instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis. A CONICET por el otorgamiento de la beca, al Departamento de Industrias, el Departamento de Química Orgánica, el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos por aportar sus instalaciones para la ejecución de las diferentes tareas de investigación.

A los amigos y compañeros de este recorrido, por las risas, la amistad, los consejos, las aventuras, las comidas compartidas, la contención y el apoyo: Tati, Maite, Guido, Gastón, Silvio, Agustina y Milagros, Edward, Carlitos, Pablo, Gabriela, Alondra, Jhon y Nacho.

A las amigas de la vida Aye, Fer, Dai y Tere por estar siempre acompañando.

A Paula y Jime, por su paciencia, su ayuda y su amistad en este hermoso recorrido.

A Marta, por su invaluable ayuda durante este trayecto.

A Pedro y Gladis, por su cariño diario.

A mis padres, hermanos y hermanas, sobrinos y sobrinas, por su amor y su apoyo en este recorrido y en la vida.

A Andrés, por su amor diario, por motivarme todos los días a seguir y por hacer mi vida más fácil.

¡Muchas Gracias!

*A mi compañero de vida, Andrés
y a nuestro pequeño Olivo.*

Mi familia.

Índice

1. Introducción	2
1.1 Organización de la tesis	2
1.2 Introducción Sección I: Desarrollo de láminas de frutas	3
1.2.1 Necesidades de una alimentación saludable y desafíos en la industria de las golosinas	3
1.2.2 Alimentos funcionales	5
1.2.3 Láminas de fruta	8
1.2.4 Materias primas	12
1.2.4.1 Fruto de <i>Ardisia compressa</i> Kunth “Acáchul”	12
1.2.4.2 Manzana	15
1.2.4.3 Edulcorantes: Maltitol y Estevia	17
1.2.5 Compuestos bioactivos	21
1.2.5.1 Antocianinas	24
1.2.5.2 Metodologías para determinar la Capacidad antioxidante	28
1.2.6 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos	30
1.2.7 Estudios sensoriales	34
1.2.7.1 Análisis sensorial cualitativo	35
1.2.7.2 Análisis cuantitativo	37
1.3 Introducción sección II: Desarrollo de un ingrediente funcional a base de ácido fólico y proteínas lácteas	40
1.3.1 Vitaminas	40
1.3.1.1 Generalidades	40
1.3.1.2 Clasificación	41
1.3.1.3 Requerimientos diarios	42
1.3.2 Vitamina B9: Folatos naturales y ácido fólico	44

1.3.2.1 Generalidades	44
1.3.2.2 Características fisicoquímicas	46
1.3.2.3 Estabilidad	49
1.3.2.4 Acceso del ácido fólico al organismo	53
1.3.2.5 Reacciones metabólicas del ácido fólico	54
1.3.2.6 Déficit de ácido fólico	55
1.3.2.7 Marco legal e Ingesta Diaria Recomendada (IDR)	56
1.3.3 Proteínas del suero lácteo	57
2. Objetivos	62
2.1 Objetivo general.....	62
2.2 Objetivos específicos.....	62
3. Materiales y Métodos.....	65
3.1 Sección I: Láminas de fruta	65
3.1.1 Materiales	65
3.1.2 Desarrollo de láminas de frutas	67
3.1.3 Análisis fisicoquímico de los materiales	68
3.1.3.1 Contenido de agua	69
3.1.3.2 Sólidos solubles, acidez total y pH.....	69
3.1.3.3 Determinación de color superficial.....	70
3.1.3.4 Actividad de agua (a_w).....	70
3.1.3.5 Temperatura de transición vítrea (T_g).....	71
3.1.3.6 Isotermas de sorción de agua a 25 °C.....	71
3.1.4 Caracterización del potencial bioactivo de los materiales.....	72
3.1.4.1 Contenido de compuestos fenólicos totales (CPT).....	73

3.1.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante (CA).....	73
3.1.4.2.1 Método de decoloración del radical (ABTS ^{•+}).....	73
3.1.4.2.2 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).....	74
3.1.4.3 Contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT)	74
3.1.5 Composición centesimal de las láminas de fruta	75
3.1.5.1 Proteínas	75
3.1.5.2 Fibra total.....	76
3.1.5.3 Contenido de grasa	76
3.1.5.4 Cenizas.....	76
3.1.6 Análisis fisicoquímico de las láminas de fruta	76
3.1.6.1 Contenido y actividad de agua.....	76
3.1.6.2 Determinación de color superficial.....	77
3.1.6.3 Análisis de textura	78
3.1.7 Caracterización del potencial bioactivo de las láminas de fruta.....	79
3.1.8 Digestión <i>in vitro</i> y evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos potencialmente bioactivos.	79
3.1.9 Análisis sensorial de las láminas de fruta	81
3.1.9.1 Análisis cualitativo: Prueba de asociación de palabras	81
3.1.9.2 Análisis sensorial cuantitativo	82
3.1.9.2.1 Evaluación del grado de satisfacción	83
3.1.9.2.2 Evaluación de la intensidad de cada atributo	83
3.1.10 Estudios de estabilidad	83
3.2 Sección II: Ingrediente de proteínas lácteas-ácido fólico	85
3.2.1 Materiales	85
3.2.2 Síntesis de los ingredientes proteína-vitamina B9.....	85
3.2.3 Caracterización de las interacciones proteína-vitamina B9.....	89
3.2.3.1 Análisis FT-IR	89
3.2.3.2 Potencial ζ	89

3.2.4 Caracterización del tamaño de partícula en nano y microescalas.....	90
3.2.4.1 Distribución del tamaño de partícula.....	90
3.2.4.2 Análisis de microscopía confocal de fluorescencia.....	91
3.2.5 Caracterización de la formación de los complejos	92
3.2.5.1 Cinética de agregación proteica.....	92
3.2.6 Caracterización potencialmente funcional de los complejos.....	92
3.2.6.1 Método de decoloración del radical (ABTS ⁺)	92
3.2.6.2 Digestión <i>in vitro</i> y biodisponibilidad de la vitamina B9.....	93
3.2.6.2.1 <i>Evaluación de la biodisponibilidad del AF</i>	94
3.2.7 Evaluación de la estabilidad física del ingrediente.....	96
3.2.7.1 Temperatura de Transición vítrea.....	96
3.2.7.2 Determinación del contenido de agua	96
3.3 Sección III: Lámina de fruta + ingrediente de proteínas lácteas-ácido fólico.....	97
3.3.1 Desarrollo de las láminas de manzana y acácul suplementadas con un ingrediente a base de proteínas lácteas y ácido fólico	97
3.3.2 Digestión <i>in vitro</i> de las láminas de fruta suplementadas con AF.....	98
3.3.2.1 Evaluación de la biodisponibilidad del AF presente en las láminas ante L. casei BL23	98
3.3.2.2 Cuantificación de la vitamina B9 en el sobrenadante obtenido de la digestión <i>in vitro</i> mediante HPLC.....	98
3.3.2.3 Evaluación de la bioaccesibilidad de la vitamina B9.	101
4. Resultados y discusión	103
4.1 Sección I: Láminas de fruta	103
4.1.1 Materiales y formulación	103
4.1.1.1 Análisis fisicoquímicos de los materiales y la formulación fresca.....	103
4.1.1.2 Caracterización del potencial bioactivo de los materiales y la formulación	107

4.1.2 Láminas de fruta:	109
4.1.2.1 Análisis fisicoquímico	109
4.1.2.2 Composición centesimal.....	113
4.1.2.3 Caracterización del potencial bioactivo.....	114
4.1.2.4 Bioaccesibilidad de los compuestos potencialmente bioactivos	116
4.1.2.5 Análisis sensorial	119
4.1.2.5.1 Estudio sensorial cualitativo.....	119
4.1.2.5.2 Análisis sensorial cuantitativo.....	121
4.1.2.5.2.1 Evaluación del grado de satisfacción global y por atributo.....	122
4.1.2.5.2.2 Evaluación de la intensidad de los atributos	123
4.1.2.6 Estabilidad	125
4.2 Sección II: Ingrediente de proteínas lácteas y ácido fólico	130
4.2.1 Caracterización de las interacciones entre las proteínas y la vitamina B9	130
4.2.1.1 Análisis de FT-IR	133
4.2.1.2 Potencial ζ de los constituyentes y de los complejos	136
4.2.2 Caracterización del tamaño de partícula en escalas nano y micro.....	138
4.2.2.1 Análisis del tamaño de partícula en nanoescala.	138
4.2.2.2 Análisis del tamaño de partícula en microescala.....	142
4.2.3 Caracterización de la formación de los complejos	144
4.2.3.1 Cinética de agregación.....	144
4.2.4 Caracterización potencialmente funcional de los complejos.....	146
4.2.4.1 Capacidad antioxidante de los complejos.....	146
4.2.4.2 Digestión <i>in vitro</i> y biodisponibilidad de AF ante <i>L. casei</i> BL23	148
4.2.5 Evaluación de la estabilidad física del ingrediente: Temperatura de transición vítrea	150
4.3 Sección III: Láminas de fruta + ingrediente de proteínas lácteas y ácido fólico	153
4.3.1 Biodisponibilidad del AF presente en las láminas de fruta ante <i>L. casei</i> BL23	154

4.3.2 Cuantificación del AF en las láminas suplementadas luego de realizar la digestión <i>in vitro</i> mediante HPLC	155
4.3.3 Bioaccesibilidad de la vitamina B9	158
5. Conclusión.....	161
6. Bibliografía	168
7. Anexos	200

Nomenclaturas y abreviaturas

Abreviatura	Significado
ABTS ⁺⁺	Radical [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico]
AF	Ácido fólico
$\Delta F_{\text{máx}}$	Distancia correspondiente a la fuerza máxima
AMT	Antocianinas monoméricas totales
a_w	Actividad de agua
Blg	β -lactoglobulina
β lg-AF	Ingrediente de β -lactoglobulina y ácido fólico
b.s.	Base seca
C	Constante de Guggenheim
CA	Capacidad antioxidante
CLSM	Microscopio de barrido láser confocal
CPT	Contenido de polifenoles totales
DLS	Dispersión de luz dinámica
EAG	Equivalente ácido gálico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FACM	Folic Acid Casei Medium
$F(ka)$	Función de Henry
$F_{\text{máx}}$	Fuerza máxima
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
HR	Humedad relativa
K	Factor de corrección del modelo GAB
LC-AF	Láminas frutales suplementadas con AF libre
<i>L. casei</i> BL23	<i>Lactocaseibacillus casei</i> BL23
LC-WPI	Láminas frutales con WPI
L-WPI-AF	Láminas frutales suplementadas con WPI-AF
m_{0c}	Contenido de agua límite de hidratación cinética relacionada con la adsorción en la primera capa del modelo GAB
OMS	Organización mundial de la salud

Ppm	Partes por millón
SGF	Fluido gástrico simulado
SIF	Fluido intestinal simulado
SSF	Fluido salival simulado
T _g	Temperatura de transición vítrea
t _r	Tiempo de retención en HPLC
WPI	Aislado de proteína de suero lácteo
WPI-AF	Ingrediente de aislado de proteína de suero lácteo y ácido fólico

Introducción

1. Introducción

1.1 Organización de la tesis

La presente tesis se organiza en tres secciones. Las primeras dos secciones son independientes, y en la tercera se presenta la integración de éstas dos partes (**Figura 1.1**). En la **sección I**, se muestra el desarrollo de una golosina frutal deshidratada en forma de lámina, se presentan estudios de caracterización, bioaccesibilidad, sensoriales, texturales y estabilidad. En la **sección II**, se presenta el desarrollo de dos ingredientes elaborados a partir de proteínas lácteas y ácido fólico, mostrando estudios de caracterización fisicoquímica, análisis de las interacciones entre los componentes, y biodisponibilidad del ácido fólico ante un microorganismo posterior a la digestión *in vitro*. Finalmente, en la **sección III**, se presenta la integración de las **secciones I y II** dado que se elaboró una lámina de fruta tal como fue desarrollada en la **sección I**, y se suplementó con vitamina B9 mediante la incorporación de uno de los ingredientes desarrollados en la **sección II**. Estas láminas suplementadas, fueron evaluadas en función de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de la vitamina B9 mediante HPLC y una metodología microbiológica (método oficial) respectivamente.

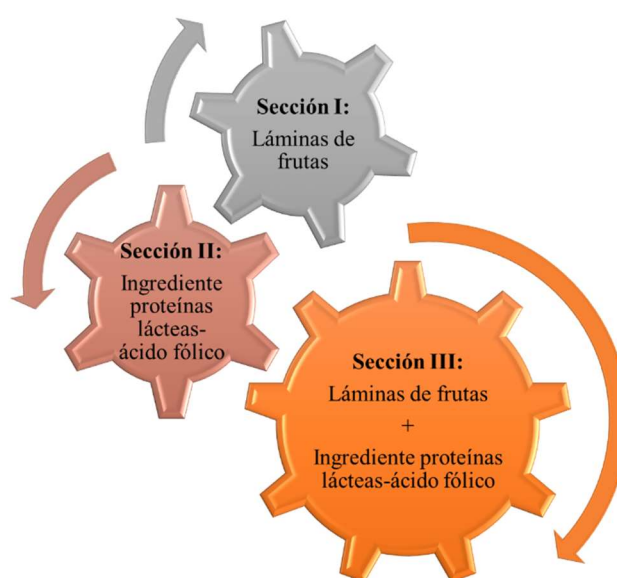


Figura 1.1: Organigrama de la tesis.

1.2 Introducción Sección I: Desarrollo de láminas de frutas

1.2.1 Necesidades de una alimentación saludable y desafíos en la industria de las golosinas

Desde hace varios años, se ha generado un crecimiento paulatino sobre la conciencia en la nutrición saludable y los productos alimenticios de alta calidad (Kimpel y Schmitt, 2015). En este sentido, desde el año 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve una alimentación sana a partir de una serie de sugerencias que se van actualizando periódicamente. Las últimas recomendaciones se publicaron en el año 2018, y se han realizado en base al 13° Programa General de Trabajo, que orienta la labor de la OMS durante el periodo 2019-2023. Este programa propone principalmente la reducción de la ingesta de sal (sodio) y la supresión de grasas trans de producción industrial como medidas prioritarias para alcanzar el objetivo de asegurar y promover el bienestar a la población. Las sugerencias emitidas por la OMS (2018) para alcanzar una vida sana indican lo siguiente:

- Consumir por día al menos 400g o 5 porciones de frutas y verduras para evitar desarrollar enfermedades no transmisibles y asegurar la ingesta diaria de fibra dietética.
- Reducir el consumo total de grasa a menos del 30% de la ingesta calórica diaria para evitar el aumento insalubre de peso en la población adulta. Además, para evitar el riesgo de enfermedades no transmisibles, se debe limitar el consumo de grasas saturadas a menos del 10% de la ingesta calórica diaria, limitar el consumo de grasas trans a menos del 1% y sustituir grasas saturadas y grasas trans por grasas poliinsaturadas.
- Consumir menos de 5 g de sal diarios para prevenir la hipertensión y el riesgo de enfermedad coronaria y accidente cardiovascular.

- Reducir la ingesta diaria de azúcares libres a menos del 10% de la ingesta calórica total.

Esta medida apunta a evitar el exceso de calorías, disminuyendo el riesgo de caries dental y además reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que distintas pruebas indican que los azúcares libres influyen en la tensión arterial y los lípidos séricos.

Estas recomendaciones, sumadas a las exigencias de los consumidores, han generado un cambio de paradigma en la tecnología alimentaria. La tendencia desde hace varios años es desarrollar alimentos que presenten beneficios para la salud y reduzcan los riesgos de sufrir enfermedades derivadas de la dieta (Chen y col., 2006). En este sentido, la industria de las golosinas presenta un desafío aún más grande ya que los caramelos han sido relacionados con una mala alimentación debido al alto contenido de azúcar (Jackson y col., 2004). La ingesta de azúcares, tal como menciona la OMS, es un factor de riesgo importante para las enfermedades no transmisibles, en particular el sobrepeso y la obesidad (Te Morenga y col., 2013), la caries dental (Moynihan, 2016) y la diabetes tipo 2 (Imamura y col., 2015). Por lo tanto, la atención se centra en reemplazar los productos altos en calorías y bajos en nutrientes por otros nutritivos, y reducidos en azúcares simples (Ŝeremet y col., 2020). En contraposición, esta industria debe obtener golosinas sabrosas y atractivas para los consumidores, a fin de que tengan oportunidades en el mercado. En este contexto, numerosas investigaciones han abordado estos desafíos, y han desarrollado alternativas de golosinas saludables, como por ejemplos, barras de cereal conteniendo altos niveles de fibra y omega 3 (Silva de Paula y col., 2013), caramelos de fruta enriquecidos con residuos de uva (Cappa y col., 2015), bocaditos liofilizados a partir de frutos rojas (Archaina y col., 2019), caramelos a base de té blanco (Ŝeremet y col., 2020), postre de guayaba y azúcar de palma (Sobana y col., 2021), gomitas preparadas a partir de melazas naturales como uva, mora y algarroba (Kurt y col., 2021), entre otros.

1.2.2 Alimentos funcionales

En concordancia con lo discutido en el ítem anterior, la creciente conciencia de los consumidores respecto a los hábitos alimentarios y la salud también ha generado que las investigaciones y la industrialización de alimentos se centren en desarrollar productos e ingredientes con funciones fisiológicas específicas (Domínguez-Días y col., 2020; Nazir y col., 2019). Estos alimentos, conocidos como *alimentos funcionales*, son aquellos que además de nutrir, aportan beneficios para la salud humana (Frewer y col., 2003; Khan y col., 2013; Nazir y col., 2019). A pesar de que estos alimentos actualmente son muy reconocidos y solicitados por los consumidores, el interés comenzó en 1980 en Japón y posteriormente se difundió a occidente (Millone y col., 2011).

Los alimentos funcionales no tienen una definición oficial debido a que existen distintas opiniones respecto a las funciones que podrían aportar estos alimentos (Nazir y col., 2019; Heasman y Mellentin, 2001). En este sentido, existen dificultades para consensuar una normativa internacional ya que se presentan superposiciones entre las regulaciones farmacéuticas y las alimentarias (Nazir y col., 2019; Moreno, 2012). Por este motivo se producen ambigüedades en el etiquetado de productos nuevos, teniendo que decidir si se deben etiquetar como medicamentos, suplementos o alimentos (Nazir y col., 2019; Sun-Waterhouse, 2011). Esta situación representa una desventaja para la industria alimentaria y los consumidores. Por un lado, si los alimentos se etiquetan con mensajes relacionados con la salud, los consumidores considerarán a estos productos como “más saludables”, animándolos a comprarlos porque serán más adecuados para alcanzar una dieta sana (Hieke y col., 2016). Por otro lado, este interés de los consumidores acompañado de una normativa clara podría impulsar a las industrias a tener mayor innovación y competitividad (Domínguez-Días y col., 2020; Tollin y col., 2017). Al no existir un consenso general de la definición, en la literatura se encuentran diferentes definiciones de *alimentos funcionales* emitidas por organismos

reconocidos, y aunque se pueden observar ciertas diferencias en las interpretaciones, en general sirven como guía para identificar a los alimentos funcionales como tales. Algunas definiciones que se pueden encontrar son:

- “Cualquier alimento o ingrediente alimentario modificado que pueda proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene” (Consejo de Alimentación y Nutrición de la Academia Nacional de Ciencias, Martirosyan y Singh, 2015).
- “Aquellos alimentos enteros, fortificados, enriquecidos o mejorados que deben consumirse regularmente y en cantidades efectivas para obtener beneficios para la salud” (Asociación Dietética Americana, Martirosyan y Singh, 2015).
- “Alimentos procesados que contienen ingredientes que ayudan a funciones corporales específicas además de ser nutritivos” (Ministerio de Bienestar y Salud de Japón, MHLW, 1991; Shimizu, 2003).
- “Un alimento puede ser considerado funcional si se logra demostrar científicamente que posee efectos beneficiosos para la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de sus propiedades nutricionales habituales, de modo tal que mejore el estado general de salud o reduzca el riesgo de alguna enfermedad o ambas cosas” (Instituto Internacional de Ciencias de la Vida- ILSI Europa, Serafini y col., 2012)
- “Los alimentos funcionales son alimentos enriquecidos con ingredientes bioactivos y que han demostrado beneficios para la salud, como yogur con probióticos o panes y pastas con fibra añadida” (División de la Industria Alimentaria, Agricultura y Agroalimentación de Canadá, Nazir y col., 2019).

- “Es el alimento que tiene funcionales especiales para la salud o que es capaz de suministrar vitaminas o minerales. Es apto para el consumo de grupos especiales de personas y tiene la función de regular las funciones del cuerpo humano, pero no se utiliza con fines terapéuticos. No debe causar ningún daño, ya sea agudo, subagudo o crónico” (Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos de China, Nazir y col., 2019).

En resumen, se podría decir que los alimentos para ser considerados *funcionales*, deben cumplir con tres requisitos principales:

- 1) Ser un alimento o un ingrediente modificado/procesado.
- 2) Además de nutrir debe presentar algún efecto específico que beneficie a la salud.
- 3) Los efectos deben estar demostrados científicamente.

En este último punto, es interesante mencionar la experiencia de Japón en esta temática ya que han sido los pioneros en el área de alimentos funcionales. Japón desarrolló un sistema de regulación llamado “FOSHU” que fue creado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón (MHLW) en el año 1991, para aprobar declaraciones relacionadas con los efectos de los alimentos en el organismo (Domínguez-Díaz y col., 2020). Los alimentos FOSHU son los que contienen ingredientes con funciones para la salud y que han sido oficialmente aprobados para declarar sus efectos fisiológicos en el cuerpo humano. Estos alimentos están destinados a ser consumidos para el mantenimiento y/o promoción de la salud o para usos por personas que desean controlar algunas condiciones de la salud como la presión arterial o el colesterol en sangre. Para denominar un alimento como FOSHU, el marco regulatorio de Japón establece que se debe demostrar la eficacia y la función realizada a partir de pruebas científicas sólidas como estudios metabólicos y bioquímicos *in vitro*, estudios *in vivo* y ensayos clínicos. Además, el alimento debe tener un perfil nutricional adecuado, es decir, sin exceso de sal, azúcar o grasa (MHLW, 2021). Por ejemplo, dentro de los ingredientes FOSHU se encuentran

aquellos que mejoran las afecciones gastrointestinales como oligosacáridos, bifidobacterias, fibra dietética, entre otros; otro ejemplo son los ingredientes relacionados a funciones sobre el azúcar en sangre como la dextrina no digerible, albúmina de trigo, polifenol de té de guayaba y L-arabiosa (MHLW, 2021).

En lo que respecta a Argentina, todavía no existe un marco regulatorio sobre este tipo de alimentos porque resulta complejo incluir en una sola categoría diferentes productos que contengan una gran variedad de ingredientes con diversos efectos en el organismo (Moreno, 2012). En cuanto al etiquetado, si bien se permite agregar información nutricional complementaria siguiendo las pautas establecidas en el reglamento técnico Mercosur (art. 235 quinto del CAA), como por ejemplo “bajo en sodio”, “alto en fibra” o “no contiene grasas saturadas”, el artículo 235 del CAA prohíbe en forma expresa las indicaciones que se refieran a propiedades medicinales, terapéuticas o aconsejar su consumo por razones de estímulo, bienestar o salud (art. 235 del CAA, incorporado por Res. Conj. SPRyRS 149/05 y SAGPyA 683/05).

1.2.3 Láminas de fruta

Las láminas de fruta son golosinas en forma de láminas o planchas de pulpa de fruta de consistencia suave y elástica, sabor dulce y un color que depende de la materia prima empleada (FAO-PRODAR, 2014). Estos productos se consumen directamente como un snack o se pueden cortar en trozos pequeños para incorporarlos en mezclas de cereales (Irwandi y col., 1998). Se producen mediante deshidratación de puré de frutas logrando un contenido de agua óptimo que permite almacenar el producto a temperatura ambiente sin promover el crecimiento microbiano (Demarchi y col., 2013). Estos productos son conocidos en algunos países como

Canadá y Estados Unidos, pero en el mercado argentino todavía no han sido incorporados. En la **Figura 1.2**, se muestra un esquema general utilizado para la producción de láminas de fruta.

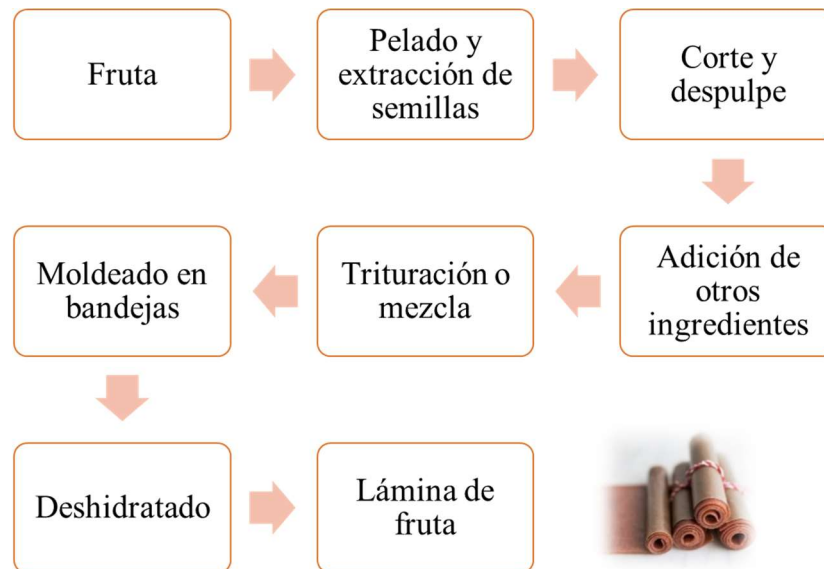


Figura 1.2: Proceso general utilizado para el desarrollo de láminas de frutas. Adaptación de Diamante y col. (2014).

En la preparación de las láminas de fruta se suelen agregar diferentes tipos de ingredientes y aditivos al puré de frutas para aumentar la vida útil, mejorar la textura, el color y el flavor (Raab y Oehler, 1986). Se han estudiado formulaciones desarrolladas con frutas muy variadas, con el agregado de diferentes ingredientes y empleando distintos métodos de secado (Maskan y col., 2002; Lee y Hsieh, 2008; Vatthanakul y col., 2010; Quintero-Ruiz y col., 2012; Demarchi y col. 2013; Diamante y col., 2014; Valenzuela y Aguilera, 2015; Suna y col. 2019). Debido a que los procesos de deshidratación pueden afectar la calidad del color y causar la pérdida de fitoquímicos específicos, las condiciones del proceso de secado se deben ajustar para minimizar el deterioro (Arancibia-Ávila y col., 2012). La **Tabla 1.1** muestra algunos ejemplos de las distintas materias primas y condiciones de secado que se han utilizado para desarrollar láminas de frutas.

Tabla 1.1: Ejemplos de formulaciones y métodos utilizados para desarrollar láminas de frutas.

Métodos	Materias primas	Condiciones de secado	Humedad (H) y/o a_w
Gujral y Khanna (2002)	Mango, proteínas de soja/leche descremada en polvo, sacarosa.	Equipo: Deshidratador Temperatura: 60 °C; Tiempo: 7,60 h	H= 10%
Pushpa y col. (2006)	Mango, proteínas de soja desgrasadas.	Equipo: Microondas de 750 W 2450 MHz. Potencia: 2 a 10 niveles; Tiempo: Ciclos de 30 s prendido y 30 s apagado, hasta alcanzar % H requerida.	H= 12-15% a_w = 0,529-0,667
Lee y Hsieh (2008)	Frutilla, pectina de alto metoxilo, jarabe de maíz, ácido cítrico anhidro.	Equipo; Horno de convección. Espesores de la lámina: 1,8; 2,7;3.6 mm.; Temperaturas 50-60°C; Tiempos: hasta alcanzar % H requerida (1,3-10 h)	H = 12%
Che-Man y K-Sin (1997)	Yaca, jarabe de glucosa, azúcar, metasulfito de sodio, ácido sórbico	Equipo: Deshidratador Temperatura: 50 °C; Tiempo: 24 h	H= 12,7% a_w = 0,60
Phimpharian y col. (2011)	Piña, jarabe de glucosa, pectina, azúcar y maltodextrina.	Equipo: Deshidratador Temperatura: 60 °C; Tiempo: 10 h	H= 7-9% a_w = 0,395-0,55
Demarchi y col. (2013)	Manzana, sacarosa, polvo de povidona, ácido cítrico, sucralosa.	Equipo: Deshidratador Temperaturas: 50-70 °C; Tiempo: Hasta alcanzar % H requerida.	H= 30% a_w = 0,70

Babalola y col. (2002)	1) Papaya, sacarosa, ácido cítrico, benzoato de sodio. 2) Guayaba, sacarosa, ácido cítrico, benzoato de sodio.	Equipo: Horno Temperatura: 60 °C; Tiempo: 8 h	$a_{w1} = 0,61$ $a_{w2} = 0,73$
Maskan y col. (2002)	Uva, almidón.	1) Equipo: Deshidratador -Temperatura: 55-75 °C; Tiempo: Hasta alcanzar % H requerido 2) Secado solar Temperatura del día: 21 °C; Tiempo: Hasta alcanzar % H requerido (entre 3 y 25 H dependiendo el espesor).	H= 11%
Marzelly y col. (2017)	Banana, carragenina, azúcar	Equipo: Horno Temperatura: 60 °C; tiempo: 20 h	H= 15,16 - 12,87%.
Suna y col. (2019)	Níspero, almidón de trigo, ácido ascórbico,	Equipos: Microondas domestico (90 W y 180 W) Deshidratador (60-70 °C) Estufa de vacío (60-70°C) Tiempo: Hasta alcanzar % H requerido	H= 8%

1.2.4 Materias primas

1.2.4.1 Fruto de *Ardisia compressa* Kunth “Acáchul”

Ardisia compressa Kunth es un arbusto silvestre que crece en el continente americano desde Canadá hasta Costa Rica (Heredia-Vásquez, 2013) y su clasificación taxonómica se muestra en la **Tabla 1.2**. El arbusto tiene una altura que varía de 1 a 7 m, presenta flores numerosas y pequeñas, agrupadas en racimos axilares que cuelgan de las ramas del árbol.

Tabla 1.2: Clasificación taxonómica de *Ardisia Compressa* Kunth.

Adaptado de (Heredia-Vásquez, 2013).

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Myrsinaceae
Género	Ardisia
Epíteto específico	Compressa

En algunas zonas de Méjico, este arbusto está relacionado a los cafeticultores ya que lo suelen utilizar en las parcelas cultivadas de café para suministrar sombra a los cultivos y conseguir hojarasca de rápida desintegración y nutrientes para el suelo (Hernández y col., 2017). Los agricultores también se benefician aprovechando sus frutos como complemento de la dieta familiar y sus ramas y hojas como fuente de combustible o leña (Martínez-Blanco y col., 2019). En general, sus frutos se consumen en fresco o son utilizados para desarrollar distintos preparados como helados, atoles y licor (Joaquín-Cruz y col., 2015; Martínez-Blanco

y col., 2019). A pesar de que este arbusto y sus frutos sean conocidos localmente, la cantidad de información disponible sobre su cultivo y aprovechamiento es sumamente limitada (Martínez-Blanco y col., 2019).

El fruto de la especie *Ardisia compressa* K. es redondo, de color rojo morado oscuro, con una cubierta delgada. Su pulpa es jugosa, de color rojizo y presenta una semilla esférica de sabor amargo (Heredia-Vásquez, 2013; Martínez-Banco y col., 2019). Dependiendo de la zona de México recibe diferentes nombres; en la literatura se lo puede encontrar como “Chagalapoli” (Joaquín-Cruz y col., 2015; Antonio-Gómez y col., 2021); “Capulin de mayo” (Martínez-Blanco y col., 2019) y “Acáchul” (Vázquez-Sánchez y col., 2019; Vázquez-Sánchez y col., 2021). En la **Figura 1.3**, se muestra una imagen de las flores, las hojas del arbusto y el fruto.



Figura 1.3: *Ardisia compressa* Kunth: a) flores, b) racimo de frutos inmaduros, c) racimo de frutos maduros, d) mitad de un fruto maduro y e) semillas. Imagen extraída de Joaquín-Cruz y col. (2015).

Con respecto a la composición centesimal (**Tabla 1.3**), los valores que presenta el acáchul son similares a los que se encuentran en bayas comunes tales como frutilla y arándanos (Joaquín-Cruz y col., 2015).

Tabla 1.3: Características fisicoquímicas y composición del acáchul. Adaptado de Joaquín-Cruz y col. (2015).

Propiedad	Valor
pH	2,73 ± 0,01
Acidez titulable (mg ácido tartárico/100g muestra)	2,56 ± 0,03
Sólidos solubles (°Brix)	9,7 ± 11
Contenido de agua (g/100g de muestra)	86,85 ± 0,49
Cenizas (g/100g de muestra)	0,58 ± 0,005
Proteínas (g/100g de muestra)	0,77 ± 0,01
Fibra cruda (g/100g de muestra)	1,62 ± 0,02
Carbohidratos (g/100g de muestra)	9,64 ± 0,24

Valores medios ± desviación estándar.

En cuanto a los compuestos bioactivos, se observó que esta fruta presenta un contenido elevado de polifenoles con alto predominio de antocianinas (Joaquín-Cruz y col., 2015; García-Flores y col., 2019; Vázquez-Sánchez y col., 2019). Joaquín-Cruz y col. (2015) mostraron que las antocianinas que se encuentran en mayor proporción son: 35% de malvidina-3-O-galactósido, 28% de delphinidina 3-O-galactósido y 19% de petunidina 3-O-galactósido. Además, observaron que la actividad antioxidante fue un 40% mayor que la encontrada en otras bayas comunes (frutilla, arándano y mora). Por otro lado, Vázquez-Sánchez y col. (2019) encontraron polifenoles como el ácido glucónico, el ácido 4-cafeoilquínico, el hexóxido de galoilo, el ácido rosmarínico y 3-O-glucósido de quercetina, entre otros.

1.2.4.2 Manzana

La manzana (*Malus* spp.) es una fruta perteneciente a la familia de las Rosáceas que presenta más de 7500 cultivares conocidos en todo el mundo, encontrándose disponible tanto en climas templados como subtropicales (Dobrzanski y col., 2006). Su consumo se ha relacionado con efectos beneficiosos para la salud, además de ser una fruta de gran aceptación sensorial en el mundo. Según la Cámara Argentina de Fruticultores Integrados (CAFI), la producción mundial de manzanas se estimó en 75.9 millones de toneladas para los años 2020/2021.

En Argentina, la región productora de manzana está ubicada en el Alto Valle del Río Negro y Neuquén, y en el Valle Medio del Río Negro, que concentran el 80% de la producción. El resto se genera en el Valle de Uco (Mendoza). Otras zonas de menor relevancia son 25 de Mayo (La Pampa) y el Valle del Tulum (San Juan). Entre 2020 y 2021, se cultivaron 18.000 hectáreas con manzana y las variedades cultivadas en el país son: Gala y selecciones, Golden Delicious, Red Delicious y clones, Granny Smith, Fuji y selecciones, Rome Beauty, Braeburn, Crupps Pink y Starkrimson (CAFI, 2021).

El producto más popular de la manzana es el jugo (Siebert y col., 2019). En Argentina, las industrias elaboradoras de jugos concentrados, sidra, deshidratados, conservas, pulpas deshidratadas y licores se concentran en la región del Alto Valle, el Valle Medio y en Mendoza (Bruzzzone, 2008). El orujo que queda de la producción de jugo es muy perecedero (Barreira y col., 2019), pero se puede utilizar para la extracción de pectinas (Garna y col., 2007), alimento para ganado (Wadhwa y Bakshi, 2013), para desarrollar productos alimenticios (Sudha y col., 2007), combustible y biotransformación (Thi y col., 2016).

Con respecto a las características fisicoquímicas de las manzanas, se ha informado que son muy variables y que dependen en gran medida de los cultivares. La **Tabla 1.4** muestra ejemplos de algunos resultados de cinco cultivares (Henríquez y col., 2010).

Tabla 1.4: Características fisicoquímicas de diferentes cultivares de manzanas. Adaptado de Henríquez y col. (2010).

Cultivar	Humedad (g/100g)	pH	Acidez (mg ácido málico/100g)	Sólidos solubles (°Brix)
Fuji	83,9 ± 0,7	4,2 ± 0,01	0,15 ± 0,004	12,7 ± 0,8
Granny Smith	83,7 ± 0,6	3,3 ± 0,00	0,40 ± 0,002	12,6 ± 0,3
Pink Lady	82,9 ± 0,1	3,5 ± 0,01	0,38 ± 0,023	15,5 ± 0,1
Red Delicious	83,0 ± 1	4,0 ± 0,04	0,18 ± 0,009	14,6 ± 0,1
Royal Gala	84,8 ± 0,6	4,2 ± 0,05	0,16 ± 0,010	14,0 ± 0,1

Valores expresados como la media ± desviación estándar.

En cuanto a los compuestos bioactivos, en líneas generales se destacan algunos compuestos polifenólicos, como ácido clorogénico, ácidos neoclorogénicos, ácido cumaroilquínico, catequinas, epicatequinas, procianidinas (B1 y B2), entre otros (Khanizadeh y col., 2008). Sin embargo, el contenido de estos compuestos varía debido a distintas variables: cultivar, diferentes tejidos de la fruta, condiciones de cultivo, prácticas culturales, madurez durante la cosecha, condiciones de almacenamiento poscosecha, y procesamiento (Imeh y Khokhar, 2002; Boyer y Liu, 2004; Saxena y col., 2016).

Con respecto a los beneficios para la salud humana, se ha observado que la manzana puede contribuir en la prevención de enfermedades crónicas del corazón y enfermedades vasculares, disfunciones respiratorias y pulmonares, diabetes, obesidad, cáncer, entre otras (Koutsos y col., 2015; Tu y col., 2017). Se observó que las manzanas poseen propiedades

antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Saxena y col., 2016; Barreira y col., 2019). En este contexto, en un estudio realizado sobre 8 cultivares de manzanas, se encontró que la manzana “Granny Smith” mostró un alto potencial antimutagénico, mientras que los cultivares Ambri Kashmiri, "Kinnaur" y "Red Delicious" mostraron niveles altos de capacidades antioxidantes y radioprotectoras (Saxena y col., 2016).

1.2.4.3 Edulcorantes: Maltitol y Estevia.

El CAA diferencia dos grupos de edulcorantes, por un lado, los que son nutritivos, los cuales involucran aquellas sustancias que endulzan y que además aportan calorías, específicamente 4 Kcal/g cuando se trata de hidratos de carbono (sacarosa, glucosa, jarabes) y 2,4 Kcal/g cuando se trata de polialcoholes (sorbitol, xilitol). Por otro lado, están los edulcorantes no nutritivos, caracterizados por ser sustancias que endulzan pero que no aportan calorías y tampoco tienen un efecto glucémico. En general se utilizan en muy poca cantidad dado que son muy intensos (Secretaría de Agroindustria-MAGyP, 2014).

La sacarosa natural, denominada “azúcar” (artículo 767 del CAA), es uno de los edulcorantes nutritivos más conocidos y utilizados. Este compuesto, además de endulzar, presenta muchas propiedades muy apreciadas en la gastronomía y desarrollo de productos, tales como: estabilizar fermentaciones, conservar, proporcionar textura, consistencia y viscosidad, dar brillo al producto final, entre otras (Lisbona-Catalan y col., 2013). Sin embargo, la tendencia de los consumidores ha sido reemplazar el azúcar debido a los efectos perjudiciales asociados a la salud. Tal como se describió antes (**ítem 1.2.1.**), el consumo de azúcar se ha asociado a enfermedades tales como diabetes, obesidad, caries, enfermedades cardiovasculares, entre otros (Gómez-Morales y col., 2013), y la OMS ha recomendado disminuir su ingesta.

El jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), es otro edulcorante nutritivo que se utiliza masivamente. Se lo puede encontrar en bebidas, cereales para el desayuno, productos horneados, postres lácteos, entre otros (Zargaraan y col., 2016). Este edulcorante que se obtiene mediante la hidrólisis del almidón y posterior proceso enzimático (artículo 778 ter del CAA), es un producto que se ha convertido en el sustituto del azúcar, dado que es muy económico, tiene alta capacidad de mejorar el sabor de los alimentos (Zargaraan y col., 2016), disminuye la actividad de agua, y reduce la cristalización (Young y O'Sullivan, 2011). No obstante, las problemáticas que conlleva su consumo son similares a la de la sacarosa. El JMAF está asociado a la obesidad, sobrepeso, diabetes tipo II, caries, entre otros (Alten y col., 2018; Liao, 2019; Tahmassebi y BaniHani, 2020).

En este contexto, los polioles son una alternativa interesante para reemplazar el azúcar y el JMAF. Estos productos presentan diversas características que logran resolver algunos problemas tecnológicos en la elaboración de alimentos dado que reducen la actividad del agua, son inertes a las reacciones de Maillard, agentes texturizantes, mediadores de cristalización, solubilizantes y aromatizantes (Carocho y col., 2017). Entre los polioles se destaca el maltitol, el cual es un compuesto que se obtiene mediante la hidrólisis, reducción e hidrogenación del almidón (Pratt y col., 2011). Este producto se puede utilizar en forma sólida, o líquida. Según el CAA, cuando se encuentra en estado líquido se lo denomina “jarabe de maltitol” y se lo define como el producto obtenido por hidrogenación de un jarabe de glucosa de alto contenido de maltosa (Artículo 778-quinto, CAA). Este poliol presenta propiedades similares a las del azúcar, como su masa molecular y las propiedades de T_g (Young y O'Sullivan, 2011), ofreciendo diversas ventajas tecnológicas, como plasticidad, agente de carga, emulsionante, estabilizante y espesante, propiedades que permiten su aplicación en muchos productos de confitería sin azúcar (Young y O'Sullivan, 2011; Grembecka, 2015). Además, otorga beneficios para la salud, dado que no es cariogénico, es seguro para diabéticos (Joshi y col.,

2016), y como todos los polioles, aporta la mitad de las calorías que la sacarosa. No obstante, también presenta algunas desventajas, dado que en proporciones mayores a 25-30g/ Kg de peso corporal por día presenta efectos laxantes e inflamación abdominal (Grembecka, 2015). Sin embargo, la JECFA en 1993 estableció que no tiene un IDA especificado, y actualmente sus especificaciones continúan sin modificaciones (JECFA, 1993; Grembecka, 2015, Deis, 2016).

Por otro lado, los edulcorantes no calóricos también son una alternativa para reemplazar el azúcar, aunque se los suele utilizar sólo con la finalidad de endulzar dado que la característica más destacable que presentan es el alto poder edulcorante (Carocho y col., 2017). Estos compuestos son elegidos para dietas hipocalóricas, pacientes diabéticos y otros casos específicos en las que se debe controlar la ingesta calórica ya que no desencadenan una respuesta glucémica (Fry, 2012; Nichol y col. 2018). Además, se ha observado que ayudan a reducir la incidencia de caries dental en los niños (Baker-Smith y col., 2019).

Entre los edulcorantes no calóricos se encuentran los que son artificiales y los naturales. Estos últimos han presentado un gran crecimiento en los últimos años debido a la demanda por parte de los consumidores (Gasmalla y col., 2014; Carocho y col., 2017). Dentro de este grupo se destacan los glucósidos de esteviol, los cuales se conocen habitualmente con el nombre de “estevia” debido a que son producidos por plantas género estevia. En este género existen 230 especies, pero sólo las especies *rebaudiana* y *phlebophylla* producen glucósidos de esteviol, los cuales son responsables del sabor dulce (Brandle y Telmer, 2007). La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un arbusto ramificado de la Familia *Asteraceae*, nativa de la región de Amambay en el noreste de Paraguay, pero que también se la puede encontrar en Brasil y Argentina (Lumus-Mondaca y col., 2012). Actualmente muchas investigaciones han destacado la utilización de *Stevia rebaudiana* B. en el desarrollo de productos, obteniendo excelentes resultados. Por ejemplo, Góngora-Salazar y col. (2018) desarrollaron galletitas de avena endulzadas con

estevia ofreciéndolas como alternativa para la prevención de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico; Archaina y col. (2019), desarrollaron snacks de frutas endulzados con estevia, obteniendo muy buena valoración por un panel sensorial; Díaz-García y col. (2021) desarrollaron una infusión a partir de maíz morado, canela y como endulzante natural estevia, logrando obtener un producto con una capacidad antioxidante mejorada; y Rivero y col. (2021) desarrollaron caramelos tipo gomitas endulzadas con estevia, con muy buenas características funcionales. Es decir que este edulcorante tiene mucha potencialidad para ser utilizado en el desarrollo de nuevos alimentos. No obstante, al reemplazar el azúcar en un alimento, no sólo se sustituye el dulzor, sino que también se ven afectadas otras propiedades que hacen al producto final. En este sentido, Samuel y col. (2018), recomiendan que, al reemplazar el azúcar por estevia, se debe tener en cuenta de combinarlo con otros agentes de carga como maltodextrina, polialcoholes, hidrocoloides o proteínas para imitar las características del azúcar y para proporcionar la humedad y la textura que se consiguen con las versiones de azúcar completo. Por otro lado, estos autores también plantean que la estevia en altas concentraciones puede impartir sabores desagradables, como amargo y metálico, los cuales pueden perdurar en el tiempo, por lo que las mezclas con otros edulcorantes pueden resultar favorables. Otro aspecto relevante por considerar es la ingesta diaria admitida estipulada por JECFA en 2019 que es de 0-4 mg/ Kg de peso corporal.

En este trabajo, a fin de reducir los aspectos negativos de los edulcorantes individuales, se utilizó la combinación de jarabe de maltitol y estevia para endulzar las láminas de frutas. De esta manera, fue posible obtener un producto con una textura y sabor sensorialmente agradables.

1.2.5 Compuestos bioactivos

Un compuesto bioactivo es aquel que tiene la capacidad de interactuar con uno o más componentes del tejido vivo, presentando una amplia gama de efectos probables (Abdelkarim y Bellaoui, 2014). Los compuestos bioactivos son constituyentes extra nutricionales que normalmente se encuentran en pequeñas cantidades en los alimentos (Kris-Etherton y col., 2002). Entre estos compuestos, se destacan los que poseen capacidad antioxidante ya que pueden otorgar un importante beneficio para mejorar la calidad de vida, al prevenir o posponer la aparición de enfermedades degenerativas (Huang y col., 2005; Alam y col., 2013; Stavrou y col., 2018). Cuando estos compuestos se incorporan en la dieta, pueden reaccionar eliminando especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) (**Tabla 1.5**), deteniendo reacciones en cadena de radicales o inhibiendo la formación de oxidantes reactivos (Poljšak y Fink, 2014; Gupta, 2015, Caravajal-Caravajal, 2019).

Tabla 1.5: Algunas especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN).

	ERO	ERN
Radicales	Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) Radical Hidroxilo ($OH^{\cdot}$) Radical peroxilo ($ROO^{\cdot}$)	Óxido Nítrico ($NO^{\cdot}$)
No radicales	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Oxígeno singulete (1O_2)	Peroxinitrito ($ONOO^-$)

Las especies reactivas son conocidas por causar daño oxidativo y disfunción tisular, pero también sirven como señales moleculares que activan respuestas al estrés, beneficiando al organismo. Estos efectos se regulan por un sistema de defensas bioquímicas que neutraliza el efecto oxidativo, sin embargo, ante una sobreproducción de EROs el sistema de defensa

antioxidante no alcanza a regular y se genera un nivel de estrés oxidativo que puede producir daño en la función celular (Schmidt y col., 2015; Di Meo y col., 2016). Se ha reportado que estas especies están involucradas en enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad y envejecimiento (Darlington y Stone, 2001; Poljšak y Fink, 2014). Tanto las ERO como las ERN pueden ser adquiridas de forma exógena mediante el humo del tabaco, la contaminación ambiental, las radiaciones ionizantes (rayos X y UV), el consumo de alcohol, el exceso de ejercicios, el consumo de azúcares y grasas, el consumo de fármacos, y el estrés psicológico, entre otros (Smith y col, 2015).

Existe una gran variedad de compuestos bioactivos que tienen actividad antioxidante y que podrían ofrecer protección contra las ERO y las ERN (Poljšak y Fink, 2014; Caravajal-Caravajal, 2019). Se observó una correlación inversa entre la ingesta de frutas y verduras y la aparición de enfermedades como inflamación, enfermedades cardiovasculares, cáncer y trastornos relacionados con el envejecimiento (Huang y col., 2005), sugiriéndose que se debe al alto contenido en compuestos bioactivos que presentan estos alimentos (Di Gioia y col., 2020).

Entre los compuestos con capacidad antioxidante se destacan los compuestos fenólicos o polifenoles. Estos compuestos están formados por uno o varios anillos aromáticos unidos a uno a más grupos hidroxilos. La estructura principal en la que se basa todo el grupo es el fenol (**Figura 1.4**), y el anillo aromático es el benceno.

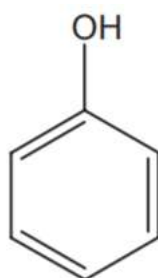


Figura 1.4: Estructura del fenol.

Algunos compuestos fenólicos son moléculas simples con bajo peso molecular, mientras que otros son polímeros (Manach y col., 2004; Kim y col., 2014). Debido a la diversidad de moléculas que pueden existir, los compuestos fenólicos se han clasificado en grupos y subgrupos (**Figura 1.5**).

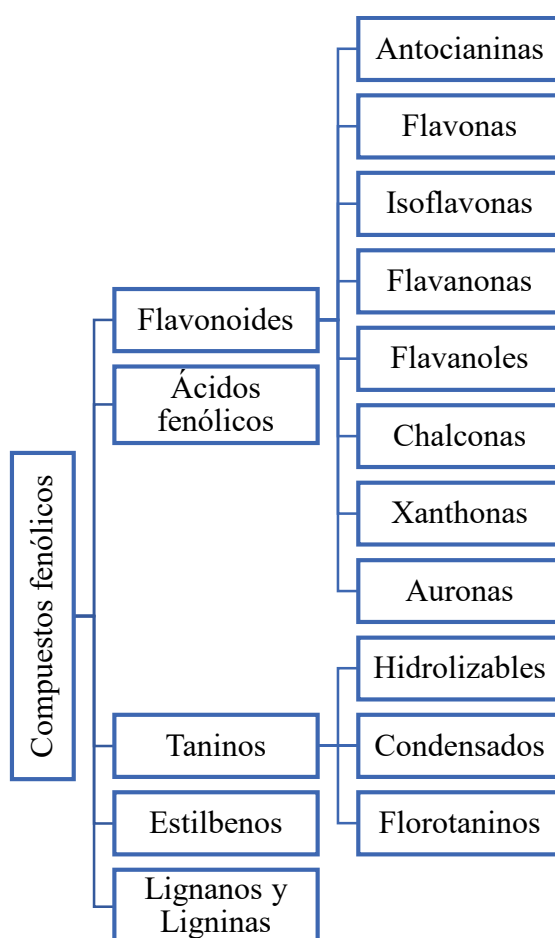


Figura 1.5: Clasificación de los compuestos fenólicos (Ignat y col., 2011).

De las cinco familias en las que se dividen los compuestos fenólicos (**Figura 1.5**), el grupo de los flavonoides es especialmente importante dado que está asociado a muchos efectos beneficiosos en la salud. Se han demostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas (Panche y col., 2016; Tungmunthum y col., 2018). Muchas de estas funciones están relacionadas con el alto potencial redox que presentan estas moléculas, que permite que actúen como agentes reductores, donantes de hidrógeno y extintores de oxígeno singulete (Tsao y Yang, 2003; Ignat y col., 2011). Estos compuestos se hallan distribuidos en la naturaleza en varias partes de las plantas, dado que son utilizados por los vegetales para su crecimiento y defensa contra plagas (Panche y col., 2016; Tungmunthum y col., 2018). Por este motivo, se encuentran abundantemente en alimentos y bebidas de origen vegetal, como frutas, verduras, té, cacao y vino, entre otros.

1.2.5.1 Antocianinas

Dentro de los flavonoides, se distinguen las antocianinas dado que son las responsables del color de muchas flores y vegetales de la naturaleza (Dangles y Fenger, 2018). Estos compuestos son antocianidinas glicosiladas, es decir que se forman a partir de una antocianidina y azúcares. Las antocianidinas consisten en un anillo aromático [A] unido a un anillo heterocíclico [C] que contiene oxígeno y a su vez, este también está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático [B] (Castañeda-Ovando y col., 2009). La **Figura 1.6** muestra la estructura general de las antocianinas.

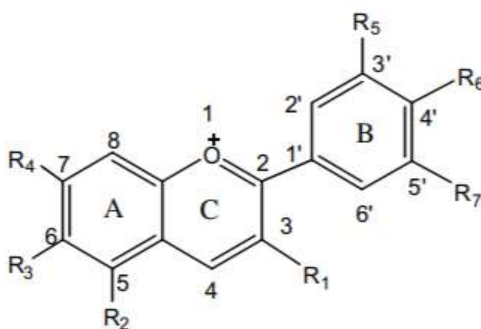


Figura 1.6: Estructura general de las antocianinas.

Existe una amplia variedad de antocianidinas en la naturaleza, y en consecuencia de antocianinas. En general se distinguen en función del número de grupos hidroxilados, la naturaleza y el número de azúcares enlazados a su estructura, los carboxilatos alifáticos o aromáticos enlazados a la molécula de azúcar y la posición de estos enlaces (Liu y col., 2018). Entre las antocianidinas, son seis las que se encuentran en mayor proporción y que por ese motivo han sido las más estudiadas. Entre los alimentos de origen vegetal que contienen estos pigmentos, se ha observado una mayor proporción de cianidina (50%), siguiendo en cantidades iguales la delfinidina (12%), pelargonidina (12%), y peonidina, (12%), y finalmente la petunidina y malvidina hallándose ambas en un 7% (Kong y col., 2003). Por otro lado, la antocianina más común es la cianidina-3-glucósido (Kong y col., 2003; Castañeda-Ovando y col. 2009; Panche y col., 2016). En la **Figura 1.7** se pueden observar las estructuras químicas de estos seis pigmentos. Los alimentos que presentan mayor concentración de estos compuestos son los frutos rojos como grosellas negras, uvas rojas, frambuesas, frutillas, arándanos, y moras (Panche y col., 2016).

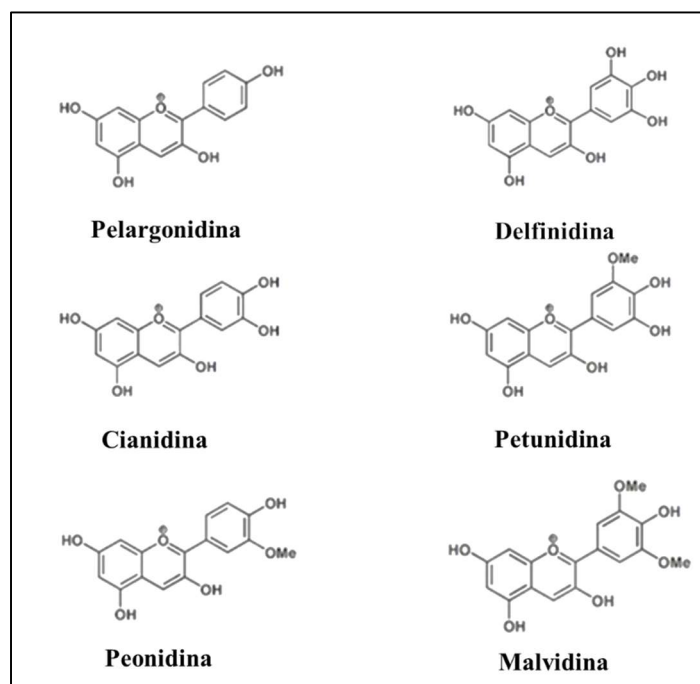


Figura 1.7: Estructura molecular de las antocianinas más comunes.

Las antocianinas aisladas son muy inestables y susceptibles a la degradación (Giusti y Wrolstad, 2001; Ignat y col., 2011). Su estabilidad depende de varios factores como el pH, la temperatura de almacenamiento, la estructura, concentración, luz, oxígeno, enzimas, entre otros (Castañeda-Ovando y col., 2009). En este sentido, el pH es un factor muy importante, dado que las antocianinas experimentan transformaciones estructurales reversibles manifestando espectros de absorbancia muy diferentes a distintos valores de pH. Dicha propiedad ha sido aprovechada para cuantificar las antocianinas (Giusti y Wrolstad, 2001). De acuerdo con Castañeda-Ovando y col. (2009), las antocianinas a pH 1 se hallan con una estructura predominante del ión flavilio, caracterizado por presentar una coloración que se encuentra en la gamma de los rojos intensos. A valores de pH entre 2 y 4, predomina una especie quinoidal de color azul. Entre los valores de pH 5 y 6 se hallan dos especies incoloras: pseudobase carbinol y chalcona, y finalmente a valores de pH superiores a 7, dependiendo de

los sustituyentes, pueden sufrir degradaciones. En este último punto, los monoglucósidos y los diglucósidos son más estables a pH 7. La **Figura 1.8** esquematiza las reacciones mencionadas.

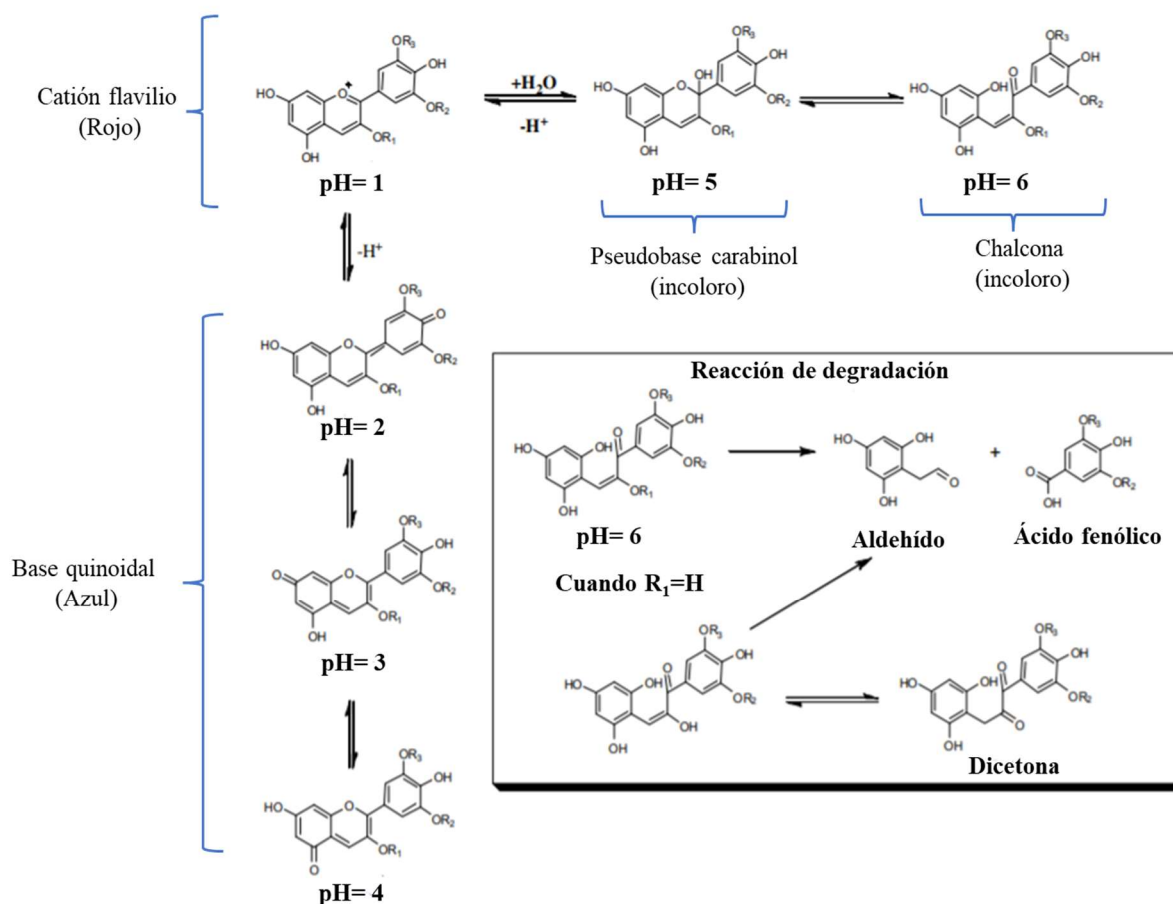


Figura 1.8: Estructuras químicas adoptadas por las antocianinas en función del pH. Adaptado de Castañeda-Ovando y col. (2009).

Por otro lado, las antocianinas también se destacan por presentar una capacidad antioxidante elevada. Estos compuestos en sus formas nativas pueden transferir electrones a ERO y podrían, por lo tanto, proporcionar protección a importantes biomoléculas oxidables, como los ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y ADN (Dangles y Fenger, 2018). En este contexto, numerosas investigaciones han demostrado que estos compuestos tienen propiedades

beneficiosas para la salud, como mejoras en el sistema cardiovascular, obesidad, diabetes, cáncer y propiedades neuroprotectoras (Tena y col., 2020). Por lo tanto, los beneficios de las antocianinas para ser utilizados en alimentos no sólo se relacionan con su utilización como colorantes naturales, sino que también podrían mejorar el perfil funcional de los alimentos.

1.2.5.2 Metodologías para determinar la Capacidad antioxidante.

Tal como se mencionó previamente, los alimentos presentan una variedad de compuestos bioactivos, entre los cuales se encuentran los descriptos anteriormente, que muestran actividad antioxidante. La ingesta de estos antioxidantes puede ser muy beneficiosa para mejorar la calidad de vida dado que podrían prevenir o posponer la aparición de enfermedades degenerativas (Stavrou y col., 2018). Existe un consenso creciente entre los científicos en relación a que una combinación de antioxidantes, en lugar de entidades individuales, puede ser más eficaz a largo plazo (Alam y col., 2012). En este sentido, Baranowska y col. (2021) encontraron que el efecto antioxidante de distintos flavonoides alimentarios (quercetina, naringenina y rutina) aumentó sinérgicamente cuando se encontraban juntos, comparado con las actividades antioxidantes de los compuestos individuales.

Existen numerosos procedimientos para comprobar la capacidad antioxidante de los alimentos (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2005). En general los ensayos *in vitro* más utilizados por la comunidad científica para cuantificar la capacidad antioxidante de alimentos se basan principalmente en dos mecanismos (Apak y col., 2016; Gulcin, 2020). Dichos mecanismos se describen a continuación:

- Transferencia de electrones SET: Estos métodos detectan la capacidad de un antioxidante potencial para transferir un electrón y reducir a otro compuesto, como

metales, carbonilos y radicales. En general estos ensayos pueden ser observados mediante un cambio de color de la muestra a medida que se reduce el oxidante (Apak y col., 2016; Gulcin, 2020). En estos métodos se incluye: cuantificación de polifenoles totales mediante Folin-Ciocalteu, poder antioxidante mediante la reducción del ión férrico (FRAP), poder antioxidante mediante la reducción del ión cúprico (CUPRAC).

- Transferencia de átomos de hidrógenos (HAT): Los métodos basados en este mecanismo miden la capacidad que presenta un antioxidante potencial para reaccionar con radicales libres mediante la transferencia de átomos de hidrógeno, y generar como producto un radical más estable. En general estas reacciones son independientes del pH y del solvente y son bastante rápidas (Apak y col., 2016; Gulcin, 2020). En estos métodos se destacan: capacidad de absorción de radicales oxígenos (ORAC), poder de captación de radicales totales (TRAP), blanqueamiento de la solución β -caroteno, ensayo de quimioluminiscencia.

A pesar de que estos mecanismos están bien definidos, no todos los ensayos para medir capacidad antioxidante actúan mediante un solo mecanismo. Por ejemplo, es el caso de la evaluación de la capacidad depuradora del radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico (ABTS^{•+}) y del radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH^{•+}), dado que se ha reportado que puede actuar tanto por SET como HAT (Apak y col., 2016; Gulcin, 2020).

Por otro lado, es importante destacar que se recomienda evaluar la actividad antioxidante de las muestras de interés realizando varios procedimientos, dado que de esta manera se logra complementar las metodologías y las conclusiones alcanzadas son más completas (Alam y col., 2013).

1.2.6 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos

Para el diseño y desarrollo de alimentos potencialmente funcionales, es importante que se realicen estudios que ofrezcan información sobre los efectos beneficiosos reales que podría tener el alimento sobre la salud. Cuando se trata de compuestos bioactivos su acción depende en gran medida de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad en el tracto digestivo y el sistema circulatorio (Shahidi y Peng, 2018).

Aunque se ha reportado que los estudios *in vitro* no siempre se correlacionan positivamente con lo que sucede en una dieta real, se considera que la investigación sobre bioaccesibilidad es importante dado que proporciona información valiosa para la selección de dosis de compuestos y para definir los métodos de cocción y procesamiento de los alimentos (Carbonell-Capella y col., 2014).

El término bioaccesibilidad hace referencia a la cantidad o fracción de compuestos que se liberan de la matriz alimentaria en el tracto gástrico-intestinal y que son transformados por procesos digestivos a fin de ser absorbidos por el epitelio intestinal (Carbonell-Capella y col., 2014; Shahidi y Peng, 2018). La eficiencia de este proceso normalmente se expresa como un porcentaje de la cantidad del constituyente liberado en el tracto intestinal con respecto a su contenido total (Shahidi y Peng, 2018). Por otro lado, la biodisponibilidad corresponde a la acción biológica del compuesto de interés en el organismo (Carbonell-Capella y col., 2014; Gutiérrez-Grijalva y col., 2016; Shahidi y Peng, 2018). Por lo tanto, la biodisponibilidad implica la digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución tisular, y bioactividad de un compuesto de interés (Carbonell-Capella y col., 2014).

Para estudiar la bioaccesibilidad de un compuesto generalmente se utilizan métodos *in vitro* que simulan procesos de digestión, ya que son más rápidos, más económicos, menos laboriosos y no tiene restricciones éticas como sucede con los estudios *in vivo* (Minekus y col.,

2014). Estos métodos imitan las condiciones fisiológicas teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión, y concentraciones de sal, entre otros factores (Minekus y col., 2014; Shahidi y Peng, 2018). La mayoría de los protocolos abarca las primeras tres fases de la digestión: fase oral, gástrica e intestinal (considerando sólo el intestino delgado), pero también puede incluir estudios de fermentación intestinal, y la evaluación del transporte intestinal empleando células Caco-2 (Carbonell-Capella y col., 2014; Minekus y col., 2014; Shahidi y Peng, 2018).

La desventaja de la existencia de diversos modelos para desarrollar ensayos de digestión *in vitro* es que los resultados obtenidos son difíciles de comparar dado que las condiciones de los experimentos son diferentes (enzimas, concentraciones, pH, tiempos). Por este motivo, a partir de un consenso científico internacional, se desarrolló el primer protocolo estandarizado llamado INFOGEST (Minekus y col., 2014) donde se armonizaron las metodologías existentes y se realizaron validaciones con modelos de digestión *in vivo*. Por lo tanto, este protocolo representa una guía y además brinda recomendaciones para proceder en estos ensayos. Cabe aclarar que en el 2019 se hicieron algunos ajustes y se emitió el protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb y col., 2019). A continuación, se muestran las condiciones principales para desarrollar la digestión *in vitro* según el protocolo INFOGEST 2.0 (**Figura 1.9**).

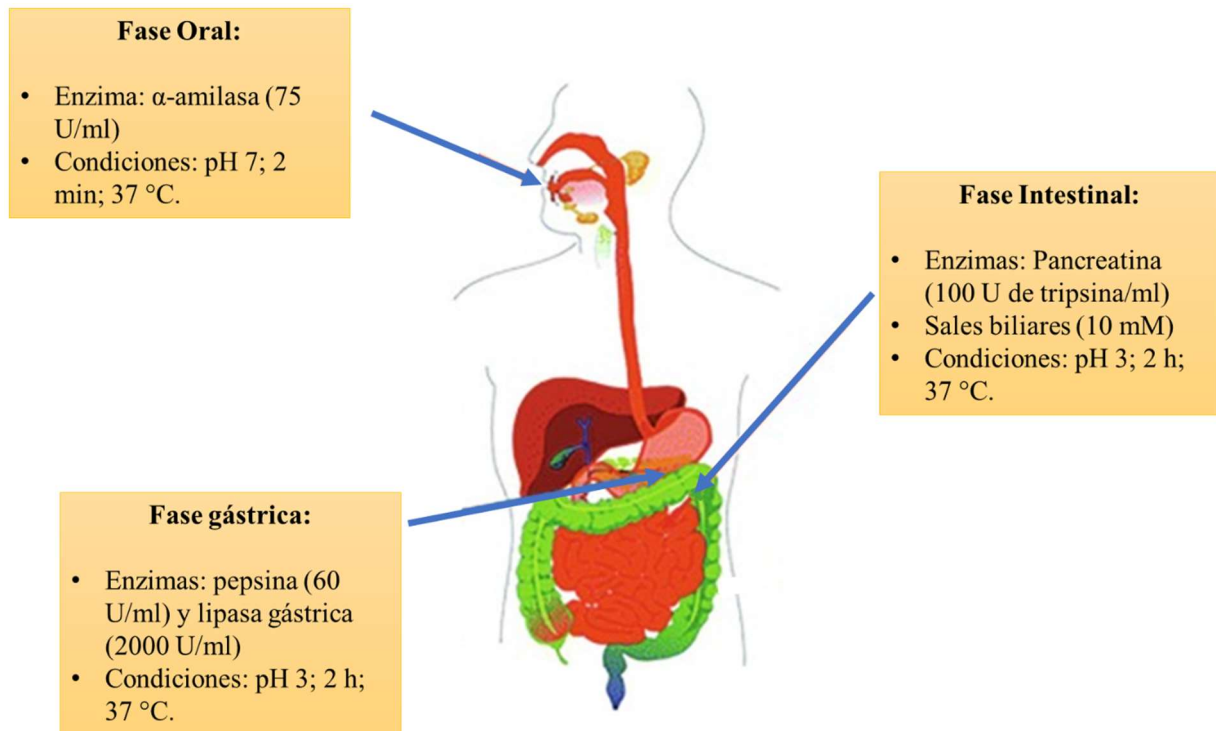


Figura 1.9: Fases de protocolo INFOGEST 2.0.

Para desarrollar el ensayo previamente se debe preparar la muestra. En el caso de que el alimento a digerir sea sólido, debe triturarse o disolverse con la solución del fluido salival (SFS). Esta solución se compone de diferentes sales en concentraciones apropiadas para imitar los fluidos salivales. En esta primera etapa la relación entre el alimento y las soluciones a agregar (SFS y enzima α -amilasa) es 1:1, el pH debe ser ajustado a 7 y el tiempo de incubación es de 2 min a 37 °C. En la modificación realizada en INFOGEST 2.0, si el alimento es líquido se puede prescindir de esta fase y comenzar con la siguiente.

El tratamiento continúa en la fase gástrica, agregando un fluido simulado gástrico (FSG), el cual imita las soluciones gástricas del estómago, y también se agregan dos enzimas, la pepsina que actuará sobre las proteínas y la lipasa gástrica que actuará sobre los lípidos. Cabe aclarar que esta última enzima fue parte de la modificación de INFOGEST 2.0. Las soluciones

para añadir deben agregarse en una proporción 1:1 respecto al contenido procedente de la fase oral y la muestra debe ajustarse a pH 3. El tiempo de incubación es de 2 h a 37 °C.

La última etapa es la fase intestinal. En esta etapa se añade una solución simulada intestinal (SSI), que consiste en una solución que imita los fluidos fisiológicos intestinales, y además se agregan sales biliares y pancreatina. Estas soluciones deben ser añadidas en una proporción 1:1 respecto al contenido anterior, además se debe ajustar el pH a 7 y se debe incubar durante 2 h a 37 °C.

Al finalizar, se realiza un proceso de inhibición para que las enzimas dejen de actuar y posteriormente se centrifuga para separar el extracto digerido, del precipitado. A partir del extracto se realizan las pruebas para evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos de interés y en cuanto al precipitado, este puede liofilizarse y también analizarse.

Cuando se trata de compuestos con actividad antioxidante, como los polifenoles, se ha observado que la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad se pueden afectar por varios factores. Por ejemplo, los polifenoles pueden mostrar menor bioaccesibilidad debido a la matriz del alimento, dado que podrían interaccionar con macronutrientes como la fibra, proteínas y polisacáridos en productos alimenticios procesados (Carbonell-Capella y col., 2014). También se ha observado que la polaridad del compuesto puede afectar en la absorción, como reportaron Chandrasekara y Shahidi (2012), quienes estudiaron flavonoides de granos de mijo y encontraron una mayor liberación de los compuestos hidrófobos que de los hidrofílicos. En este sentido, se ha considerado que la estructura de los polifenoles es más importante que la concentración en la que se encuentran (Cipolletti y col., 2018; Gulcin, 2020). Sin embargo, también se ha reportado que la digestión gastrointestinal puede modificar las estructuras de los compuestos fenólicos, lo cual conduce a mayor o menor bioactividad de los mismos (Kamiloglu y col., 2015; Shahidi y Peng, 2018).

1.2.7 Estudios sensoriales

Cuando se desarrolla un nuevo alimento, las metodologías instrumentales no son suficientes para caracterizar íntegramente al nuevo producto dado que no aportan información sobre la percepción y opinión de los potenciales consumidores respecto al producto. Por este motivo, cuando se diseña un nuevo producto, los estudios sensoriales se presentan como un gran complemento, ya que proporcionan información útil sobre su aceptabilidad por parte de los consumidores (Lawless y Heymann, 2010). Estos estudios logran disminuir la incertidumbre y los peligros en la toma de decisiones, garantizando mayor probabilidad de aceptación por parte de los consumidores, y por lo tanto mayor rentabilidad (Vivek y col., 2020)

La evaluación sensorial consiste en un conjunto de técnicas que permiten medir, evaluar e interpretar las respuestas sensoriales emitidas por personas sobre los alimentos (Lawless y Heymann, 2010). Estas respuestas son el reflejo de los estímulos percibidos por la vista, el olfato, el tacto, el gusto y el oído durante el consumo de un alimento (Mihafu y col., 2019; Vivek y col., 2020). En este punto, el cerebro cumple una función fundamental ya que integra el estímulo percibido con experiencias previas, organiza la información, interpreta las sensaciones y finalmente elabora una respuesta (Drake y col., 2009). A partir de los resultados obtenidos de estos estudios, es posible decidir si el producto es aceptable, o si es necesario realizar alguna modificación en su formulación. En este último caso, es necesario realizar una nueva evaluación del producto modificado (Mihafu y col., 2019).

Debido a que existen numerosos métodos sensoriales, el objetivo del estudio debe ser claro. Entre los métodos se pueden diferenciar los estudios cualitativos o cuantitativos. En general los métodos cualitativos son los más adecuados para aclarar problemas y conocer perspectivas de los consumidores, identificar oportunidades y generar ideas e hipótesis,

mientras que los cuantitativos dan información más concreta del producto desarrollado (Lawless y Heymann, 2010). A continuación, se describe cada tipo de ensayo.

1.2.7.1 Análisis sensorial cualitativo

En el proceso de diseño de nuevos alimentos es importante conocer cómo los consumidores perciben un producto y cuáles son sus opiniones sobre ese producto (Masson y col., 2016). Para obtener esta información se pueden realizar estudios exploratorios mediante técnicas cualitativas. Estas técnicas son menos estructuradas que las cuantitativas tradicionales, dado que en la medida que surge nueva información, el flujo y el contenido de la investigación puede cambiar (Lawless y Heymann, 2010). En cuanto a la forma de operar, puede ser a través de entrevistas en profundidad, o también mediante la utilización de metodologías como las técnicas proyectivas.

Gambaro (2018) define las técnicas proyectivas como aquellas que utilizan un estímulo no estructurado a fin de que los participantes proyecten sus creencias y sentimientos. De esta manera, la persona entrevistada cree que la información que está brindando es en función de otras personas y no de sí misma, llevándola a expresarse más allá de lo racional y permitir el acceso a actitudes y emociones subyacentes o profundas, no reveladas conscientemente o no aceptadas abiertamente.

Las técnicas proyectivas se pueden clasificar en cinco categorías: asociación, construcción, terminación, organización y expresiva (Gambaro, 2018). Las técnicas de *asociación* en general se basan en presentar un estímulo a un individuo y pedirle que responda con las primeras apreciaciones que se le ocurran, las cuales pueden ser las primeras palabras, imágenes o pensamientos. En esta categoría se encuentran las pruebas de: asociación de

palabras, personificación de marca, ordenamiento de fotos y mapeo (Ares y col., 2010; Gambaro, 2018).

En la categoría de *construcción* se presenta un estímulo a un individuo y se le solicita que construya una respuesta a través de una historia o imagen. Se considera que a través de una fotografía o caricatura un individuo podría manifestar sus propias actitudes y sentimientos (Mesías y Escribano, 2018; Gámbaro, 2018).

En la categoría de *terminación*, se solicita a un participante que complete una oración, una historia, un argumento o conversación incompleta las cuales pueden estar acompañadas de imágenes. Según Vidal y col. (2013) las imágenes proporcionan mejores resultados.

En las técnicas de *organización* de opciones, se les solicita a los encuestados que clasifiquen u ordenen determinados factores asociados a productos, marcas o servicios, y adicionalmente se les pide que expliquen el orden de importancia de dichos factores (Gambaro, 2018).

En las técnicas *expresivas* los participantes deben dramatizar, actuar, dibujar o pintar un concepto o una situación específica. En el campo de alimentos estas técnicas son poco utilizadas debido a su complejidad y dificultad de entendimiento, (Mesías y Escribano, 2018; Gámbaro, 2018).

De las categorías mencionadas, en el presente trabajo se empleó la asociación de palabras debido a que es una técnica muy utilizada para investigar las percepciones de los consumidores sobre los productos alimenticios (Ares y col., 2010; Guerrero y col., 2010, Masson y col., 2016). Dicha técnica se basa en la teoría de Ajzen y Fishbein's sobre la acción razonada (Gámbaro, 2018), la cual establece que la toma de decisiones está relacionada con diferentes variables como actitudes, creencias, convicciones, intenciones y comportamiento

(Reyes, 2007). De esta manera, se asume que las asociaciones que realizan los consumidores sobre un objeto en cuestión es la mejor forma de predecir el comportamiento del consumidor en relación con dicho objeto (Gámbaro, 2018). En esta prueba, se le solicita al consumidor que indique las primeras palabras que le vienen a la mente cuando se le presenta un producto. Generalmente el cuestionario se acompaña de frases como: por favor diga..., ¿qué piensa acerca de...?, escriba lo primero que viene a su mente cuando... (Mesías y Escribano, 2018). Para los productos alimenticios, se considera que las primeras asociaciones que realizan los consumidores son las más relevantes para obtener información acerca del proceso de selección y compra de los productos. La prueba de asociación de palabras requiere un número de participantes superior a 150 consumidores, los cuales se pueden reclutar utilizando cuestionarios online con instrucciones simples y claras, distribuidos por correo electrónico y/o redes sociales (Vidal y col., 2013; Li y col., 2018).

La prueba de asociación de palabras es considerada muy versátil dado que en la última década se ha aplicado para explicar la percepción de los consumidores con relación a una amplia variedad de productos, como pizzas, chocolates, mermeladas, yogures, cremas, carnes, entre otros (Gámbaro, 2018).

1.2.7.2 Análisis cuantitativo

El estudio sensorial cuantitativo es un método utilizado para medir, analizar e interpretar aquellas respuestas a los productos tal como se perciben a través del sentido de la vista, el olfato, el tacto, el gusto y el oído (Lawless y Heymann, 2010; Mihafu y col. 2019; Vivek y col., 2020). Lawless y Heymann, (2010) indicaron que involucra cuatro procesos:

- 1) Evaluación de las características organolépticas de un producto alimenticio mediante el uso de técnicas estrictamente estandarizadas: implica tener en cuenta las pautas existentes para la preparación y servicio de muestras a fin de minimizar los factores de sesgo.
- 2) Recopilación de datos numéricos: los datos numéricos se recopilan a través de las mediciones. Estas mediciones consisten en técnicas de investigación del comportamiento a fin de observar y cuantificar las respuestas humanas.
- 3) Análisis de datos: los datos obtenidos pueden ser muy variables dado que las respuestas humanas pueden estar influidas por el estado de ánimo, la motivación de los participantes, su historia pasada y familiaridad con productos similares. Por este motivo, los datos se suelen analizar mediante evaluaciones estadísticas.
- 4) Interpretación de resultados: la información estadística obtenida sólo será útil si los resultados se interpretan en el contexto de hipótesis, conocimientos previos, e implicaciones para las decisiones y acciones a ser tomadas. Las conclusiones deben ser razonables, basadas en datos, análisis y resultados. En este contexto, deben considerarse las limitaciones del experimento, y los antecedentes y marco contextual del estudio.

Los métodos de medición sensorial se han clasificado en tres grandes categorías básicas: pruebas discriminativas, descriptivas y afectivas. La elección del tipo de prueba está relacionada íntimamente con los objetivos del estudio y la disponibilidad tanto de personal como de material a utilizar.

Las pruebas *discriminativas* se diseñan para determinar si existen diferencias entre productos alimenticios. Estas pruebas pueden utilizarse para distintos propósitos como, por ejemplo, determinar las diferencias o similitudes de una muestra, o determinar el grado de diferencia o similitud de dicha muestra. Para realizar estas pruebas, se recomiendan entre 10 y

50 panelistas. Las pruebas discriminatorias incluyen la prueba triangular, la prueba dúo-trío y la prueba de comparación por pares (Mihafu y col., 2019).

En cuanto a las pruebas *descriptivas*, estas permiten realizar una descripción completa de los alimentos a través de un panel entrenado. La información reunida puede relacionarse con medidas instrumentales (Lawless y Heymann, 2010). Este tipo de pruebas proporcionan información sobre las características del producto y las posibles variaciones que deban realizarse a la formulación. Normalmente se realiza con un panel sensorial integrado por 6 a 15 personas las cuales son meticulosamente seleccionadas y capacitadas. Estas pruebas incluyen análisis descriptivo cuantitativo, perfil de flavor y perfil de textura, entre otras (Mihafu y col., 2019).

Finalmente, las pruebas *afectivas* son las que permiten evaluar la respuesta de consumidores reales o potenciales de un determinado alimento. Son pruebas muy útiles para evaluar la aceptabilidad o preferencia de productos alimenticio. Se utilizan paneles sensoriales integrados por varias personas, considerándose adecuados entre 80-150. Dichos panelistas no son capacitados, sino que se seleccionan en función del producto, nivel económico social y área geográfica (Lawless y Heymann, 2010; Mihafu y col., 2019).

Las láminas de fruta desarrolladas en el presente trabajo se analizaron mediante paneles sensoriales de gran número de personas sin entrenamiento, dado que de esta manera fue posible recabar amplia información respecto a la aceptabilidad e intensidad de los atributos, y de la aceptabilidad global de la golosina.

1.3 Introducción sección II: Desarrollo de un ingrediente funcional a base de ácido fólico y proteínas lácteas

1.3.1 Vitaminas

1.3.1.1 Generalidades

Las vitaminas son micronutrientes que actúan en el control de reacciones del anabolismo y catabolismo de hidratos de carbono, de proteínas y de grasas, en las cuales se genera energía y se propicia la síntesis de otros compuestos (Badui Dergal, 2006). La deficiencia de estos micronutrientes ocasiona enfermedades nutricionales que pueden ser mortales (Pita Martín de Portela, 1995; Badui Dergal, 2006; Awuchi y col., 2020). El descubrimiento de estos micronutrientes se remonta a principios del siglo XX, cuando el bioquímico Casimir Funk (1884-1967) aisló la primera sustancia que consideró esencial para evitar la enfermedad de beriberi: la tiamina. El bioquímico Funk se basó en los estudios previos realizados por el bioquímico Sir Frederick Hopkins (1861-1967), quién había observado que el crecimiento de un grupo de ratas se detenía cuando eran alimentadas con sustancias puras (consideradas nutrientes esenciales en ese tiempo), y se reestablecía cuando se les suministraba leche. Este hallazgo, junto con otros estudios, demostraron la existencia de un conjunto de sustancias orgánicas indispensables para el desarrollo animal, las cuales fueron denominadas “factores accesorios para la alimentación”. En 1911, el bioquímico Funk estudió a un grupo de marineros japoneses debido a que pasaban períodos largos encerrados en un barco manteniendo la dieta y las actividades similares, y encontró que la cascarilla del arroz contenía una sustancia que prevenía el beriberi. Años posteriores esta sustancia sería denominada “vitamina B1”. Fue entonces Funk, quien propuso que estas sustancias necesarias para el desarrollo y para prevenir enfermedades, sean llamadas *vitaminas* (Vita: vida y amina: Sustancia que contiene amoníaco)

(Palacios Sánchez, 2013). A lo largo del siglo XX se fueron desarrollando diferentes investigaciones que sumaron distintas sustancias al grupo de las vitaminas.

1.3.1.2 Clasificación

Desde los inicios, las vitaminas se han clasificado en hidrosolubles y liposolubles. Esta división se mantiene vigente debido a que facilita el conocimiento de su distribución en los alimentos (Awuchi y col., 2020).

- Vitaminas hidrosolubles: En este grupo se encuentran la tiamina (Vit. B1), la riboflavina (Vit. B2), la piridoxina (Vit. B6), el ácido fólico (Vit. B9), la cobalamina (Vit. B12), la niacina, la biotina, y el ácido ascórbico (Vit. C). A excepción de la vitamina C, estas vitaminas se transforman en una o más formas activas (coenzimas) y luego forman holoenzimas con proteínas específicas. Por otro lado, la vitamina C tiene una participación relevante en la síntesis de colágeno y también participa en sistemas enzimáticos, pero de manera indirecta. Las vitaminas de este grupo se encuentran en alimentos de origen vegetal. Luego de su ingesta, son hidrolizadas y absorbidas por difusión simple o por transporte activo, o como es el caso de la Vit. B12 que se absorbe a través de un proceso complejo en el que participa un transporte denominado “factor intrínseco”. La pérdida de estas vitaminas en los alimentos es muy común debido a la lixiviación.
- Vitaminas liposolubles: En este grupo se encuentran las vitaminas A, E, D y K. Estas sustancias además de ser liposolubles se caracterizan por presentar en su estructura química un resto isopreno 2-metil-4-butadieno. Las funciones de estas vitaminas se relacionan con la síntesis de estructuras tisulares. Las vitaminas A y E están involucradas en la protección de las membranas celulares, y las vitaminas D y K en la síntesis de

proteínas específicas relacionadas al metabolismo de calcio y fósforo. Este grupo de vitaminas se encuentra frecuentemente en alimentos de origen animal, aunque también es posible encontrar precursores en vegetales, como es el caso de la vitamina A que sólo se halla en alimentos cárnicos, pero presenta a su precursor (β -caroteno) en diferentes vegetales como en zanahorias y calabazas. A diferencia de las vitaminas del grupo hidrosoluble, este grupo de compuestos es absorbido y retenido en el tejido adiposo, por lo que su ingestión no necesita ocurrir de manera sistemática.

1.3.1.3 Requerimientos diarios

Las consecuencias sufridas por la carencia de las vitaminas son conocidas desde tiempos remotos, en las antiguas civilizaciones de Roma, Egipto y Grecia, donde las poblaciones padecían raquitismo, escorbuto y ceguera nocturna. Si bien estas poblaciones no sabían qué se debía a esta carencia, hoy en día se sabe que estos problemas están directamente relacionados a la falta de vitaminas (Badui Dergal, 2006). Por ejemplo, la deficiencia de vitamina D se relaciona con el raquitismo, la falta de vitamina C con el escorbuto y la ceguera nocturna se asocia a la deficiencia de vitamina A.

Las deficiencias de vitaminas pueden ser primarias o secundarias. La deficiencia primaria ocurre cuando el ser humano/organismo no obtiene suficiente vitamina de los alimentos. Por otro lado, la deficiencia secundaria puede ser el resultado de un trastorno subyacente que limita o impide la absorción o el uso de vitaminas, debido a factores del estilo de vida, como el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo o el uso de medicamentos que interfieren con la absorción (Awuchi y col., 2020).

Por definición, las ingestas diarias recomendadas (IDR) indican la cantidad de un nutriente esencial, en este caso de una vitamina, que debe ser consumida para satisfacer las necesidades de la mayoría de los individuos de una población (García Gabarra, 2006). Estos requerimientos surgen de estudios epidemiológicos y estudios clínicos. Los estudios epidemiológicos ofrecen documentación para relacionar la ingesta diaria de una vitamina (establecida en base a encuestas alimentarias) con el estado nutricional respecto a dicha vitamina, en una determinada población. Los resultados obtenidos luego se comparan con los que corresponden a poblaciones cuyas ingestas son también conocidas y que no manifiestan signos de deterioro nutricional. Por otro lado, los estudios clínicos brindan información acerca de posibles cambios en los pacientes debido a una ingesta inadecuada de vitaminas, sin embargo, estos resultados son relativos debido a que la carencia de la vitamina puede deberse a otros factores no relacionados con la alimentación (Pita Martín de Portela, 1995). Estas investigaciones son realizadas por Organismos Internacionales como FAO (Food Agricultural Organization) y luego son adoptadas por diferentes países, o por Comités Oficiales propios de cada país como es el caso de Canadá, el Reino Unido y la Comunidad Europea.

En lo que respecta a las vitaminas, los requerimientos diarios pueden variar entre mujeres y hombres, también con la edad, y con estados particulares como en el caso de mujeres embarazadas o en el periodo de lactancia. La **Tabla 1.6** muestra las IDR descriptas en el CAA (Art. 1387 – Res. Conj. SPReI N°118/2008 y SAGPyA N° 474/2008).

Tabla 1.6: Ingesta diaria recomendada para hombres, mujeres y mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

Vitamina	Unidades	Hombres	Mujeres	Embarazo	Lactancia
A	µg	600	500*	800	850
C	mg	45	45	55	75
D	µg	5,0**	5,0**	5,0	5,0
E	mg	10	7,5	7,5	7,5
K	µg	65	55	55	55
B1	mg	1,2	1,1	1,4	1,5
B6	mg	1,3	1,1	1,9	2,0
B9	µg	240	240	360	300
B12	µg	2,4	2,4	2,6	2,8

*entre 19 y 50 años, mayores de 50 años la IDR es de 600 µg

** entre 19 y 50 años. Para edades entre 51 y 65 la IDR es de 10 µg y para mayores de 65 es de 15 µg.

1.3.2 Vitamina B9: Folatos naturales y ácido fólico

1.3.2.1 Generalidades

Los folatos, también llamados folacina (del latín, folium, hoja), son un grupo de compuestos que pertenecen a las vitaminas del grupo B. Entre ellos se diferencian en el número de residuos de ácido glutámico que contienen (Badui Dergal, 2006). Esta vitamina fue descubierta por la médica Lucy Willis (1888-1964) cuando estudiaba la anemia macrocítica que padecían las mujeres de la India. Sus pruebas consistieron en alimentar inicialmente ratas embarazadas y posteriormente monos, con la misma dieta que adquirían las mujeres embarazadas en estudio. Con dicha dieta observó que los animales perdían los embarazos, pero al suplementar su dieta con extracto de levadura mostraron una importante mejoría. Aunque no pudo aislar la sustancia responsable, la denominó Factor M (M de Mokey, mono) que

posteriormente sería llamada “Factor Willis”. Fue recién en el año 1941 que se aisló el primer folato de una espinaca (Palacios Sánchez, 2013; Pérez, 2016).

Las fuentes de esta vitamina son los vegetales de hoja de color verde, el hígado y el huevo, entre otros. No obstante, durante la cocción, la exposición a la luz y diversos factores del procesado conllevan a que esta vitamina se deteriore fácilmente (Frommherz y col., 2014; Jastrebova y col., 2013; Ruiz-Rico y col., 2017). El ácido fólico es un folato sintético que se caracteriza por ser más estable que los naturales y por tal motivo se lo utiliza para fortificar los alimentos (Frommherz y col., 2014). Es un compuesto cristalino amarillo, cuyo peso molecular es 441,4 (Tuszynska, 2012). Está formado por un doble anillo pterínico con un sustituyente en la posición 6. El sustituyente consta de dos partes: una molécula de ácido p-aminobenzoico y una molécula de ácido glutámico. La diferencia con los demás folatos es que estas moléculas pueden contener hasta nueve residuos de ácido glutámico y en el caso del ácido fólico sólo uno; en consecuencia, existen hasta 100 formas distintas de esta vitamina, pero menos de 50 tipos se encuentran en tejidos vegetales y animales (Gregory, 1989). Las dos porciones del sustituyente (ácido p-aminobenzoico y ácido glutámico) están unidas entre sí por una unión peptídica (función amida), en la cual la primera aporta el carboxilo y la segunda la amina. El ácido p-aminobenzoico, por su parte, está ligado al doble anillo pterínico mediante un puente metilénico unido a su grupo amino (Badui Dergal, 2006; Thomas, 2001). La **Figura 1.10** muestra la estructura química que presenta el ácido fólico.

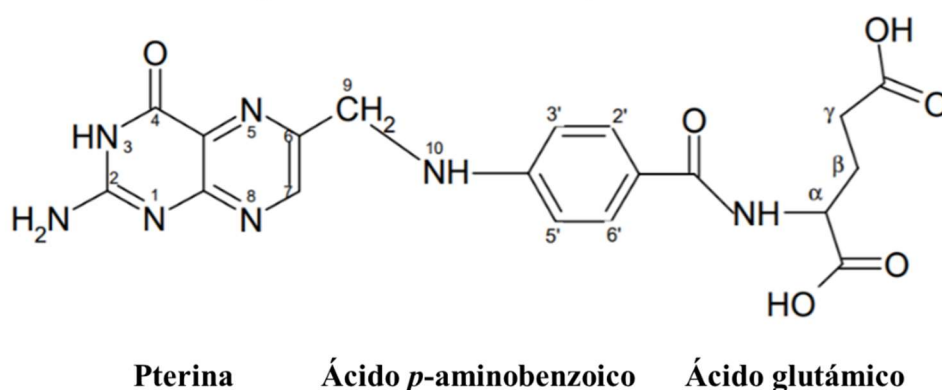


Figura 1.10: Estructura de la molécula de ácido fólico.

1.3.2.2 Características físicoquímicas

En la naturaleza, la fracción pterina de los folatos puede presentarse con tres estados de oxidación: completamente oxidado, o como formas reducidas de 7,8 dihidrofolato (H_2 folato), o 5,6,7,8 tetrahidrofolatos (H_4 folato). Este último compuesto es la forma activa (coenzima activa) que adoptan los folatos en el organismo para desarrollar sus funciones. De este compuesto es importante la orientación estereoquímica, ya que se ha observado que sólo el isómero de folato 6S tiene actividad vitamínica (Gregory, 1989).

Los folatos se caracterizan por ser moléculas ionogénicas y anfóteras. Los grupos ionogénicos más importantes del tetrahidrofolato (en el rango de pH de alimentos y sistemas biológicos) son el grupo N-5 y el glutamatocarboxilo, cuyos pK son 4,8 y 3,5; respectivamente. Los folatos en general alcanzan una solubilidad mínima a pH ácido, predominando las formas monocatiónicas y neutras (pH 2 a 4). Al incrementar el pH, la solubilidad aumenta, predominando las formas aniónicas (Gregory, 1989). Este comportamiento también se observa en la molécula de ácido fólico, diferenciándose en que la forma catiónica puede encontrarse como monocatiónica o bicatiónica (**Figura 1.11**) (Poe, 1977; Tyagi y Penzkofer, 2010; Tuszynska, 2012).

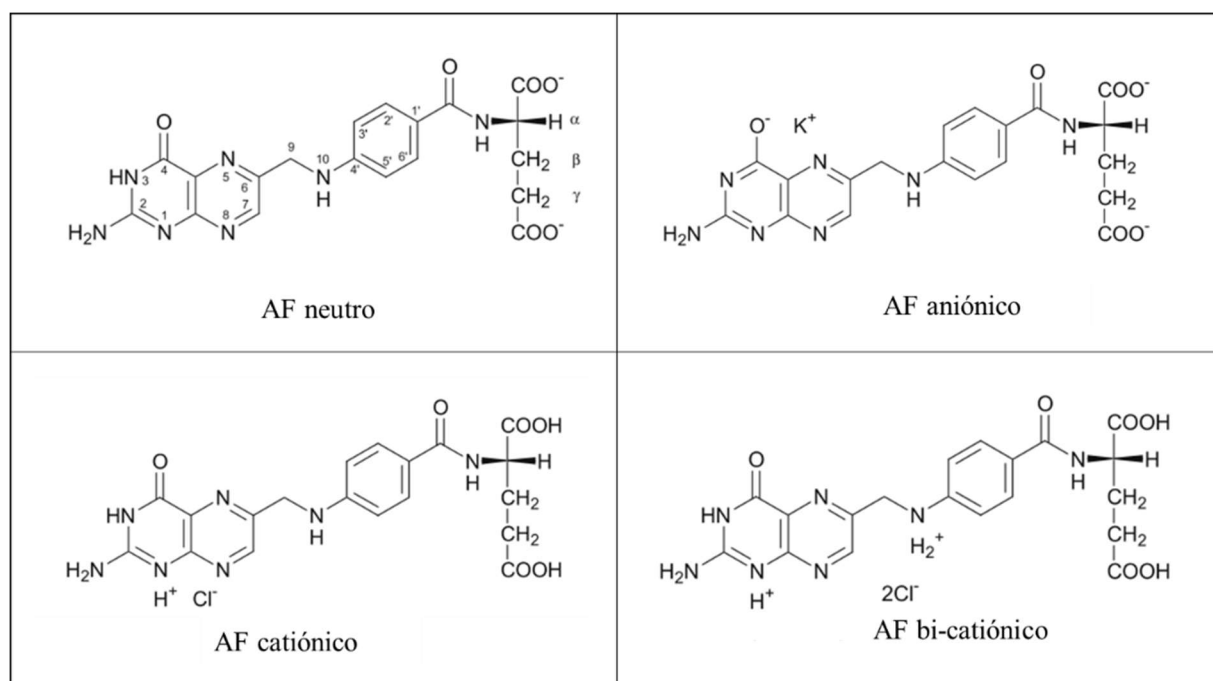


Figura 1.11: Disociación iónica del AF. Adaptada de Tyagi y Penzkofer, (2010).

Poe (1977), estudió las constantes de disociación del ácido fólico y determinó que cuando el ácido fólico pasa de estado neutro a monocatiónico, el pK corresponde a 2,35, el cuál es similar al de la pterina (2,20) y se relaciona a la protonación del N₁. Cuando pasa de su estado monocatiónico a bicatiónico el pK es de 0,20, y está dado por la protonación del N₁₀. Los valores de pK debidos a la protonación de los grupos α -carboxilo y γ -carboxilo no se han determinado, pero se espera que sean similares a los valores de pK del ácido glutámico libre en solución acuosa, 2,1 y 4,07, respectivamente (Poe, 1977; Tuszynska, 2012). En cuanto al cambio de ionización de estado neutro a aniónico del ácido fólico, el pK es de 8,35, y se lo asigna a la disociación de la amida, donde los dos grupos carboxílicos le confieren a la molécula dos cargas negativas adicionales (Poe, 1977; Thomas, 2001). Estas cargas permiten que el ácido fólico presente sea muy soluble en medio básico. Younis y col. (2009) estudiaron la solubilidad del ácido fólico a diferentes pH, y encontraron que la solubilidad a pH 7 es 183

veces mayor que a pH 1. La **Figura 1.12** muestra la curva de solubilidad del ácido fólico en función de distintos pH (Younis y col., 2009).

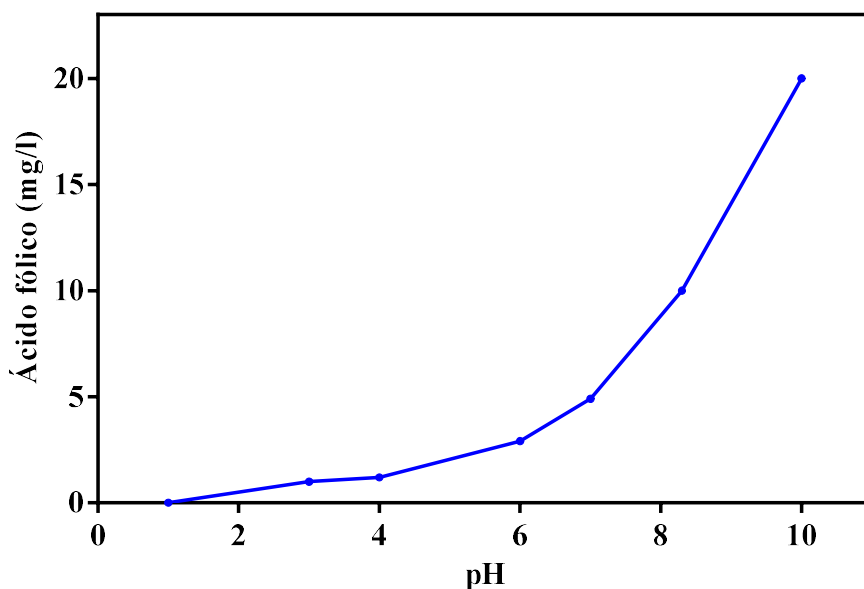


Figura 1.12: Curva de solubilidad del ácido fólico en función del pH a 37 °C.

Se puede observar que a partir de pH 4, la curva de solubilidad comienza a tener un crecimiento exponencial y por debajo de este valor la solubilidad es muy baja. Este efecto está relacionado con el autoensamblaje del ácido fólico. Cuando el ácido fólico se encuentra en condiciones ácidas la repulsión electrostática entre moléculas de ácido fólico se reduce, produciendo que las moléculas comiencen a atraerse y por lo tanto las moléculas de ácido fólico se asocian entre sí. El resultado es la formación por autoensamblaje o apilamiento de cristales líquidos polimorfos, con estructuras columnares en forma hexagonal (**Figura 1.13**) (Ciuchi y col.,1994).

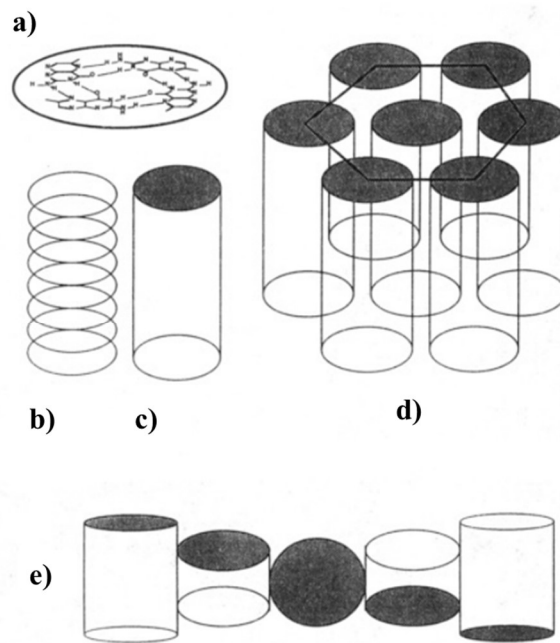


Figura 1.13: Modelo de formación de las mesofases columnares a partir del AF. a) Tetrámeros del residuo de AF; b) y c) acumulación y formación columnar; d) y e) autoensamblaje de mesofase hexagonal. Adaptado de Ciuchi y col. (1994).

1.3.2.3 Estabilidad

La estabilidad de los folatos en los alimentos depende de muchos factores: temperatura, oxígeno, luz y la composición en general del alimento en el cual que se encuentra (Czarnowska y Gujska, 2012; Frommherz y col., 2014, Ruiz-Rico y col. 2017). En los alimentos frescos, aproximadamente un 80% de los folatos naturales se presentan en formas de poliglutamilo, es decir, presentan una cadena lateral con varios restos de glutamato (Fennema, 2000), pero en el almacenamiento pueden descomponerse lentamente en monoglutamatos y oxidarse a folatos biológicamente menos disponibles (Berry Ottaway, 2010). Por este motivo, para fortificar los alimentos se utiliza el ácido fólico comercial (Gregory, 1989; Fennema, 2000; Tuszynska, 2012; Frommherz y col., 2014; Mohammed y col., 2021) y desde el 2005 también se encuentra disponible comercialmente el ácido 5-metiltetrafolico (Berry Ottaway, 2010).

En cuanto a los efectos de la luz, se ha encontrado que la estabilidad está relacionada con el pH. En un experimento donde se irradiaron soluciones de ácido fólico a diferentes pH con luz UV (88,7% de su energía de radiación a 254 nm) se encontró que la tasa de fotólisis fue menor a pH 6-7 que a valores de pH ácidos (Akhtar y col., 1999). Por otro lado, se ha reportado que los productos de fotólisis del ácido fólico son ácido p-aminobenzoil glutámico y ácido 6-formilpterina, que luego podrían ser oxidados a ácido pterina 6-carboxílico (**Figura 1.14**) (Song y Hwang, 2007; Mohammed y col., 2021).

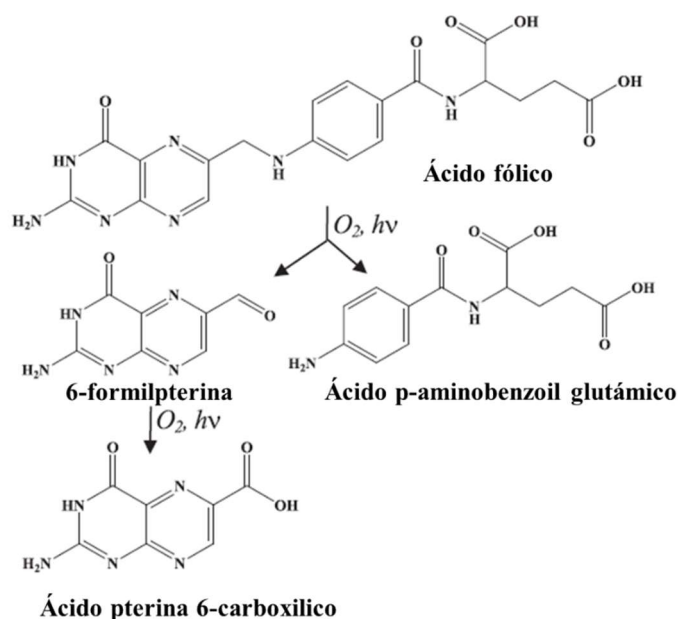


Figura 1.14: Mecanismo de fotodegradación del ácido fólico bajo radiación UV.

La concentración de oxígeno también influye en la estabilidad de los folatos. Gregory (1989), indicó que el principal producto de oxidación del H₄folato es ácido p-aminobenzoil glutámico producido por la escisión de la molécula, y en el caso de 5-metil-tetrahidrofolato al oxidarse forma dihidrofolato 5,6-H₂folato y si la oxidación es más severa el compuesto que se

forma es 4 α -hidroxi-5-metil-H₄folato, en ambos casos se pierde la actividad biológica de la vitamina porque los compuestos no pueden ser metabolizados.

Por otro lado, se ha reportado que en condiciones anaeróbicas la estabilidad oxidativa puede mejorar, sobre todo cuando se lo expone frente a compuestos como ascorbato, hierro ferroso y azúcares reductores. Estas sustancias funcionan reduciendo la concentración del oxígeno disuelto mediante sus propias reacciones oxidativas. Estos hallazgos indican que los alimentos complejos pueden contener compuestos que influyen en la estabilidad del folato, al consumir oxígeno o actuando como agentes reductores, o ambos (Fennema, 2000).

En cuanto a la estabilidad de los folatos durante el procesamiento de alimentos, se ha visto que es muy variable. En el procesamiento de vegetales se observaron pérdidas de hasta un 70% (Berry Ottaway, 2010; Tuszynska, 2012). Esto se debe en parte a las pérdidas por lixiviación debido a la alta solubilidad que presentan los folatos en agua y en parte a las temperaturas a las que se realiza la cocción (Fennema, 2000; Berry Ottaway, 2010; Tuszynska, 2012; Czarnowska y Gujska, 2012). En este contexto, Gregory (1989) indicó que la oxidación es mayor cuando los alimentos que presentan folatos son expuestos a altas temperaturas en medios acuosos, debido a la difusión del oxígeno. La **Tabla 1.7** muestra el efecto de la cocción y la lixiviación sobre el contenido de ácido fólico en la cocción de algunos vegetales (Fennema, 2000).

En otros alimentos como los lácteos se observó que las pérdidas no son tan importantes. Durante la pasteurización de la leche por métodos convencionales y por tratamientos UHT las pérdidas son menores a 20% (Berry Ottaway, 2010; Gregory, 1989) y en procesos de esterilización de 30% (Berry Ottaway, 2010). Por otro lado, en huevos duros las pérdidas alcanzan al 10%, mientras que si son cocidos por otras formas (frito, escaldado, revuelto) alcanza pérdidas de 30-35% (Berry Ottaway, 2010).

Tabla 1.7: Efecto de la cocción y la lixiviación sobre el contenido de folatos en la cocción de vegetales. Valores expresados en μg folatos/g de muestra.

Vegetales	Crudos	Cocidos	Folatos en agua de cocción (lixiviación)
Espárragos	175 ± 25	146 ± 16	39 ± 10
Brócoli	169 ± 24	65 ± 7	116 ± 35
Coles de brucella	88 ± 15	16 ± 4	17 ± 4
Repollo	30 ± 12	16 ± 8	17 ± 4
Coliflor	56 ± 18	42 ± 7	47 ± 20
Espinaca	143 ± 50	31 ± 10	92 ± 12

En cuanto a las pérdidas durante el almacenamiento, Frommherz y col. (2014) estudiaron el almacenamiento de jugos de naranja fortificados con ácido fólico durante 12 meses. Estos autores reportaron que al cabo de un mes tuvieron la mayor tasa de degradación del ácido fólico debido al oxígeno que queda en el espacio cabeza en el envasado. Por otro lado, al cabo de 12 meses la concentración de ácido fólico pasó de ser $186 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ a $98 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ en un envase oscuro y en un envase transparente $92 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, con lo cual las pérdidas fueron prácticamente del 50%. Estos resultados implican que debido a las pérdidas es necesario agregar un 50% más de esta vitamina, sin embargo, esto puede ser contraproducente a nivel económico.

En este sentido, con el fin de cumplimentar con las dosis recomendadas de esta vitamina, diferentes investigadores han buscado la manera de asegurar la estabilidad y viabilidad del ácido fólico mediante encapsulación y el complejamiento con proteínas y polisacáridos. Por ejemplo, Aceituno-Medina y col. (2015), encapsularon ácido fólico utilizando una mezcla de proteínas de amaranto y pululano (80:20). Estos autores reportaron que no observaron degradación del ácido fólico luego de exponer las muestras frente a luz UV

por dos horas, mientras que en los controles sin encapsular sí se observaron pérdidas. En otro estudio se desarrollaron microcápsulas de AF utilizando sporopollenina *Lycopodium clavatum* L. y también se informó que de esta manera la vitamina adquirió mayor fotoestabilidad cuando fue expuesta frente a luz UV (Mohammed y col., 2021). Švarca y col. (2020) encapsularon 5-metiltetrahidrofolato mediante electropulverización, utilizando como material de pared una combinación de jarabe de glucosa y pululano, y encontraron que luego de 21 días de almacenamiento el folato encapsulado presentó un porcentaje de recuperación de 91% mientras que el folato libre obtuvo un 61%. Estos ejemplos demuestran las diversas maneras que existen para lograr proteger el ácido fólico, lo importante es encontrar una metodología que se ajuste a los objetivos de estudio, dado que también se han reportado inconvenientes en algunas experiencias, como es el caso de Assadpour y col. (2016) que desarrollaron emulsiones de ácido fólico y proteínas lácteas y tras deshidratarlas mediante secado por atomización, observaron que la técnica estaba limitada por la concentración de ácido fólico, dado que a altas concentraciones la vitamina cristalizaba.

1.3.2.4 Acceso del ácido fólico al organismo

La vitamina B9 se adquiere a través de la dieta, y en menor medida por los microorganismos del tubo digestivo (Thomas, 2001). La mayoría de los alimentos contiene folatos en forma de poliglutamatos, pero los folatos se absorben en el yeyuno sólo en la forma de monoglutamatos. Por este motivo en las células epiteliales del intestino (mucosa yeyunal) se encuentran enzimas conjugasas responsables de hidrolizar estas cadenas y transformar los folatos poliglutamatos en monoglutamato (Pita Martín de Portela, 1995; Thomas, 2001; Tuszyńska, 2012). Una vez que se genera esta molécula, la absorción se realiza por un proceso activo, estimulado por glucosa y mediante una proteína de unión de la membrana. Si la vitamina

se encuentre en una concentración alta en el intestino también se absorbe por difusión simple. En el interior de la célula de la mucosa intestinal la molécula se convierte en tetrahidrofolato y este a su vez en N⁵ metiltetrahidrofolato para ser transportada por el plasma mediante una o dos globulinas, y luego es captada por todos los tejidos siendo el principal el tejido hepático, donde puede almacenarse como tal, o interconvertirse nuevamente a tetrahidrofolato (Pita Martín de Portela, 1995; Thomas, 2001).

1.3.2.5 Reacciones metabólicas del ácido fólico

El tetrahidrofolato actúa como coenzima y transporta uno o dos fragmentos carbonados en las posiciones N-5, N-10, o en ambas, generándose así diversos derivados del tetrahidrofolato (Thomas, 2001). Todos los compuestos generados son metabólicamente interconvertibles entre sí. La función de estos compuestos es ser dadores de unidades monocarbonadas en las siguientes reacciones:

- a) actúan como fuente de C en la biosíntesis de purinas y de timina a partir de uracilo. Ambas reacciones son muy importantes para la formación de ADN y ARN, siendo esto relevante en la división y crecimiento celular.
- b) Participan de la transformación de homocisteína en metionina.
- c) Participan en el metabolismo de histidina: la histidina se escinde y genera ácido formimino glutámico el cual cede el grupo formimino al tetrahidrofolato.

1.3.2.6 Déficit de ácido fólico

Existen diversas causas que pueden ocasionar déficit de esta vitamina, entre las principales se encuentran la mala alimentación, patologías a nivel intestinal que ocasionen mala absorción de la vitamina, incremento de la actividad metabólica como sucede en el embarazo o durante la lactancia. El inconveniente de esto es que repercute directamente sobre las rutas metabólicas anteriormente descritas, siendo la más problemática aquella en la que participa en la síntesis de los nucleótidos llevando a que las células no puedan completar su proceso de mitosis. Las células más afectadas son los leucocitos, las células epiteliales del estómago, del intestino, la vagina y el cervix uterino (Suarez de Ronderos, 2003). Esto tiene una gran implicancia en la embriogénesis humana y en la carcinogénesis. Es así como su deficiencia ha sido relacionada a diversas problemáticas tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon, deterioro neurocognitivo, y defectos en el tubo neural en el desarrollo de embriones (Scholl y Johnson, 2000; Assanelli y col., 2004; Cardona y Cabrera, 2010; Pérez y col., 2014; Ruiz-Rico y col., 2017, Mohammed y col., 2021). Por otro lado, la anemia megaloblástica es otra de las afecciones conocidas debido a esta problemática. En esta patología, se generan cambios característicos en los eritrocitos y leucocitos, lo cual conduce a diferentes problemas tales como baja fertilidad, esterilidad, o anomalías en el desarrollo del feto o la placenta. En el caso de las anomalías en el feto, son consecuencia de la falta de ácido fólico para el desarrollo del sistema nervioso central del embrión. Durante las primeras semanas el embrión desarrolla el cerebro y el resto del sistema nervioso periférico, incluyendo el cierre del tubo neural, donde se encuentra la médula espinal. Si el tubo neural no se cierra completamente ocurren malformaciones, siendo las más frecuentes: la anencefalia, producida por un desarrollo incompleto del cerebro y los huesos craneales (**Figura 1.15a**), y la espina bífida, la cual ocurre debido a que la médula espinal no logra desarrollarse o cerrarse correctamente (**Figura 1.15b**).



Figura 1.15. Defectos del tubo neural: a) anencefalia, b) espina bífida.

1.3.2.7 Marco legal e Ingesta Diaria Recomendada (IDR)

A nivel internacional, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación recomienda un consumo diario de 400 μg de AF para personas con buen estado de salud. Sin embargo, en el caso de personas en tratamientos de anemia nutricional macrocítica, megaloblástica o para prevenir los defectos en el desarrollo del tubo neural en mujeres embarazadas, la dosis diaria que se recomienda es de 5 a 10 mg. En este sentido, el parlamento europeo a través de su resolución CE 1925/2006 aprobó el enriquecimiento de alimentos con ácido fólico entre otras vitaminas. Cabe destacar que esta resolución no especifica la cantidad máxima de fortificación. La sociedad Alemana de Química Alimentaria recomienda una tolerancia máxima de $\pm 30\%$ de ácido fólico respecto de lo que indica la etiqueta (Frommherz y col., 2014).

Si bien existen normativas claras, algunos estudios médico-estadísticos han informado que sólo un 10% de las mujeres ingieren la cantidad óptima de ácido fólico a través de la dieta

(Partearroyo y col., 2017). Muchos expertos sostienen que la prevención de defectos del tubo neural en fetos sólo es posible si se garantiza un nivel adecuado de ácido fólico en las mujeres con potencial reproductivo, el cual se podría lograr mediante la fortificación de alimentos. Por lo tanto, tal fortificación debe ser parte del cuidado prenatal integral (Calvo y Biglieri, 2008; Crider y col., 2011).

En Argentina, en el año 2002 se promulgó la Ley Nacional N°25630, la cual es una normativa sobre la anemia y la prevención de enfermedades del tubo neural. Esta normativa recomienda un consumo diario de 400 µg de ácido fólico, y para alcanzar a toda la población se implementó la fortificación de harinas. El aumento de los niveles de folato por medio de la fortificación de los alimentos es una estrategia importante de salud pública para llegar a un extenso número de miembros de la población destinataria. En América, 19 países han fortificado la harina de trigo con ácido fólico, además de hierro (Sociedad Argentina de Pediatría, 2008).

1.3.3 Proteínas del suero lácteo

El CAA en el artículo 582 (Res 879, 5.6.85) denomina a los “sueros de lechería” como los líquidos formados por parte de los componentes de la leche, que resultan de diversos procesos de elaboración. Por mucho tiempo se consideró un desperdicio y se descartó sin ningún tratamiento previo, generando un gran problema ambiental (Musset y Castells, 2017). No obstante, a mitad del siglo XX, los avances tecnológicos permitieron convertir a este desperdicio en una materia prima.

El suero lácteo presenta aproximadamente el 50% de los nutrientes de la leche original y, además, las proteínas que contiene representan alrededor del 20% del total que contiene la

leche (Al-Jasaar y col., 2020). Las proteínas de suero tienen una estructura globular y esencialmente incluyen β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, inmunoglobulinas de proteínas sanguíneas y albumina de suero bovino (Donato y Guyomarc'h, 2009), encontrándose en mayor proporción (80%) β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina (Carter y Drake, 2018; Halabi y col., 2020). No obstante, estas proteínas presentan distintas propiedades de gran interés para su aprovechamiento por la industria alimentaria. En la **Tabla 1.8** se muestran algunas proteínas del suero lácteo y sus propiedades.

Tabla 1.8: Proteínas del suero lácteo, propiedades y sus posibles usos (Tamime, 2013).

Proteína	Propiedades	Usos
β -lactoglobulina,	Estabilizante de espumas	Confitería, panadería, embutidos
α -lactoalbúmina	Gelificante	Fórmulas infantiles, productos nutracéuticos
Seroalbúmina bovina	Espumante	Productos como merengue
Inmunoglobulinas	Emulsionante Enlaces con lípidos Afinidad con receptores glicosilados	Alimentos funcionales
Lactoferrina	Actividad microbiana	Farmacéutica
Péptidos bioactivos	Actividad antihipertensiva	Suplementos

La mayoría de los componentes del suero lácteo se deshidratan para convertirlos en productos en polvo (Foegeding y col., 2011). Los principales ingredientes son: suero en polvo, suero en polvo desmineralizado, lactosa en polvo, suero en polvo deslactosado y suero reducido en lactosa (Reduced Lactose Whey – RLW), aislados proteicos de suero (Whey Protein Isolates

– WPI), proteínas concentradas de suero (Whey Protein Concentrates – WPC), lactalbumina y suero permeado (Whey Permeate – WP). La funcionalidad tecnológica que poseen algunos de estos concentrados proteicos los convierte en ingredientes de gran relevancia para la formulación de nuevos productos en diversos sectores alimentarios y de bebidas, y como reemplazo o alternativa a otros ingredientes tradicionales (Musset y Castells 2017; Carter y Drake, 2018).

Los concentrados de proteína de suero pueden contener entre un 34 y 90% de proteínas, para lograr estos porcentajes se eliminan los componentes no proteicos mediante metodologías como ultrafiltración. En este sentido, el aislado de proteína de suero (WPI) es el que mayor contenido de proteínas presenta (> 90% de proteína sobre una base de peso seco). En este caso, se utiliza también la microfiltración para eliminar exceso de lípidos del suero, aunque también se lo puede obtener mediante cromatografía de intercambio iónico (Carter y Drake, 2018). Durante la fabricación de este producto las proteínas pueden sufrir algunos cambios conformacionales (Al-Jasaar y col., 2020). No obstante, el producto final presenta características muy favorables como alto valor nutricional, fácil digestión y alta biodisponibilidad, haciéndolo un ingrediente muy importante en la fabricación de productos lácteos con alto valor agregado (Wang y col., 2019).

La proteína dominante del WPI es la β -lactoglobulina. Esta es una proteína globular, su peso molecular es de 18,4 kDa y su punto isoeléctrico es 5,2. En su composición, cada monómero consta de 162 aminoácidos, incluida una cisteína libre y dos puentes disulfuro (Farooq y col., 2019). Debido a las características de su composición, sus propiedades no tóxicas, biocompatibilidad y biodegradabilidad, el WPI ha sido utilizado ampliamente como vehículo de diferentes compuestos de interés. La **Figura 1.16** muestra las principales formas

en las que se ha usado el WPI para vehiculizar principios activos, demostrando la versatilidad que presenta este ingrediente.

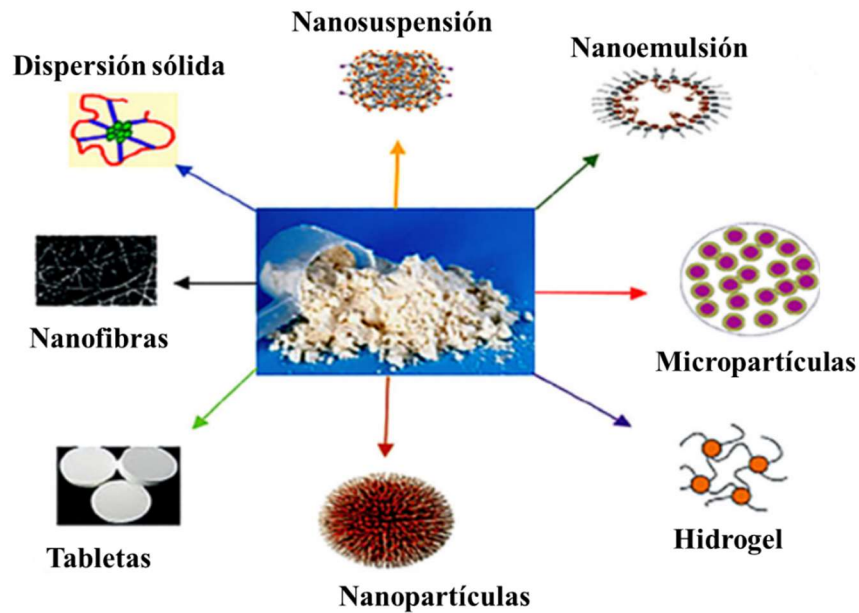


Figura 1.16: Representación esquemática de los usos del WPI como vehículo de principios activos (Farooq y col., 2019).

Dadas las características del WPI, en el presente trabajo se utilizó este ingrediente como forma alternativa para vehiculizar la vitamina B9.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue desarrollar una golosina saludable suplementada con vitamina B9 (ácido fólico) para ser destinada a personas con regímenes especiales.

2.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Formulación de una golosina hipocalórica

- 1) Formular una golosina hipocalórica de manzana y acáchul presentada en forma de lámina de fruta.
- 2) Estudiar las propiedades fisicoquímicas y potencialmente funcionales de las materias primas y del producto formulado.
- 3) Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos.
- 4) Evaluar la aceptación de los atributos y el impacto global del producto mediante un panel sensorial.
- 5) Analizar la estabilidad fisicoquímica y de compuestos antioxidantes durante seis meses de almacenamiento.

Objetivo específico 2: Formulación de dos ingredientes a base de ácido fólico

- 1) Desarrollar dos ingredientes a base de proteínas lácteas y ácido fólico.

- 2) Evaluar las interacciones entre las proteínas y el ácido fólico, estudiando diferentes aspectos fisicoquímicos de los ingredientes.
- 3) Estudiar la biodisponibilidad de la vitamina luego de la digestión *in vitro* empleando el método microbiológico oficial.

Objetivo específico 3: Formulación de una lámina de fruta suplementada con ácido fólico

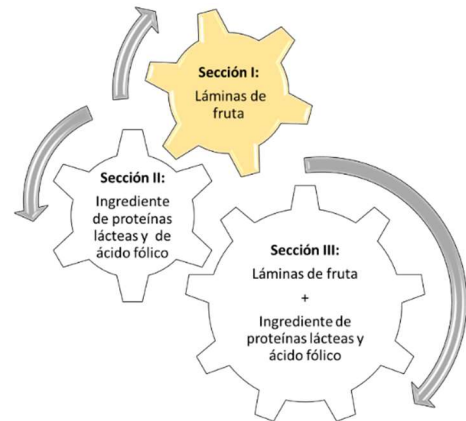
- 1) Suplementar con ácido fólico la golosina desarrollada en el *objetivo específico 1*, utilizando un ingrediente formulado en el *objetivo específico 2*.
- 2) Evaluar la bioaccesibilidad de la vitamina luego del desarrollo y la digestión *in vitro* de la golosina.
- 3) Implementar un método alternativo al oficial para cuantificar ácido fólico.

Materiales y métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Sección I: Láminas de fruta

La **sección I**, consiste en el desarrollo de una golosina en forma de lámina de fruta deshidratada. A continuación, se relatan los materiales y las metodologías que se utilizaron en esta sección.



3.1.1 Materiales

- Manzanas

Se utilizaron manzanas de la variedad Granny Smith producidas en el Alto Valle de Río Negro (Río negro, Argentina) por la compañía *Tres Ases*. Las manzanas se seleccionaron, se lavaron y desinfectaron con NaClO durante 5 min, se pelaron, se cortaron en cubos descartando las semillas y se almacenaron en bolsas herméticas a -20°C hasta su utilización (**Figura 3.1**). Al momento de utilizarlas, se descongelaron y se procesaron con un mixer hasta obtener un puré.



Figura 3.1: Procesamiento de la manzana Granny Smith.

- Polvo de acáchul

Los frutos frescos y maduros de acáchul se recolectaron manualmente en Xicotepec de Juárez (Puebla, México), se lavaron y desinfectaron con NaClO durante 5 min. y luego se enjuagaron con agua potable. Posteriormente se despulparon y secaron en un horno de convección HCC San-Son (México DF, México) a 60 °C durante 20 h. La pulpa y la cáscara deshidratadas se molieron utilizando un molinillo para café Moulinex (Alenzón, Francia) hasta obtener un polvo homogéneo (**Figura 3.2**). Este polvo se almacenó en una bolsa constituida por tres láminas (cristal de polietileno, poliéster metálico y película de polipropileno mate), en ausencia de luz y humedad hasta su uso. La obtención del polvo de acáchul se realizó en el área Agroindustrial Alimentaria de la Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez (Puebla, México), bajo la supervisión de la Dra. Alma Vázquez Sánchez.



Figura 3.2: Polvo de acáchul.

- Edulcorantes

Se utilizó jarabe de maltitol al 65% (g/100g) marca Ferromet (Buenos Aires, Argentina) y estevia en polvo marca DULRI (Buenos Aires, Argentina).

3.1.2 Desarrollo de láminas de frutas

La formulación de las láminas de fruta se optimizó utilizando un panel interno conformado por 10 personas (Watts y col., 1992). Las formulaciones consistieron en variar la proporción de polvo de acácul (0,5 a 3%), jarabe de maltitol (5-10%) y de estevia (0 a 0,5%), modificando en cada cambio el contenido de puré de manzana. La formulación preferida por el panel interno se muestra en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Formulación de láminas de fruta.

Componentes	(g/100g)
Puré de manzana	90,17
Polvo de acácul	1,00
Jarabe de maltitol	8,5
Estevia	0,33

Para el desarrollo del producto, los ingredientes se procesaron con un mixer (Phillips, HR1362/02, Países bajos) durante 90 s obteniendo una mezcla homogénea. A continuación, la mezcla se pesó y se moldeó en placas de Petri de borosilicato de 6 cm de diámetro, las cuales contenían un disco de material antiadherente sobre el vidrio interno. Por cada placa se utilizaron $18,0 \pm 0,5$ g de mezcla. Posteriormente, las placas se colocaron en un deshidratador FA-10MZ (Maquinarias Cobo, Buenos Aires, Argentina) a 60°C hasta llegar a una $a_w = 0,45 \pm 0,1$ (6:30-7:00 h de deshidratación). Al finalizar, las placas tapadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador, las láminas se desmoldaron, y luego se envasaron en bolsas individuales con cierre hermético. La **Figura 3.3** esquematiza el diagrama de flujo del proceso.

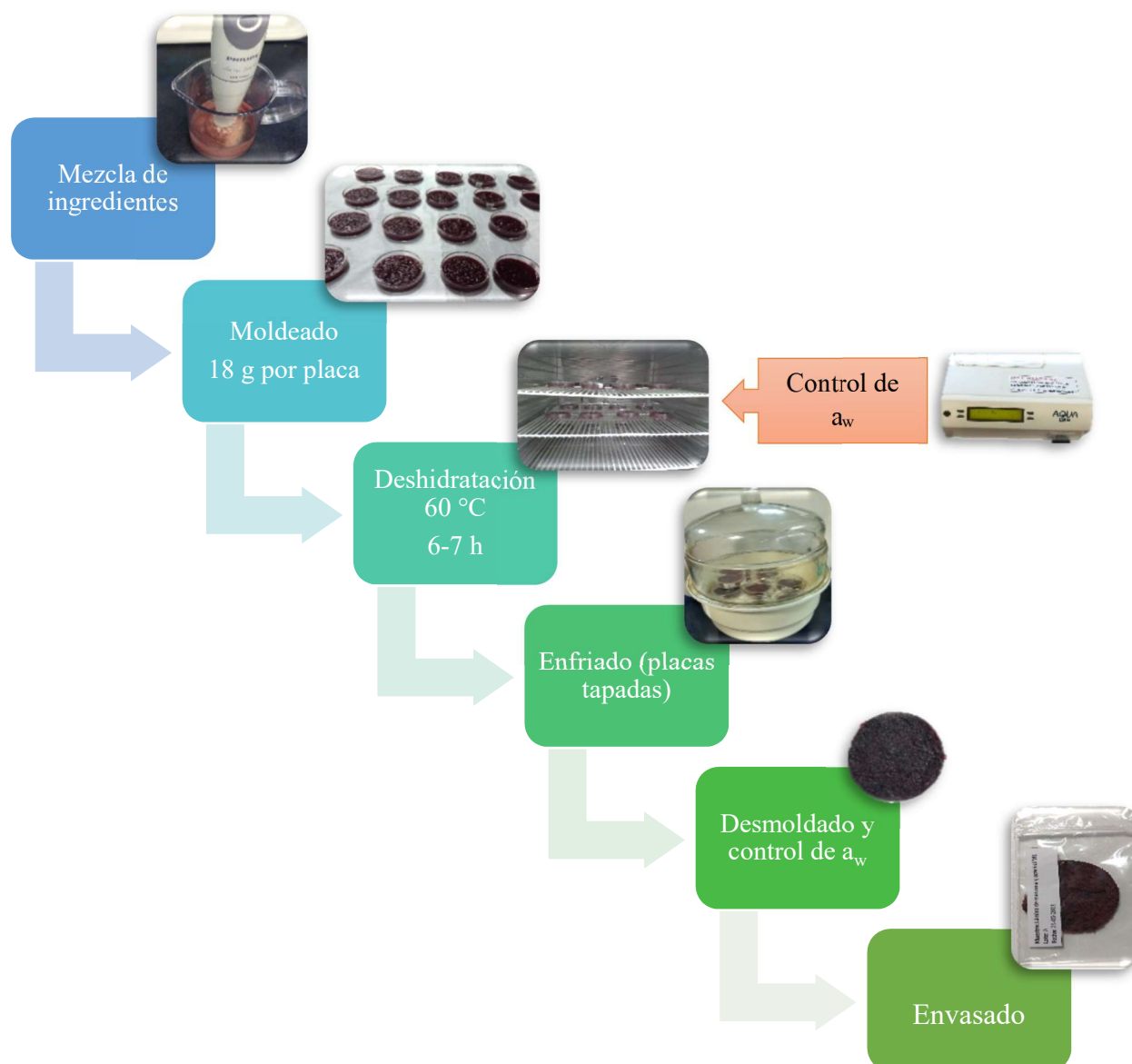


Figura 3.3: Diagrama de flujo utilizado para desarrollar las láminas de fruta.

3.1.3 Análisis fisicoquímico de los materiales

En la **Tabla 3.2** se resumen las determinaciones realizadas sobre el puré de manzana, el polvo de acáchul y la formulación fresca de las láminas frutales.

Tabla 3.2: Determinaciones fisicoquímicas realizadas sobre los materiales frutales empleados.

Determinación	Puré de manzana	Polvo de acácul	Formulación Fresca
Contenido de agua		X	
Sólidos solubles	X		X
Acidez	X		X
pH	X		X
Color		X	
Actividad de agua (a_w)		X	
Temperatura de transición vítrea (T_g)		X	
Isoterma de sorción de agua		X	

3.1.3.1 *Contenido de agua*

El contenido de agua se determinó mediante el método de Karl Fischer (KF). Se utilizó un titulador automático Mettler Toledo DL 31 (Uster, Suiza) aplicando la técnica de un sólo componente con el reactivo Hydranal Titrant Composite 5 Riedel-de Haën (Seelze, Alemania) y usando como disolvente metanol puro. Las mediciones se registraron a 25 °C y se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como g H₂O/100g de muestra $\pm$ la desviación estándar.

3.1.3.2 *Sólidos solubles, acidez total y pH*

- **Contenido de sólidos solubles:** se determinó mediante el método oficial 932.12 (AOAC, 2005) con un refractómetro digital modelo AR200 (Reichert, USA) a 25 °C. Los resultados se mostraron como el promedio de tres determinaciones expresadas como g sólidos/100g de muestra (°Brix) $\pm$ la desviación estándar.

- **Acidez total:** se determinó por titulación con una solución de NaOH. Los resultados se mostraron como el promedio de tres determinaciones expresadas en g ácido málico/100g muestra $\pm$ la desviación estándar.
- **pH:** Se empleó un pHímetro modelo 340 (Mettler Toledo, Reino Unido) y los resultados se expresaron como el promedio de tres determinaciones $\pm$ la desviación estándar.

Para estas tres determinaciones, los resultados de muestras distintas se compararon mediante un análisis T-Test utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

3.1.3.3 *Determinación de color superficial*

El color superficial se determinó con un fotocolorímetro portátil (CM-700d Konica Minolta, Japón) midiendo los parámetros L^* , a^* y b^* del espacio CIELAB, empleando el iluminante C y observador CIE 2°. La medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

3.1.3.4 *Actividad de agua (a_w)*

La actividad de agua (a_w) se determinó por el método oficial 925.09 (AOAC, 2005) utilizando un higrómetro de punto de rocío Aqualab 3TE (Decagon Devices, Estados Unidos). La medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

3.1.3.5 Temperatura de transición vítrea (T_g)

La T_g se midió mediante calorimetría de barrido diferencial utilizando un calorímetro DSC 822 (Mettler Toledo, Suiza). Se utilizó una rampa de calentamiento entre -20 y 100 °C a 10 °C/min. Se usó una cápsula vacía y herméticamente sellada como referencia. Los termogramas se evaluaron con el software Mettler Star[®] Thermal Analysis System versión 3.1 (Mettler Toledo AG). Los valores de T_g se obtuvieron considerando el valor *onset* de las discontinuidades detectadas en las curvas de flujo de calor versus temperatura, que se observan en los termogramas como corrimientos endotérmicos en la línea de base.

3.1.3.6 Isotermas de sorción de agua a 25 °C

Las muestras de polvo de acácul se colocaron en recipientes dentro de desecadores herméticos que contenían soluciones saturadas de diferentes sales que proveen distintas humedades relativas (HR): cloruro de litio (HR= 11%), acetato de potasio (HR= 22%), cloruro de magnesio (HR= 33%), carbonato de potasio (HR= 43%), nitrato de magnesio (HR= 52%) y cloruro de sodio (HR= 75%) (Greenspan, 1977). La humidificación se realizó a 25 °C durante 18 días y finalmente se determinó el contenido de agua (**sección 3.1.3.1**). Además, se evaluó la a_w y la T_g de cada muestra siguiendo las metodologías descritas en las secciones **3.1.3.4** y **3.1.3.5**, respectivamente.

El ajuste de las isotermas de sorción de agua se realizó a partir de los valores experimentales, utilizando la ecuación de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) (Lewicki, 1997) (**Ecuación 3.1**).

$$m = \frac{m_0 \times c \times K \times a_w}{(1 - C \times K \times a_w) \times (1 - C \times K \times a_w + C \times K \times a_w)} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde:

- m : contenido de agua en base seca ($\text{g H}_2\text{O}/100\text{g b.s.}$).
- m_0 : contenido de agua límite de hidratación cinética relacionada con la adsorción en la primera capa ($\text{g H}_2\text{O}/100\text{g b.s.}$).
- a_w : actividad de agua expresada como $\text{HR}/100$.
- c : constante de Guggenheim, relacionada con el calor de sorción del agua a la primera capa de sitios activos del sólido.
- K : factor de corrección de las propiedades de las moléculas de agua de la multicapa respecto del agua libre.

Se informaron los parámetros m_0 (contenido de agua de la monocapa) y las constantes c y K .

3.1.4 Caracterización del potencial bioactivo de los materiales

Preparación de extractos

Para preparar los extractos se pesaron 0,6 g de cada muestra (puré de manzana, polvo de acáchul, formulación fresca, formulación control de la lámina de fruta sin polvo de acáchul) y se añadieron 3,0 ml de alcohol acidificado (etanol al 95% con HCl 1,5 N en relación 85:15), se agitó la mezcla durante 15 min al resguardo de la luz y posteriormente se filtró al vacío con un embudo Büchner. El procedimiento se repitió dos veces más. Al finalizar, la solución filtrada se traspasó a un matraz aforado de 10 ml y se enrasó con alcohol acidificado. Se realizaron tres extractos por cada muestra.

3.1.4.1 *Contenido de compuestos fenólicos totales (CPT)*

El CPT se cuantificó utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con algunas modificaciones. Se mezclaron 100 µl de extracto con 900 µl de agua, 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 600 µl de Na₂CO₃ al 20%. Las muestras se incubaron 30 min a 40 °C y posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm con un espectrofotómetro UV-visible Jasco V-630 (Japón). El CPT se estandarizó con ácido gálico construyendo una curva de calibración ($R^2 = 0,999$) y se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra. Se analizaron tres réplicas por cada muestra y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar. Las muestras distintas se compararon mediante un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

3.1.4.2 *Determinación de la capacidad antioxidante (CA)*

3.1.4.2.1 Método de decoloración del radical (ABTS^{•+})

La determinación mediante el método de decoloración del catión radical [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico)] (ABTS^{•+}) se realizó siguiendo la metodología propuesta por Coria Cayupán y col. (2011), con algunas modificaciones. Se preparó una solución de ABTS 7,00 mM conteniendo persulfato de potasio 2,45 mM y se dejó incubar 16 h a temperatura ambiente al resguardo de la luz. Posteriormente se diluyó con una solución buffer fosfato pH 7,4 hasta obtener una absorbancia final de $1,00 \pm 0,01$ a 734 nm. Para la determinación de la CA de las muestras, se mezcló 0,1 ml de cada extracto con 1,9 ml de solución ABTS^{•+}, luego las muestras se incubaron a 25 °C durante 30 min, y finalmente se midió la absorbancia a 734 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Jasco V-630

(Tokyo, Japón). Paralelamente se construyó una curva de calibración con ácido gálico ($R^2=0,997$). Los resultados se expresaron como mg EAG/g de muestra. Se analizaron tres réplicas por cada muestra y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

3.1.4.2.2 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

El poder antioxidante reductor férrico (FRAP) de las muestras se determinó en los extractos de acuerdo con Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. Se mezclaron 60 μ l de agua bidestilada, 40 μ l de extracto y 600 μ l de reactivo de FRAP, las muestras se incubaron 30 min en oscuridad a 25 °C, y se midió la absorbancia a 593 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Jasco V-630 (Tokyo, Japón). Paralelamente, se realizó una curva de calibración con ácido gálico ($R^2=0,995$) y los resultados se expresaron como mg EAG/g de muestra. Se analizaron tres réplicas por cada muestra y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

Los resultados de CA (ABTS y FRAP) de diferentes muestras se compararon mediante un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

3.1.4.3 Contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT)

El contenido de AMT se determinó para los extractos del polvo de acáchul y las formulaciones frescas de las láminas de fruta. El análisis se llevó a cabo mediante el método de pH diferencial siguiendo el protocolo descrito por Giusti y Wrolstad (2001). Los extractos se diluyeron con soluciones buffer cloruro de potasio 0,025 M de pH 1,0 o buffer acetato de sodio 0,4 M de pH 4,5 (1:3, extracto: buffer) y posteriormente se incubaron 15 min en la

oscuridad y a temperatura ambiente. Las absorbancias se midieron con un espectrofotómetro UV-visible Jasco V-630 (Tokyo, Japón) a 510 y 700 nm. El contenido de AMT se expresó como mg de equivalentes de cianidina-3-O-glucósido (cia-3-O-glu) por gramo de muestra analizada (n=3) utilizando las **Ecuaciones 3.2 y 3.3**

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad \text{(Ecuación 3.2)}$$

$$\text{AMT} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times l) \quad \text{(Ecuación 3.3)}$$

Siendo el PM: 445,2 g mol⁻¹; Coeficiente de extinción molar ϵ : 26,900 Lcm⁻¹mol⁻¹; y paso óptico l : 1 cm.

Los resultados obtenidos de distintas muestras se compararon mediante un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

3.1.5 Composición centesimal de las láminas de fruta

3.1.5.1 *Proteínas*

La cuantificación de proteínas se determinó según el método Kjeldhal (AOAC, 1984). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en g/100g de muestra $\pm$ la desviación estándar.

3.1.5.2 *Fibra total*

La cuantificación de fibra se determinó siguiendo el método 999.43 (AOAC, 2000) utilizando un extractor Raw Fiber V230, VELP SCIENTIFIC (Usmate Velate, Italia). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como g/100g de muestra, como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

3.1.5.3 *Contenido de grasa*

El contenido de lípidos se determinó según el método Soxhlet 960.39 (AOAC, 2000). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en g/100g de muestra, como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

3.1.5.4 *Cenizas*

El contenido de cenizas se determinó siguiendo el método directo 923.03 (AOAC, 2000). Se pesaron 4,0 g de trozos de láminas de fruta en una cápsula de porcelana. La incineración de las muestras se realizó en primer lugar utilizando un mechero Bunsen y posteriormente se continuó hasta finalizar en una mufla, Mufla N°275, ESTIGIA® (Argentina). El residuo remanente luego de la incineración se pesó y el contenido se expresó como g/100g de muestra, como el promedio de tres réplicas $\pm$ la desviación.

3.1.6 *Análisis fisicoquímico de las láminas de fruta*

3.1.6.1 *Contenido y actividad de agua*

El contenido de agua de las láminas de fruta se determinó por gravimetría. Las muestras se colocaron en una estufa Vacuum Oven Fisteem (Cambridge, Reino Unido), a una

temperatura de 100 °C. Cada dos horas se registraron los pesos en una balanza analítica digital de precisión Mettler Toledo AG245 (Giessen, Suiza). Antes de cada pesada las muestras se enfriaron en un desecador conteniendo gel de sílice. El final del análisis se consideró cuando las muestras deshidratadas alcanzaron un peso constante. La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como g H₂O/100g de muestra ± la desviación estándar.

El análisis de la a_w se desarrolló siguiendo el protocolo indicado en el ítem **3.1.3.4**.

3.1.6.2 *Determinación de color superficial*

La determinación del color superficial se realizó de la misma manera que se describe en el ítem **3.1.3.3**. El estudio se llevó a cabo por triplicado y midiendo en tres puntos diferentes de cada lámina de fruta. Adicionalmente se calculó el ángulo de tono y el valor croma mediante las ecuaciones **3.4** y **3.5**, respectivamente. Los resultados se expresaron como el promedio ± la desviación estándar.

$$\text{ángulo de tono} = \left[\arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \right] \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$\text{croma} = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{1/2} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Donde a^* y b^* son parámetros cromáticos del espacio CIELAB.

3.1.6.3 *Análisis de textura*

La evaluación de la textura instrumental se realizó utilizando una máquina de ensayos universales Instron 3342 (Instron Corporation, Massachussets, Estados Unidos) (**Figura 3.4**) conectada por medio de una computadora al software Instron Bluehill Material Testing Software. Se obtuvieron las curvas fuerza-deformación mediante el test de punción realizado a 8 muestras de láminas de fruta según Vázquez-Sánchez y col. (2021). Se utilizó una punta de penetración de 3 mm de diámetro de punta roma que simulaba la fuerza ejercida por un molar, y la prueba finalizó cada vez que la muestra era completamente atravesada. Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio de las repeticiones $\pm$ la desviación estándar.

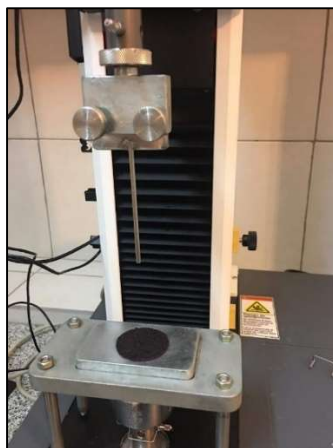


Figura 3.4: Instrumento empleado para el análisis de textura de las láminas de fruta.

Las condiciones de trabajo utilizadas fueron: velocidad de cabezal: 0,5 mm/s; intervalo de tiempo (captura de datos): 100 ms; rango de carga: 500 N. A partir de las curvas de fuerza-deformación obtenidas, se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Fuerza Máxima ($F_{\text{máx}}$): indica la fuerza máxima para atravesar la muestra y se relaciona con la resistencia del producto a la fractura o firmeza. Los resultados se expresaron en Newton (N).
- Distancia correspondiente a la fuerza máxima ($\Delta F_{\text{máx}}$): indica la deformación de la muestra en el punto de fuerza máxima. Los resultados se expresaron en milímetros (mm).
- Energía o trabajo (W): Deducida del área bajo la curva fuerza-distancia hasta el pico máximo. Es la energía de deformación liberada por unidad de área de fractura del material y está relacionada con su dureza. Los resultados se expresaron en Joules (J).

3.1.7 Caracterización del potencial bioactivo de las láminas de fruta

La caracterización del potencial bioactivo de las láminas de fruta se realizó de forma similar a la descrita en el apartado 3.1.4 para las materias primas y la formulación fresca. Se prepararon los extractos de las láminas de fruta ($n=3$) y posteriormente se caracterizaron en función del CPT (3.1.4.1), CA (3.1.4.2), y AMT (3.1.4.3). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar.

3.1.8 Digestión *in vitro* y evaluación de la bioaccesibilidad de los compuestos potencialmente bioactivos.

Para realizar el ensayo de digestión *in vitro* se siguió el protocolo internacional estandarizado INFOGEST 2014, propuesto por Minekus y col. (2014) (**Figura 3.5**). En primer lugar, se desarrolló la fase oral, mezclando 5,0 g de láminas de fruta, previamente disgregadas manualmente, con 3,5 ml de una solución de fluido salivar simulado (SSF). Posteriormente se añadieron 0,50 ml de una solución de α -amilasa salivar de 1500 U ml⁻¹, 25 μ l de CaCl₂ 0,3 M y 975 μ l de agua destilada y se incubó en una estufa Function Line 7000 (Heraeus, Hanau,

Alemania), bajo constante movimiento en un agitador orbital Vicking M-23 (Vicking, Buenos Aires, Argentina) a 100 rpm, durante 2 min. A continuación, se procedió con la fase gástrica, adicionando a la mezcla de la fase oral: 7,5 ml de una solución de fluido gástrico simulado (SGF), 1,6 ml de una solución de pepsina de 25000 U ml⁻¹ y 5,0 µl CaCl₂ 0,3 M. Esta solución se ajustó pH 3,0 con HCl y se completó el volumen a 10 ml finales con agua doblemente destilada. La mezcla se incubó con agitación, a 37 °C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se continuó con la fase intestinal. Para ello, la solución procedente de la fase gástrica se mezcló con: 11 ml de solución de fluido intestinal simulado (SIF), 5,0 ml de una solución de pancreatina de 800 U ml⁻¹, 2,5 ml de una solución de sales biliares y 40 µl de CaCl₂ 0,3 M. Posteriormente se ajustó el pH a 7,0 adicionando NaOH 0,1M y finalmente se completó el volumen con agua bidestilada hasta alcanzar 20 ml totales. Esta mezcla se incubó durante 2 h con agitación a 37 °C. Completado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 min, separando la fracción soluble “sobrenadante” de la fracción insoluble. En la fracción soluble se determinaron: CPT, CA y AMT como se describió en los apartados **3.1.4.1**, **3.1.4.2** y **3.1.4.3**, respectivamente. En cuanto a la fracción insoluble, la misma se deshidrató mediante liofilización. Para ello, los residuos obtenidos se congelaron a -20 °C y se liofilizaron durante 48 h usando un liofilizador Alpha 1-4 LD/2-4 LD-2 (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Alemania) a una temperatura de -54 °C y una presión de 4 Pa. Finalmente se cuantificó la CA mediante el método de decoloración ABTS⁺ utilizándose la metodología QUENCHER (Archaina y col., 2019). Para ello, se pesó 1 mg de muestra y se mezcló con 10 ml de solución ABTS, preparada de la misma manera que lo descrito en el apartado **3.1.4.2.1**. Esta mezcla se agitó mediante vórtex durante 3 min y se centrifugó a 10.000 rpm 10 min. Posteriormente se incubó 17 minutos (tiempo que restaba para cumplir 30 min. de la exposición de la muestra con la solución ABTS) y se midió la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron en mg EAG/g de muestra liofilizada utilizando una

curva de calibración de EAG/ml ($R^2 = 0,997$). Los resultados de la cuantificación de compuestos potencialmente bioactivos de las muestras sin digerir y las digeridas se compararon mediante un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

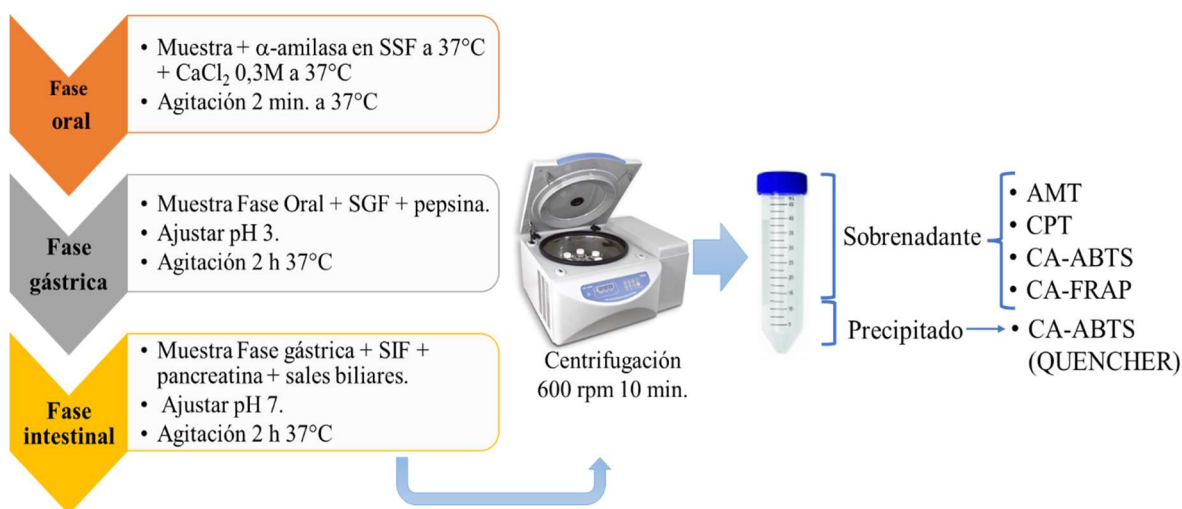


Figura 3.5: Esquema del proceso de digestión *in vitro* de las láminas de fruta.

3.1.9 Análisis sensorial de las láminas de fruta

3.1.9.1 Análisis cualitativo: Prueba de asociación de palabras

Este estudio tuvo como objetivo recabar la opinión del público acerca de las láminas de fruta y evaluar el interés de compra del producto. Para ello se elaboró una encuesta que se distribuyó por correo electrónico y redes sociales (**Anexo 1**). La encuesta fue respondida por 359 personas. Todas las palabras, descripciones y asociaciones provistas por los participantes mediante sus respuestas fueron consideradas para el análisis. Los datos se analizaron mediante el programa Word Art (www.wordart.com) y se creó una nube de palabras. Las palabras obtenidas se agruparon en diferentes categorías por un conjunto de tres investigadores, considerando su interpretación personal y el significado de las palabras (Guerrero y col., 2010).

Finalmente, se determinó el porcentaje de las palabras mencionadas para cada categoría identificada.

3.1.9.2 *Análisis sensorial cuantitativo*

El panel sensorial estuvo integrado por 96 panelistas de entre 18 y 65 años. El estudio se realizó en la Facultad de Bromatología (UNER, Entre Ríos, Argentina), utilizando cabinas especiales, diseñadas según Meilgaard y col. (2006). Estas cabinas son cubículos semi cerrados con el fin de que los consumidores no tengan distracciones al momento de probar las muestras. En cada cabina se encuentra un panel de luces colocado de manera de alumbrar directamente a la muestra. En la mesa se colocó la muestra, el formulario correspondiente, una lapicera, una servilleta, un cesto pequeño y un vaso de agua. En la **Figura 3.6** se muestra una imagen de las cabinas y de los consumidores realizando la prueba sensorial de las láminas de fruta.



Figura 3.6: a) Cabinas utilizadas en los estudios sensoriales; b) Consumidores realizando las pruebas sensoriales de las láminas de fruta.

Los métodos utilizados para la evaluación sensorial fueron los que se utilizan normalmente para evaluar los productos antes de lanzarlos al mercado (Moskowitz y col.,

2012). Los atributos sensoriales evaluados fueron color, dureza, sabor a fruta, acidez, dulzor y pegajosidad.

3.1.9.2.1 Evaluación del grado de satisfacción

Mediante esta prueba se evaluaron las sensaciones agradables o desagradables que produjeron las muestras al ser degustadas (Anzaldúa Morales, 1994). El grado de satisfacción de los diferentes atributos y la satisfacción global del producto se estudiaron mediante escalas hedónicas de 5 y 7 puntos, respectivamente (Ramírez-Navas, 2012). En el **Anexo 2** se muestran las planillas utilizadas para esta evaluación.

3.1.9.2.2 Evaluación de la intensidad de cada atributo

Esta evaluación consistió en pedir a los consumidores que describieran la intensidad percibida de cada atributo utilizando una escala de tres puntos JAR (*Just About Right*): 'muy intenso', 'justo' o 'poco intenso' según la representación que cada persona percibiera del punto justo (Lawless y Heymann, 2010). En el **Anexo 2** se encuentra la planilla utilizada para esta evaluación.

3.1.10 Estudios de estabilidad

Con el objetivo de conocer la estabilidad de las láminas de frutas, se estudiaron sus características fisicoquímicas y funcionales en función del tiempo. Se desarrollaron tres lotes de láminas de frutas cada 15 días por un tiempo total de 184 días (6 meses). En cada producción las muestras se envasaron en bolsas plásticas Ziploc® (**Figura 3.7**), se protegieron de la luz recubriendo las bolsas con papel aluminio y se almacenaron a $25,0 \pm 0,1$ °C en una cámara

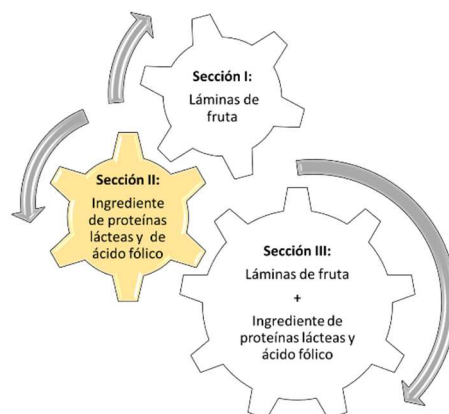
Thermo Scientific™ Precisión 815 (Long Branch, Estados Unidos). Al finalizar el tiempo de almacenamiento, se evaluaron los cambios en la actividad de agua, el contenido de agua y el color siguiendo las metodologías mencionadas en los apartados 3.1.6.1 y 3.1.6.2, respectivamente; y, por otro lado, se evaluaron los cambios en CPT, CA y AMT utilizando las metodologías descritas en los apartados 3.1.4.1; 3.1.4.2 y 3.1.4.3, respectivamente. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.



Figura 3.7: Láminas de fruta envasadas en bolsas selladas (Ziploc®).

3.2 Sección II: Ingrediente de proteínas lácteas-ácido fólico

En esta sección se describe el desarrollo de dos ingredientes a base de proteínas lácteas (β -lactoglobulina o aislado de proteína de suero) y ácido fólico. A continuación, se relatan los materiales y las metodologías utilizados en esta sección.



3.2.1 Materiales

- **Proteínas lácteas:** β -lactoglobulina (β lg) proporcionada por Davisco Foods International Inc. (Le Sueur, Minnesota) y aislado de proteína lácteo (WPI) de pureza mayor a 90% donada amablemente por Arla Foods S.A. (Buenos Aires, Argentina).
- **Ácido fólico (AF)** en polvo con pureza de 99, 2% donado por Laboratorios Bagó (La Plata, Argentina).
- **Reactivos para ajustar pH:** HCl 1,0 y 0,1 N, ácido cítrico 47,4% y 4,47% calidad alimentaria, NaOH 0,1N, 2,0 N, 4,0 N calidad farmacológica.
- **Agua bidestilada.**

3.2.2 Síntesis de los ingredientes proteína-vitamina B9

Se prepararon dos ingredientes a partir del complejamiento entre las proteínas lácteas (β lg y WPI) y la vitamina B9 (ácido fólico, AF) siguiendo la metodología de Pérez y col. (2014) con modificaciones. El procedimiento consistió en tres fases las cuales se describen a continuación (**Figura 3.8**).

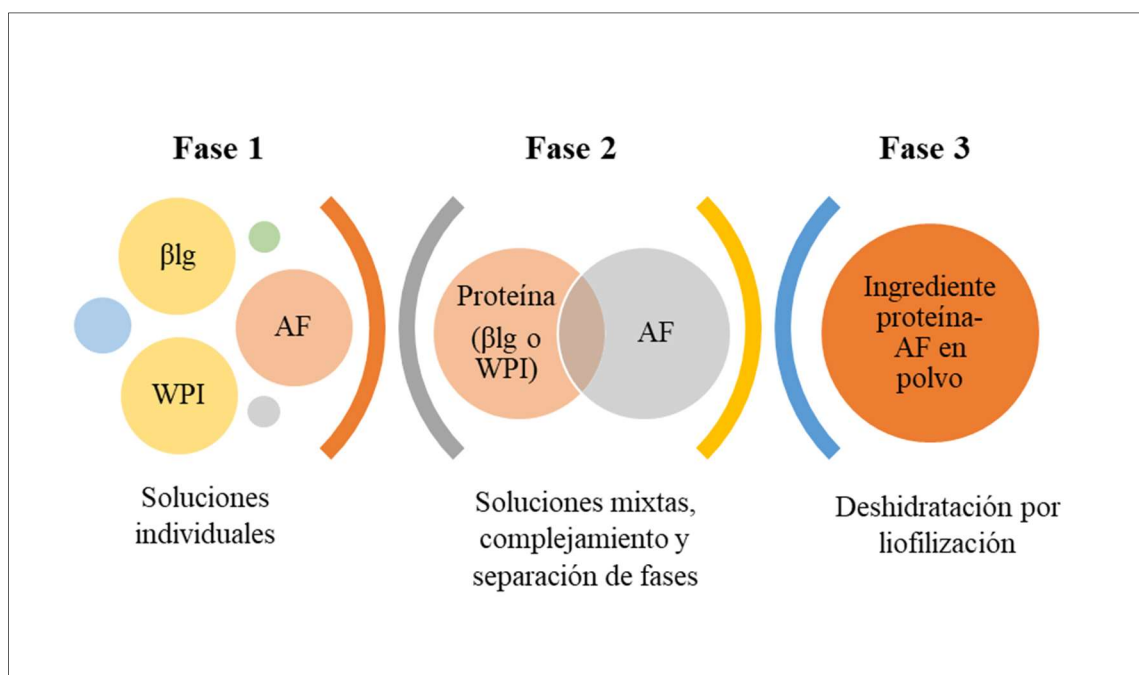


Figura 3.8: Fases para el desarrollo de los ingredientes proteína-vitamina B9.

En la **Fase 1** se prepararon soluciones acuosas de igual concentración de βlg, WPI y AF, se dejaron hidratar a 24 h a 4 ± 2 °C y finalmente se ajustaron los valores de pH de las soluciones a 7 con NaOH al 0,1; 2,0 y/o 4,0 N.

En la **Fase 2** se generaron los complejos mezclando en una proporción 50:50 las soluciones de proteínas (βlg o WPI) y de AF, ambas a pH 7. La solución mixta resultante (proteína-AF), se ajustó a pH 3 utilizando ácido cítrico. Este último paso causó la separación de fases, con una fase depleta en complejos y una fase inferior rica en ellos. Esta condición de trabajo fue optimizada previamente a partir de pruebas realizadas con soluciones mixtas de proteína-AF a pH 7 ajustadas con HCl 1,0 y 0,1 N a un rango de pH de 2 a 7.

En la **Fase 3**, las soluciones mixtas de proteína-AF se congelaron a -20 °C y se liofilizaron durante 48 h usando un liofilizador Alpha 1-4 LD/2-4 LD-2 (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Alemania) a una temperatura de -54 °C y una

presión de 4 Pa. De esta manera se logró obtener un polvo de fácil manipulación, con características apropiadas para utilizarlo como ingrediente alimentario.

Siguiendo el mismo procedimiento, se prepararon controles de proteínas puras y de AF puro, sustituyendo por agua bidestilada la solución de AF o proteína, según corresponda.

En la **Figura 3.9** se muestra el esquema del procedimiento utilizado para desarrollar los ingredientes y se puede observar una imagen del producto final obtenido.

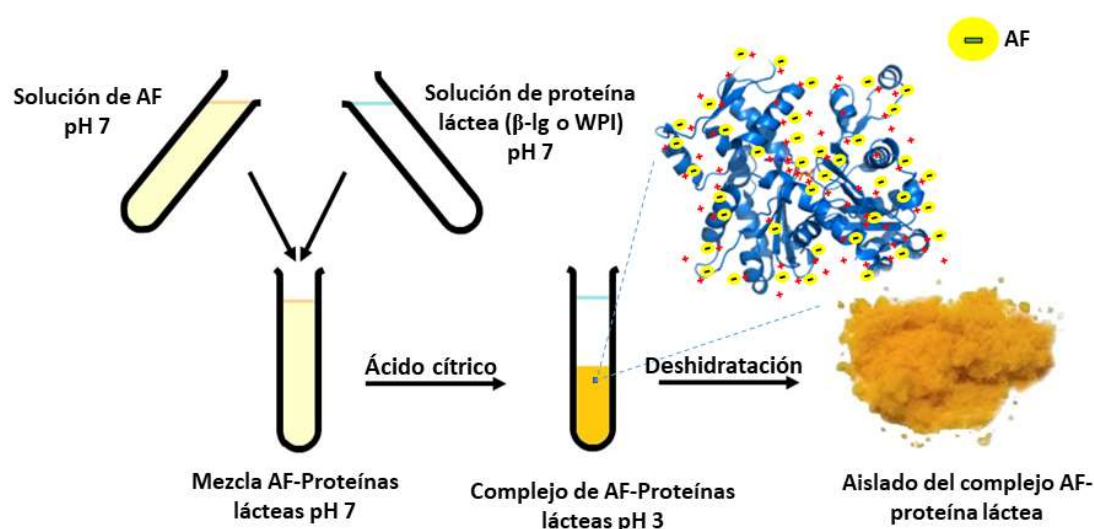


Figura 3.9: Esquema representativo del procedimiento para desarrollar los complejos proteína-AF.

Para el estudio integral de estos complejos se trabajó en un régimen concentrado y otro diluido. En ambos casos se respetaron las fases 1 y 2 de la preparación. Debido a las consecuencias metodológicas del régimen diluido, la deshidratación del ingrediente sólo se realizó en el régimen concentrado.

En el *régimen concentrado*, las concentraciones de las soluciones primarias de βlg, WPI y AF fueron de 10,0 g de especie disuelta/100 g de solución, por lo que en la mezcla final

proteína-AF, ambos componentes se encontraron a la mitad de la concentración, es decir a 5,0 g de especie disuelta/100g de solución. Los estudios realizados a partir de este régimen se hicieron directamente sobre el ingrediente deshidratado o en los casos en que fue necesario, se resuspendió el polvo agregando la misma cantidad de agua sublimada durante el proceso de liofilización. Estos estudios comprendieron evaluar las interacciones entre las proteínas y la vitamina B9, analizar la distribución de partícula y estudiar aspectos vinculados a la estabilidad del ingrediente en polvo.

En el *régimen diluido* las concentraciones de las soluciones primarias de las proteínas y el AF fueron 0,0125%; 0,01825% y 0,0365% (g de especie disuelta/100 g de solución), por lo tanto, al realizar las mezclas 50:50 (proteína:AF), las concentraciones finales de los complejos fueron 0,00625; 0,0125 y 0,01825 g de especie disuelta/100 g de solución, siendo la especie disuelta la proteína o el AF. Estas muestras se emplearon para el estudio de la formación de los complejos, la evaluación del efecto de la vitamina libre y ligada a las proteínas para depurar el radical ABTS^{•+}. Finalmente, se realizó una digestión *in vitro* y se evaluó la biodisponibilidad de la vitamina libre y presente en los complejos mediante un método microbiológico.

En la **Tabla 3.3** se resumen las determinaciones realizadas sobre cada tipo de muestra.

Tabla 3.3: Determinaciones realizadas en cada régimen.

Determinación	Régimen concentrado	Régimen diluido
FT-IR	X	
Potencial ζ	X	
Microscopía confocal de fluorescencia	X	
Cinética de agregación		X
Capacidad antioxidante		X
Digestión <i>in vitro</i> y biodisponibilidad		X
Contenido de agua	X	
Temperatura de transición vítrea (T_g)	X	

3.2.3 Caracterización de las interacciones proteína-vitamina B9

3.2.3.1 *Análisis FT-IR*

Las muestras liofilizadas de los controles y de los complejos proteínas-AF se molieron con un mortero y se mezclaron con KBr seco previamente molido, grado espectroscópico (BDH VWR, VWR International, LLC, Radnor, PA, EE. UU.) en una proporción de ~ 1: 10 hasta que se obtuvo un polvo fino y homogéneo. Se adquirieron espectros por reflectancia difusa mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) empleando un equipo modelo Spectrum 400 (Perkin Elmer, Inc., Shelton CT, EE. UU.) con detector DTGS, utilizando un accesorio DRIFT (Perkin Elmer, Inc.). Se realizaron 16 scans para cada muestra, adquiridos con una resolución de 4 cm^{-1} y entre 600 y 4000 cm^{-1} a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada muestra se analizó por triplicado. Se utilizó KBr como referencia. Los espectros se corrigieron, normalizaron y analizaron con el software Spectrum versión 6.3.5 (Perkin Elmer, Inc.).

3.2.3.2 *Potencial ζ*

La evaluación del potencial ζ se realizó utilizando analizador Zetasizer Nano-Zs, de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido), el cual cuenta con un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital Modelo ZEN3600, siguiendo la metodología de Martínez y col. (2019). Las muestras en polvo se resuspendieron, se homogeneizaron y se midieron rápidamente para evitar la precipitación durante la medición, utilizando celdas capilares desechables (DTS1060, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) provistas de electrodos en cada lado. El analizador mide el potencial ζ a partir de la movilidad electroforética de las partículas y posteriormente convierte los resultados en potencial ζ mediante la ecuación de Henry (**Ecuación 3.6**).

$$Ue = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3\eta}$$

Ecuación 3.6

Donde:

- Ue es la movilidad electroforética
- ζ es el potencial ζ
- ε es la constante dieléctrica
- η la viscosidad de la muestra
- $F(ka)$ es la función de Henry, que en medio acuoso se suele utilizar 1 (aproximación de Huckel)

Por cada medición se realizaron 12 lecturas secuenciales. Los resultados se expresaron como el promedio de tres réplicas $\pm$ la desviación estándar. Los resultados obtenidos de distintas muestras fueron comparados un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

3.2.4 Caracterización del tamaño de partícula en nano y microescalas

3.2.4.1 Distribución del tamaño de partícula

Este estudio permite analizar el tamaño de partículas presentes en las muestras en el rango submicrónico. El análisis se llevó a cabo mediante dispersión de luz dinámica (DLS) con el mismo analizador que se utilizó para evaluar el potencial ζ . Para realizar este estudio, los polvos proteína-AF y sus respectivos controles se resuspendieron en agua agregándoles la misma masa de agua sublimada. El análisis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Carpineti y col. (2014). Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173° , dentro de un rango de 0,6 nm a 6 μ m, según especificaciones del equipo. Se tomaron diez

lecturas de cada muestra ($n= 3$), contenida en una cubeta de poliestireno desechable. La distribución de intensidad se determinó usando una función exponencial múltiple (CONTIN) para analizar los datos de distribución porcentual de tamaños de partícula/agregados (Štěpánek, 1993). Cabe destacar que la distribución de tamaño fundamental generada por DLS es una distribución de intensidad, pero es posible transformar estos resultados en una distribución de volumen o una distribución de números mediante la teoría de Mie. Este enfoque permite describir la proporción relativa de poblaciones de partículas múltiples presentes en la muestra en función de su masa o volumen o directamente el número en lugar de basarse en su dispersión. Por lo tanto, se evaluó la distribución global del tamaño de partícula y se analizaron los picos principales según Ochnio y col. (2018).

3.2.4.2 *Análisis de microscopía confocal de fluorescencia*

Las estructuras de los complejos de tamaños también se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia. Con esta metodología se pueden observar las estructuras de tamaños en microescala. Se usó un microscopio de barrido láser confocal (CLSM) (Olympus FV1000, Japón). Las muestras en solución (ingredientes y controles resuspendidos en agua) se marcaron de forma no covalente con gotas de rodamina B al 0,02% p/v (excitación a 560 nm y emisión máxima a 625 nm). Se obtuvieron imágenes de fluorescencia de 1024×1024 píxeles de tamaño con un objetivo de aceite PLAPON 60X NA = 1,42 ($1 \mu\text{m} = 4,83$ píxeles) utilizando un láser He-Ne (543 nm). Las imágenes se procesaron con el software FIJI (ImageJ) (NIH).

3.2.5 Caracterización de la formación de los complejos

3.2.5.1 *Cinética de agregación proteica*

A fin de analizar la agregación proteica inducida por la asociación con el AF, lo cual es una prueba de la formación de los complejos, se evaluó la cinética de agregación. Las muestras se prepararon directamente en una cubeta de cuarzo mezclando las cantidades necesarias de cada componente. Se tomó la lectura de la absorbancia de las soluciones de los complejos y sus respectivos controles en las concentraciones de proteína y AF de: 0,00625%; 0,0125% y 0,01825% p/p. Se registró el incremento de las absorbancias en el tiempo a una longitud de onda de 600 nm a 25°C durante 20 min, empleando un espectrofotómetro UV-Visible JASCO V 630 (Tokyo, Japón).

3.2.6 Caracterización potencialmente funcional de los complejos

3.2.6.1 *Método de decoloración del radical (ABTS^{•+})*

Esta técnica se empleó para estimar la capacidad antioxidante de las muestras. Se analizó el efecto depurador del radical ABTS^{•+} de los complejos proteína-AF 0,00625%, 0,0125% y 0,01825% p/p y de sus controles (β lg, WPI y AF). La metodología utilizada fue la mencionada en el apartado 3.1.4.2.1. Los resultados se expresaron como el promedio de tres réplicas $\pm$ la desviación estándar. Los resultados obtenidos de distintas muestras fueron comparados un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

3.2.6.2 Digestión *in vitro* y biodisponibilidad de la vitamina B9

La digestión *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo de INFOGEST 2014 (Minekus y col., 2014) descrito en el apartado 3.1.8. Para ello, primero se desarrolló la fase oral pensando 5,0 g de los complejos proteína-AF y de los respectivos controles, preparados a una concentración de 0,01825 g de especie disuelta/100 g de solución (siendo la especie disuelta la proteína o el AF) y se mezclaron con 3,5 ml con una solución de fluido salivar simulado, 0,50 ml de una solución de α -amilasa salivar de 1500 U ml⁻¹, 25 μ l de CaCl₂ 0,3 M y 975 μ l de agua destilada y posteriormente las muestras se incubaron en una estufa Function Line 7000 (Heraeus, Hesse, Alemania), bajo constante movimiento en un agitador orbital Vicking M-23 (Vicking, Buenos Aires, Argentina) a 100 rpm, durante 2 min. A continuación, se continuó con la fase gástrica, adicionando 7,5 ml de una solución de fluido gástrico simulado, 1,6 ml de una solución de pepsina de 25000 U ml⁻¹ y 5,0 μ l CaCl₂ 0,3 M y se ajustó el pH 3 con HCl 1 N, posteriormente se completó el volumen a 10 ml finales con agua bidestilada. La mezcla se incubó con agitación y a 37 °C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se continuó con la fase intestinal donde se añadieron 11,0 ml de solución de fluido intestinal simulado, 5,0 ml de una solución de pancreatina de 800 U ml⁻¹, 2,5 ml de una solución de sales biliares y 40 μ l de CaCl₂ 0,3 M. El pH se ajustó a 7 adicionando NaOH 0,1 N y por último se completó el volumen con agua bidestilada hasta alcanzar 20,0 ml totales. Esta mezcla se incubó durante 2 h con agitación y a 37 °C. Completado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm a 4 °C durante 10 min. Al finalizar, se recolectaron los sobrenadantes obtenidos de la etapa intestinal y se cuantificó la vitamina mediante el método microbiológico oficial AOAC (método 992.05, 2000). Este método permite cuantificar la vitamina B9 y además estimar su biodisponibilidad utilizando un modelo bacteriano.

3.2.6.2.1 Evaluación de la biodisponibilidad del AF

La cuantificación del ácido fólico se realizó mediante el método microbiológico AOAC (método 992.05, 2000). Este método se basa en la promoción de crecimiento de ciertos microorganismos pertenecientes al grupo de las bacterias ácido-lácticas, con auxotrofia para folato (Cheung y col., 2008). Como microorganismo auxótrofo para ácido fólico se empleó *Lacticaseibacillus casei* BL23 (*L. casei* BL23).

Para llevar a cabo el ensayo, se utilizó el protocolo descrito por Ochnio y col. (2018) en el cual se realiza una curva de calibración de AF paralelamente a la medición de las muestras. El procedimiento consta de tres etapas (**Figura 3.10**) las cuales se realizan en un total de 7 días.

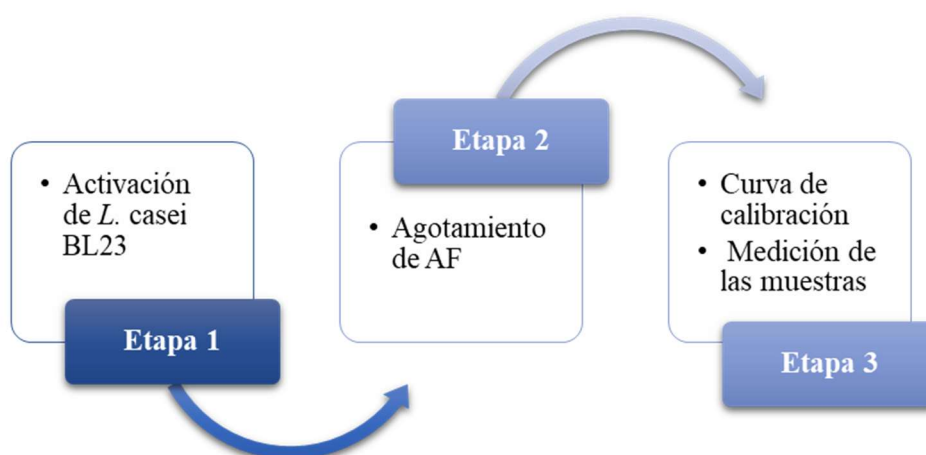


Figura 3.10: Etapas para analizar la biodisponibilidad del AF en los ingredientes.

A continuación, se describe cada etapa:

- **Etapa 1: Activación de las bacterias**

La cepa *L. casei* BL23, que se encontraba conservada a -20 °C en glicerol, se inoculó en medio MRS (Biokar, Beauvais, Francia) e incubó a 37 °C durante 72 h. Luego el cultivo se cosechó por centrifugación y las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril.

- **Etapa 2:** Agotamiento del AF en las células

Agotamiento del AF en las células: Para asegurar que el crecimiento de *L. casei* BL23 durante el experimento correspondiera al AF suministrado y no al remanente del intracelular bacteriano (*pool* intracelular), las bacterias se inocularon en un medio carente de ácido fólico FACM (Folic Acid Casei Medium, Difco, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente el cultivo obtenido se cosechó nuevamente por centrifugación y se lavó dos veces con agua destilada estéril.

- **Etapa 3:** Curva de calibración y medición de las muestras

Curva de calibración: Para realizar la curva de calibración, la suspensión bacteriana de *L. casei* BL23 se inoculó en diferentes tubos que contenían el medio FACM y distintas concentraciones de ácido fólico. Estos cultivos se incubaron 48 h, y posteriormente se determinó la densidad óptica (DO) a 600 nm como medida de la biomasa producida por crecimiento bacteriano. De este modo se generó una curva de crecimiento microbiana en función de la concentración de ácido fólico nominal (**Figura 3.11**).

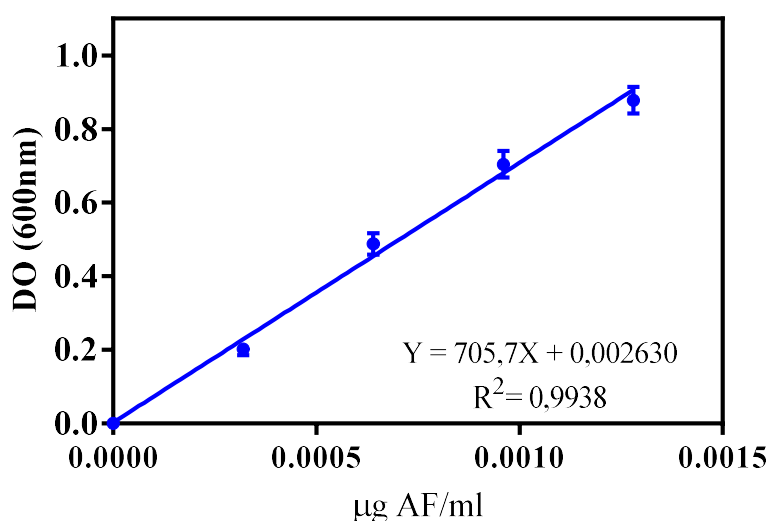


Figura 3.11: Curva de calibración obtenida a partir del crecimiento de *L. casei* BL23 en función de la concentración de AF. Los valores obtenidos se expresaron como el promedio de tres repeticiones $\pm$ la desviación estándar.

Cabe aclarar que la curva de calibración es un factor limitante de la metodología, dado que, si no se logra obtener una curva de calibración que aproxime a una función lineal, las mediciones de las muestras deben ser desechadas y el procedimiento debe repetirse. En este contexto, las dificultades que surgen experimentalmente para obtener la curva de calibración están relacionadas al agotamiento de las células, ya que, aunque este procedimiento esté estandarizado, no siempre se alcanza el agotamiento de AF esperado. El resultado, en las ocasiones en las que falla el agotamiento es una lectura alta de la DO independientemente de la concentración de AF.

Determinación de ácido fólico en las muestras: Las muestras (complejos y controles digeridos) se midieron paralelamente a la curva de calibración, por lo que los cultivos utilizados de *L. casei* BL23 fueron sometidos a los mismos procedimientos. Estas bacterias fueron inoculadas en un medio que contenía FACM y la muestra a analizar. Las muestras se incubaron 48 h, y posteriormente se determinó la densidad óptica a 600 nm. Los resultados se expresaron como el promedio de tres réplicas $\pm$ la desviación estándar. Adicionalmente, los resultados obtenidos de distintas muestras fueron comparados mediante un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

3.2.7 Evaluación de la estabilidad física del ingrediente

3.2.7.1 *Temperatura de Transición vítrea*

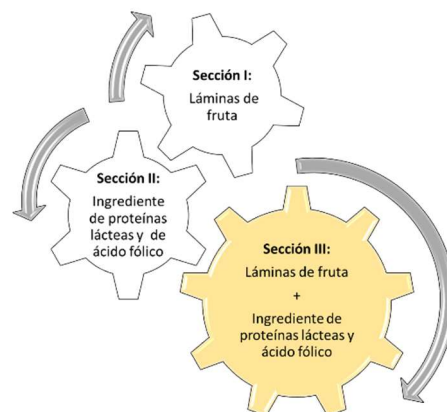
Las temperaturas de transición vítrea (T_g) se determinaron siguiendo el protocolo del ítem **3.1.3.5**.

3.2.7.2 *Determinación del contenido de agua*

El contenido de agua se determinó por el método de Karl Fischer (KF) siguiendo el protocolo utilizado en el ítem **3.1.3.1**.

3.3 Sección III: Lámina de fruta + ingrediente de proteínas lácteas-ácido fólico

En esta sección, se unifican las **secciones I y II** y se describe el desarrollo de una lámina de fruta suplementada con un ingrediente a base de proteínas lácteas y ácido fólico generado en la **sección II**. A continuación, se relatan los materiales y las metodologías utilizadas en esta sección.



3.3.1 Desarrollo de las láminas de manzana y acáchul suplementadas con un ingrediente a base de proteínas lácteas y ácido fólico

Se prepararon láminas de fruta siguiendo el procedimiento descrito en el ítem **3.1.2**, sin embargo, en esta oportunidad se suplementaron con el ingrediente descrito en la sección **3.2.2** constituido por WPI y AF. El procedimiento consistió en:

- 1) Mezclar los ingredientes: manzana Granny Smith (90,17%); polvo de acáchul (1,00%); jarabe de maltitol (8,50%); estevia (0,33%) y el ingrediente WPI-AF en cantidades necesarias para que una golosina deshidratada de 4,4 g aporte 400 ppm de AF.
- 2) Moldear la mezcla en placas 6 cm de diámetro.
- 3) Deshidratar en estufa de convección hasta alcanzar una $a_w = 0,45 \pm 0,1$.
- 4) Desmoldar y almacenar en bolsas con cierre hermético a temperatura ambiente hasta su análisis.

De la misma manera que se elaboraron las láminas frutales suplementadas con el ingrediente WPI-AF (L-WPI-AF), se prepararon los controles reemplazando el ingrediente por AF puro (LC-AF) y por WPI puro (LC-WPI).

3.3.2 Digestión *in vitro* de las láminas de fruta suplementadas con AF

Las láminas de fruta suplementadas con la vitamina B9 mediante el complejo WPI-AF y las láminas de fruta controles (con AF libre y con WPI puro) se sometieron a una digestión *in vitro*, siguiendo el protocolo de INFOGEST (Minekus y col., 2014) que fue descrito en el ítem 3.1.8. Luego de obtener el sobrenadante de la *etapa de digestión intestinal*, se evaluó la biodisponibilidad de la vitamina B9 presente en las láminas ante *L. casei* BL23 y, adicionalmente, se cuantificó el AF mediante un método alternativo de HPLC.

3.3.2.1 Evaluación de la biodisponibilidad del AF presente en las láminas ante *L. casei* BL23

La evaluación se realizó sobre el sobrenadante utilizando el modelo *L. casei* BL23 descrito en el ítem 3.2.3.6.

3.3.2.2 Cuantificación de la vitamina B9 en el sobrenadante obtenido de la digestión *in vitro* mediante HPLC.

Para estas determinaciones se utilizó un equipo HPLC (Waters 1525, EE. UU.) equipado con un inyector automático (Waters 2707, EE. UU.) y con un fotodiodo detector de matrices (Waters 2996, EE. UU.). Se empleó una columna Lichrospher® 100, RP-18e (250 ×

4 mm, 5 μ m). La fase móvil fue constituida por dos porciones, en la bomba A – metanol:acetonitrilo (1:1) y en la bomba B - agua:ácido fosfórico (99:1). El gradiente de elución fue optimizado de la siguiente manera: T, tiempo (min)/fase móvil-A:B (%): T0/10:90, T3/10:90, T12,5/15:85, T14/15:85, T15/10:90, T25/10:90, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min y a una temperatura de estabilización de 30 °C. Tanto el estándar como las muestras se filtraron con filtros jeringa de 0,22 micrones de espesor de poro. El volumen inyectado por muestra fue de 40 μ l (n=3).

El método de HPLC se realizó siguiendo el protocolo de Koning (1999) con algunas modificaciones. La longitud de onda de trabajo fue seleccionada mediante la obtención del pico máximo de absorción del estándar de AF en el espectro la cual resultó a 290 nm. Esta longitud de onda máxima obtenida fue consistente con las informadas en otros trabajos (Koning, 1999; Alaburda y col., 2008; Matías y col., 2014; Modupe y col., 2020). Posteriormente se evaluó el tiempo de retención del estándar de ácido fólico a 290 nm el cuál fue observado a $8,7 \pm 0,2$ min (Figura 3.12).

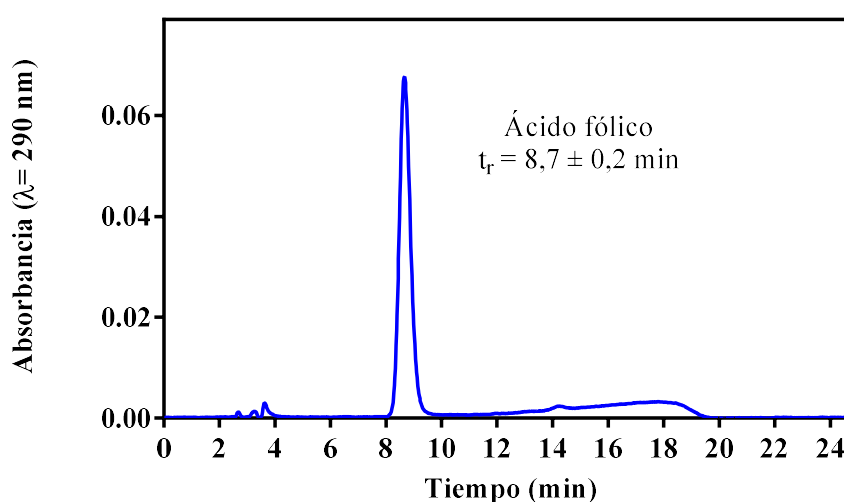


Figura 3.12: Cromatograma del estándar de AF (15 ppm).

Para la curva de calibración (**Figura 3.13**) se preparó una solución madre de 100 ppm en NaOH 0,05N y a partir de ella se prepararon 6 soluciones de trabajo cuyas concentraciones iban de 1 a 50 ppm disueltas en HCl 0,05N. Posteriormente las muestras se filtraron y se midieron a 290 nm.

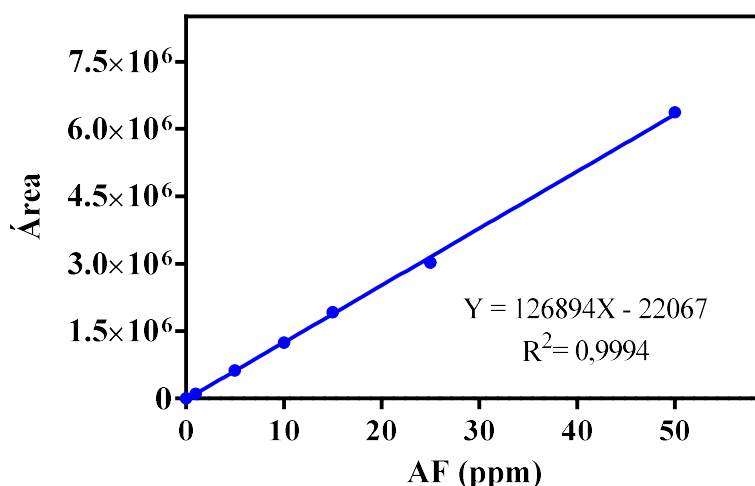


Figura 3.13: Curva de calibración del área en función de la concentración de AF, obtenida mediante HPLC. Los valores se expresan como el promedio de tres repeticiones $\pm$ la desviación estándar.

A continuación, se analizaron los cromatogramas de las muestras con y sin AF para verificar la factibilidad de la medición. Tal como se esperaba, el cromatograma de la muestra con AF mostró el pico característico del AF (**Figura 3.14**) y la muestra que no contenía AF no lo mostró (**Figura 3.15**). De esta manera se pudo asegurar que este tipo de muestras se pueden medir mediante esta metodología. Las muestras se midieron por triplicado de la misma manera que se procedió con la curva de calibración. Los resultados obtenidos de distintas muestras fueron comparados mediante un análisis ANOVA o T-Test, según fue necesario, utilizando el programa GraphPad Prism 6.0.

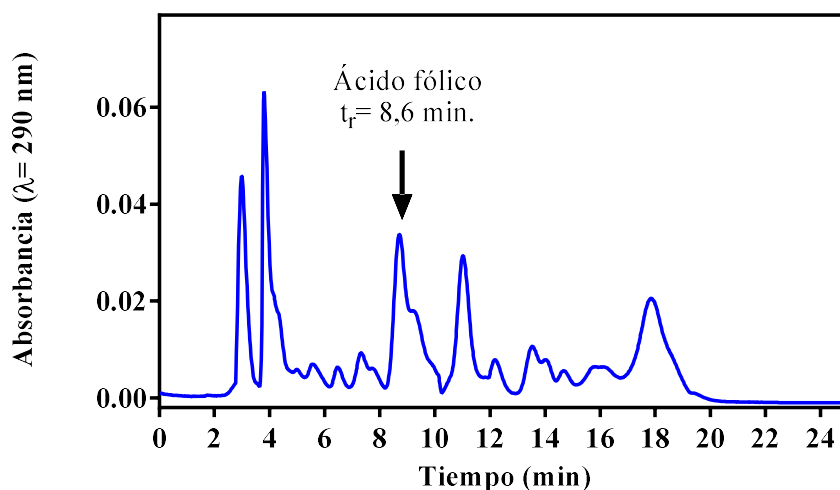


Figura 3.14: Cromatograma correspondiente a la lámina de fruta (Control LC-AF) digerida. La flecha negra señala el pico característico del AF a 8,6 min.

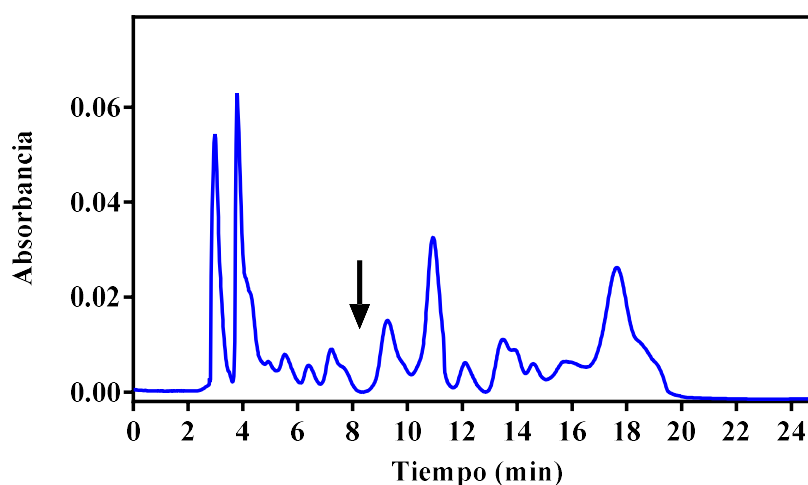


Figura 3.15: Cromatograma correspondiente a la lámina de fruta (Control LC-WPI) digerida. La flecha negra señala la ausencia del pico característico del AF a 8,6 min.

3.3.2.3 Evaluación de la bioaccesibilidad de la vitamina B9.

A partir de los resultados obtenidos mediante la cuantificación de AF obtenido por el método alternativo de HPLC, se calculó la bioaccesibilidad como el porcentaje de AF recuperado posterior a la digestión *in vitro*.

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1 Sección I: Láminas de fruta

4.1.1 Materiales y formulación

4.1.1.1 Análisis fisicoquímicos de los materiales y la formulación fresca

En todo producto a desarrollar es importante caracterizar las materias primas que se utilizarán para lograr que el producto final sea siempre homogéneo y conserve su calidad. Por este motivo, en una primera etapa se realizó la caracterización del puré de manzana, de la formulación fresca de las láminas de fruta y del polvo de acácul. En la **Tabla 4.1** se presentan los resultados de la caracterización de los dos primeros materiales en términos de contenido de sólidos solubles, pH y acidez.

Tabla 4.1: Caracterización fisicoquímica del puré de manzana y de la formulación fresca.

Propiedad	Puré de manzana	Formulación fresca
Sólidos solubles (°Brix, 25 °C)	13,5 ± 0,4 ^b	21,3 ± 0,5 ^a
pH (25 °C)	3,85 ± 0,02 ^a	3,71 ± 0,05 ^b
Acidez total (mg ácido málico/100g)	0,6 ± 0,003 ^b	0,8 ± 0,0 ^a

Valores expresados como la media ± la desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Los valores obtenidos para el puré manzana fueron similares a los informados por Henríquez y col. (2010) para manzanas Granny Smith cultivadas en Chile (**Tabla 1.4**), y a los valores obtenidos por Satıcı (2012), quien reportó sólidos solubles de 13,20 (°Brix), pH 3,10 y acidez 0,77 mg ácido málico/100g de muestra en pulpa de manzanas Granny Smith cultivadas

en Turquía. Este tipo de manzana a menudo suele percibirse sensorialmente más ácida que otros cultivares (Abbott y col., 2004), lo que está relacionado justamente con su valor de acidez. En este sentido, si recurrimos nuevamente a la **Tabla 1.4** se pueden observar que el cultivar Granny Smith fue la manzana que mayor acidez presentó en comparación con otros cultivares estudiados por Henríquez y col. (2010).

Con respecto a la formulación fresca, se hace evidente el efecto de los demás componentes (jarabe de maltitol, polvo de acácul y estevia) dado que el contenido de sólidos solubles resultó ser 1,6 veces mayor que el valor correspondiente al puré de manzana. Por otro lado, se observa que la acidez titulable también aumentó. Esto podría deberse a la incorporación del polvo de acácul, ya que por un lado este fruto presenta alta acidez (**Tabla 1.3**) y por el otro, al ser un ingrediente deshidratado, es posible que los ácidos de la fruta se hubieran concentrado (Dahiya y Dhawa, 2004). No obstante, se puede observar que este pequeño aumento de acidez no se reflejó en el valor de pH, el cual fue levemente menor que el valor correspondiente al puré de manzana.

En cuanto al polvo de acácul, se caracterizó su color en el espacio CIELab obteniéndose los siguientes valores: $L^* = 14,8 \pm 3,4$; $a^* = 2,4 \pm 0,3$ y $b^* = 0,06 \pm 0,03$. Estos resultados sugieren que el polvo de acácul presenta una tonalidad púrpura intensa, tal como se observa en la **Figura 3.2**. Por otro lado, el polvo se caracterizó teniendo en cuenta propiedades vinculadas a la estabilidad del polvo, de manera de asegurar un ingrediente estable y con buenas propiedades físicas. El polvo presentó valores muy bajos de a_w , ($0,18 \pm 0,04$) y de contenido de agua ($2,65 \pm 0,10$ g H₂O/100g de polvo). Adicionalmente, se construyó la isoterma de sorción de agua a 25 °C (**Figura 4.1**). Esta isoterma es una curva que describe la relación termodinámica entre el contenido de agua y la a_w de un alimento (a una temperatura y presión específicas), aportando información sobre su estabilidad (Staniszewska y col., 2020). Estos estudios son muy importantes para establecer el embalaje apropiado y las condiciones de

almacenamiento óptimos a fin de extender la vida útil del producto (Arévalo-Pinedo y col., 2004). En este trabajo, la curva de sorción de agua del polvo de acáchul mostró un comportamiento sigmoideo del tipo II según la clasificación de Gregg y Sing (1982). Este tipo de curvas es típico de los productos con alto contenido de azúcar, ya que adsorben una pequeña cantidad de agua a valores bajos de a_w , mientras que hay un marcado aumento en la cantidad de agua adsorbida a valores altos de a_w (Telis y Sobral, 2001).

Por otro lado, los valores experimentales de la isoterma de sorción de agua se ajustaron al modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-de Boe) (Lewicki, 1997) obteniendo un $R^2 = 0,990$. Esta ecuación es muy utilizada en la caracterización del comportamiento de sorción de agua de materiales alimenticios, ya que permite abarcar un amplio rango de a_w , y, por otro lado, proporciona información sobre el contenido de agua de la monocapa, el cual está relacionado al contenido de agua óptimo para mantener la estabilidad de los alimentos de baja humedad (Gómez Giraldo y col., 2011; Timmermann, 2003). A partir del modelo de GAB se obtuvieron tres parámetros: 1) el valor de humedad de monocapa (m_0) que fue de $2,80 \pm 0,2$ g $H_2O/100g$ polvo en b.s.; 2) el valor de la constante de Guggenheim (c) que fue de 18,3, y 3) el valor de la constante K la cual resultó 1,081. En lo que respecta al valor de m_0 obtenido para el polvo de acáchul, resultó ser menor que los valores reportados para otros polvos de berries. Por ejemplo, Syamaladevi y col. (2009) analizaron un polvo de frambuesa obtenido mediante liofilización y molienda de la fruta y encontraron que la humedad de monocapa fue de 7,40 g de $H_2O/100$ g de polvo. Por otro lado, Gómez Giraldo y col. (2011) estudiaron polvos de moras y obtuvieron valores de m_0 de 5,85 g de $H_2O/100g$ de polvo, habiendo realizado la deshidratación de la fruta en estufa de vacío, y de 6,57 g de $H_2O/100g$ de polvo cuando la deshidratación se llevó a cabo mediante lecho vibrofluidizado.

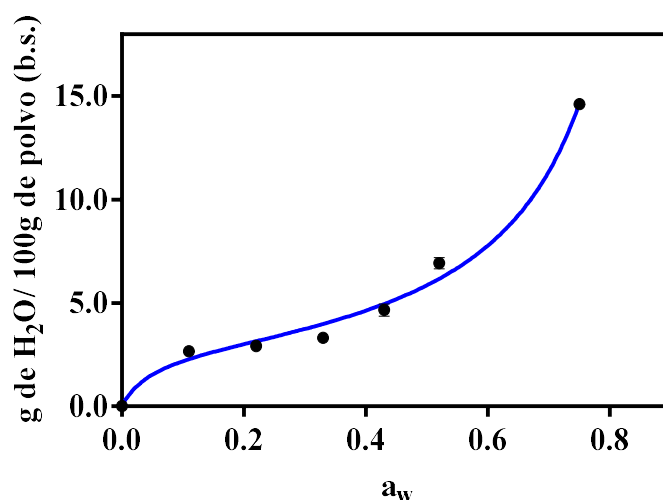


Figura 4.1: Isotherma de sorción de agua del polvo de acáchul a 25 °C. Los puntos negros corresponden a los datos experimentales (promedio $\pm$ desvío estándar) y la línea azul corresponde al ajuste de estos utilizando el modelo de GAB.

Otro aspecto analizado fue la temperatura de transición vítrea (T_g) del polvo de acáchul en función de la a_w . La T_g está asociada a la temperatura en la cual se produce un cambio, pasando de un estado vítreo a un estado de líquido sobreenfriado (Khalloufi y col., 2000; Staniszewska y col., 2020). El conocimiento del comportamiento de la T_g en función de la humedad o de la actividad de agua permite establecer las condiciones adecuadas para el almacenamiento evitando la ocurrencia de cambios físicos indeseables (Mrad y col., 2013; Staniszewska y col., 2020). En el caso de los polvos, el estado líquido sobreenfriado está asociado a fenómenos como pegajosidad, apelmazamiento y colapso estructural (Martínez y col., 2000), siendo características no deseables en este tipo de productos. En la **Figura 4.2** se muestra la curva de T_g versus a_w obtenida para el polvo de acáchul. En la misma se puede observar que a medida que aumenta la a_w hasta valores cercanos a 0,4, la T_g disminuye abruptamente, debiéndose principalmente al efecto plastificante del agua (Vásquez y col., 2013). Además, se observa una línea punteada que señala la temperatura ambiente (25 °C). Este dato es importante porque indica que el polvo de acáchul podría mantenerse perfectamente

en estado vítreo a temperatura ambiente, siempre y cuando se encuentre almacenado a una a_w inferior a 0,43. En este sentido, una a_w apropiada para almacenar este producto podría ser 0,33, ya que el valor de T_g se presentaría a los 62 °C, evitando la ocurrencia de cambios físicos del producto a temperatura ambiente.

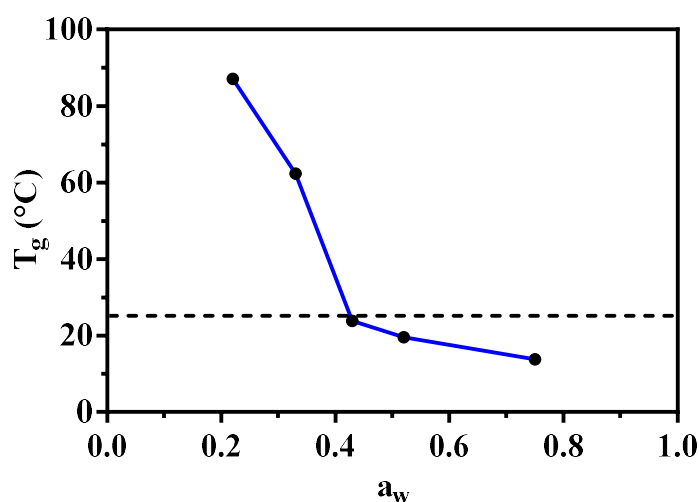


Figura 4.2: Valores de temperatura de transición vítrea (T_g) (promedio $\pm$ desvío estándar) en función de la a_w .

4.1.1.2 Caracterización del potencial bioactivo de los materiales y la formulación

Además de caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los materiales y de la formulación fresca, también se evaluaron compuestos con potencial bioactivo. En este sentido, se estudió el contenido de polifenoles totales (CPT) y la capacidad antioxidante (CA) en el puré de manzana, en el polvo de acáchul, en la formulación fresca (formulación c/acáchul), y también en una formulación control que contenía todos los ingredientes menos el polvo de acáchul (formulación s/acáchul). Adicionalmente, se cuantificó el contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) en los materiales que presentaban estos compuestos. En la **Tabla 4.2**, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.2: Caracterización de los compuestos bioactivos (AMT y CPT) y la capacidad antioxidante (CA) de las materias primas y las formulaciones.

	Polvo de acáchul	Puré de manzana	Formulación s/ acáchul	Formulación c/ acáchul
AMT (mg cia-3-O-glu/g)	22,4 ± 0,8	-	-	0,11 ± 0,004
CPT (mg EAG/g)	70,9 ± 3,8	0,79 ± 0,13	0,44 ± 0,07	1,41 ± 0,14
CA: ABTS (mg EAG/g)	23,7 ± 3,0	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,012	0,41 ± 0,02
CA: FRAP (mg EAG/g)	30,3 ± 2,6	0,20 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,48 ± 0,03

Valores expresados como la media ± la desviación estándar.

El polvo de acáchul mostró valores muy elevados de AMT, CPT y CA, lo cual es esperable ya que las berries son frutas conocidas por ser fuente muy rica de una amplia variedad de compuestos bioactivos (Hariram-Nile y Park, 2014; Skrovankova y col., 2015; Zorzi y col., 2020). Sumado a esto, Joaquín-Cruz y col. (2015), pioneros en investigar el fruto de acáchul, reportaron un contenido de aproximadamente 4 veces más de CPT y 3,5 veces más de CA que otras berries popularmente más consumidas como frutilla, mora y arándano, y también reportaron que contenía 56 veces más de AMT que la frutilla y 4 veces más que el arándano. En lo que respecta a los valores hallados para el polvo de acáchul, es difícil realizar una comparación directa de todos los resultados debido a que son pocas las investigaciones realizadas sobre esta fruta (Martínez-Banco y col., 2019). No obstante, López-Yerena y col. (2017) utilizaron la pulpa sin semillas del acáchul (similar a este trabajo), y la deshidrataron mediante liofilización con el fin de elaborar un polvo de acáchul. Entre sus resultados se encuentra que los valores obtenidos de CPT y el contenido de AMT fueron similares a los que

se muestran en la **Tabla 4.2** (CPT= $63,0 \pm 8,6$ g EAG/g polvo; AMT= $29,0 \pm 1,47$ cia-3-O-glu/g polvo).

En cuanto al puré de manzana, el valor obtenido de CPT fue mayor al reportado por Ergün (2021) (CPT= $0,31 \pm 0,01$ mg EAG/g), pero menor al hallado por Picouet y col. (2009) ($1,12 \pm 0,05$ mg EAG/g). Esta variación posiblemente esté relacionada con la heterogeneidad de los suelos, cultivos, tiempos de cosecha y las diferentes condiciones climáticas (Imeh y Khokhar, 2002; Boyer y Liu, 2004; Saxena y col., 2016; Musacchi y Serra, 2018).

Con respecto a las formulaciones de las láminas de fruta, se observa que el uso de 1% de polvo de acácul aumentó notablemente los valores de AMT, CPT y CA en comparación con la formulación fresca sin adición de polvo de acácul. No obstante, es importante destacar la diversidad fitoquímica que posee la manzana (Boyer y Liu, 2004; Khanizadeh y col., 2008; Francini y Sebastiani, 2013), la cual podría contribuir al perfil bioactivo del producto final. Además, muchos compuestos bioactivos de esta fruta podrían tener efectos positivos en la salud de los consumidores (Saxena y col., 2016; Barreira y col., 2019).

4.1.2 Láminas de fruta:

4.1.2.1 *Análisis fisicoquímico*

El procedimiento empleado para el desarrollo de las láminas de fruta y las condiciones de secado (tiempo y temperatura) se optimizaron en el laboratorio teniendo en cuenta diversas referencias bibliográficas mencionadas en la **Tabla 1.1**. Cabe destacar que no existe un procedimiento estándar para el desarrollo de este tipo productos, ya que influyen diversas variables tales como las materias primas utilizadas en la formulación, la cantidad de agua inicial, el espesor que se desea tener en el producto final, la temperatura de secado, la actividad de agua final, en otros (**Tabla 1.1**). Esta amplia variabilidad se ve reflejada en los tiempos de

secado, encontrándose desarrollos de láminas de fruta con tiempos de secado desde 4,37 h (Demarchi y col., 2013) hasta 24 h (Che-Man y col., 1997). Existen reportes sobre procedimientos para disminuir los tiempos de secado, como Gujral y Brar (2007) que incorporaron concentrado de soja, leche en polvo y sacarosa en las formulaciones de láminas de mango y lograron reducir hasta una 1 h el tiempo de secado. En este trabajo, se buscó alcanzar un valor de $a_w = 0,45 \pm 0,1$ para obtener un producto que fuera microbiológicamente estable a temperatura ambiente (Tontul y Topuz, 2018), para ello el tiempo total empleado fue de $6,0 \pm 0,5$ h a 60°C .

Las láminas de manzana y acáchul presentaron una humedad a la salida del equipo de secado de $12,10 \pm 1,0$ g $\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$ de muestra. Este contenido de agua fue levemente superior al valor reportado por Phimpfarian y col. (2011) en láminas de piña (humedad de 10,3 g $\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$ de producto), cuya a_w era similar a la de este trabajo.

Por otro lado, también se caracterizó la coloración de las láminas de frutas mostrando los siguientes parámetros cromáticos (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3: Parámetros cromáticos de las láminas de frutas.

Parámetro	Valor
L^*	$32,2 \pm 4,0$
a^*	$13,4 \pm 2,9$
b^*	$1,9 \pm 0,4$
Ángulo de tono ($^\circ$)	8
croma	13,5

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

Diamante y col. (2013), elaboraron diferentes láminas deshidratadas de manzana y grosella negra, en las cuales variaron los porcentajes de cada fruta en las formulaciones, y reportaron valores de croma entre 4 y 19. Según estos autores, la intensidad del rojo/púrpura que presentaban sus muestras estaba relacionado al aumento del croma. En el caso de las láminas de manzana y acáchul (**Figura 4.3**), la tonalidad observada también fue rojo/púrpura intenso. Esta coloración fue consecuencia de la adición del polvo de acáchul, dado que como se mostró en la **Tabla 4.2** fue muy rico en pigmentos antociánicos. Asimismo, los valores obtenidos fueron cercanos a los reportados por Karki (2011) para láminas de arándanos $L^*=28,5 \pm 0,2$; $a^*=1,7 \pm 0,1$ y $b^*=-0,1 \pm 0,1$, quien adjudicó también la coloración rojiza intensa a las antocianinas provenientes del arándano.



Figura 4.3: Apariencia de la lámina de manzana y acáchul.

En las láminas de frutas deshidratadas, la textura es un parámetro de gran relevancia porque debe parecerse a un cuero natural (de allí su nombre en inglés “fruit leather”). Además, las propiedades mecánicas deben ser lo suficientemente resistentes para mantener su integridad durante la manipulación en el procesamiento y envasado (Valenzuela y Aguilera, 2013). En este sentido, los estudios mecánicos mediante ensayos instrumentales de fuerza-deformación suelen ser ampliamente utilizados para caracterizar los alimentos sólidos (Lu y Abbott, 2004). En este trabajo, la textura de las láminas de fruta se estudió utilizando una máquina de ensayos

universales mediante un test de punción. En la **Figura 4.4** se muestra, a modo de ejemplo, una curva de fuerza vs distancia obtenida durante un ensayo realizado sobre láminas de manzana y acáchul.

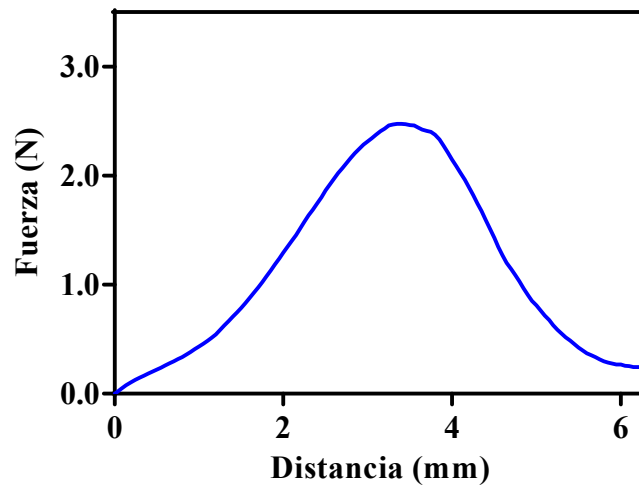


Figura 4.4: Curva fuerza vs distancia de la lámina de fruta.

Se puede observar que la fuerza de penetración ($F_{\max}$) aumentó progresivamente hasta alcanzar un valor máximo correspondiente a $3,69 \pm 0,44$ mm, siendo la energía de deformación liberada hasta ese punto (o dureza del material) de $4,5 \pm 1,2$ J. Valenzuela y Aguilera (2015) reportaron valores similares de $F_{\max}$ (1,0-3,0 N) en láminas de manzana almacenadas en diferentes condiciones de humedad relativa (0-75%). Además, la curva mostró una forma redondeada, lo que sugiere que la lámina de fruta opuso cierta resistencia a la ruptura. También se observa que la línea es continua y suave, comportamiento típico de un material no crujiente. Estos resultados fueron consistentes con las características esperadas para este tipo de golosina, que generalmente son suaves y gomosas (Raab y Oehler, 1986).

4.1.2.2 Composición centesimal

La importancia de evaluar la composición centesimal de un alimento es conocer cuáles son los nutrientes que lo constituyen y cuánta energía aportan a la dieta (Pita Martín de Portela, 2006). Además, el Código Alimentario Argentino (CAA) en el capítulo 5 (Res. GMC 46/03) establece como obligatorio declarar en el rótulo de los productos alimenticios el contenido cuantitativo de los nutrientes y su valor energético. Teniendo en cuenta esto, se analizaron los macronutrientes provenientes de las láminas de frutas (**Tabla 4.4**).

Tabla 4.4: Composición centesimal de las láminas de fruta.

Componentes	g/100g de lámina de fruta
Hidratos de Carbono	70,03 ± 4,6
Fibra dietaria Total	5,29 ± 0,69
Contenido de proteínas	0,88 ± 0,20
Contenido de grasa	0,12 ± 0,03
Contenido de cenizas	4,70 ± 0,67

Valores expresados como la media ± la desviación estándar.

De los macronutrientes analizados, los hidratos de carbono se destacaron por presentarse en mayor proporción y, por otro lado, las grasas y las proteínas mostraron los valores más bajos. Estos resultados están relacionados a los materiales frutales utilizados en la formulación, ya que se encontraban en más de un 90% sobre el total de ingredientes. Además, los ingredientes frutales aportaron un interesante contenido de fibra (**Tabla 4.4**), obteniéndose valores cercanos a los reportados por Cappa y col. (2015) en el desarrollo de golosinas frutales altas en contenido de fibra ($\approx 6\text{g}/100\text{g}$ producto). En este sentido, se ha demostrado que una ingesta de fibra elevada se asocia con el control del peso corporal, la reducción de riesgos de enfermedades coronarias (Slavin, 2005; Thompson, 2000; Cappa y col., 2015), la prevención

del estreñimiento, el control de la absorción del colesterol sérico, la prevención del cáncer intestinal y colon, y la promoción de microorganismos beneficiosos (Perry y Ying, 2016; Merenkova y col., 2020).

Adicionalmente, en función de la composición de las láminas de fruta (**Tabla 4.4**), se determinó el aporte energético total resultando de 284,7 Kcal/100g de producto y de 12,2 Kcal por unidad de lámina de frutas (aproximadamente 4,4 g). En cuanto a la porción, existen productos similares comerciales a nivel internacional (por ejemplo, “Fruit Snack Frutina”) que presentan a una porción como 20 g del producto. Teniendo en cuenta esta referencia, el aporte energético resulta de 56,9 Kcal/ porción. En una dieta 2000 Kcal/día, el consumo de una porción aportaría 2,8% de los valores energéticos diarios recomendados (%VD). Este aporte se debe mayoritariamente a las frutas y no a endulzantes comerciales utilizados comúnmente en la industria de golosinas, como sacarosa, glucosa, jarabes, entre otros (Vázquez-Sánchez y col., 2019), dado que de los componentes que integran estas golosinas, las frutas aportan un 82% del total de las calorías, y el jarabe de maltitol el 18% restante. Otro aspecto por destacar es que teniendo en cuenta una persona de 60 Kg esta porción representa sólo el 7% de la ingesta diaria admisible (IDA) de estevia. Por lo tanto, este producto podría ser considerada una “golosina saludable” ya que presenta bajo poder calórico, un interesante aporte de fibra, nutrientes provenientes de las frutas y además contiene un porcentaje de estevia muy bajo respecto al valor de IDA.

4.1.2.3 Caracterización del potencial bioactivo

La caracterización de las láminas de fruta consistió en estudiar las mismas propiedades evaluadas en las materias primas: contenido de antocianinas monoméricas (AMT), contenido de polifenoles totales (CPT), y la capacidad antioxidante (CA). La **Figura 4.5** muestra los

resultados obtenidos para las láminas de frutas, comparándolos con los obtenidos para la formulación fresca. En este caso, la expresión de los resultados se realizó sobre base seca para poder realizar una comparación adecuada de las muestras.

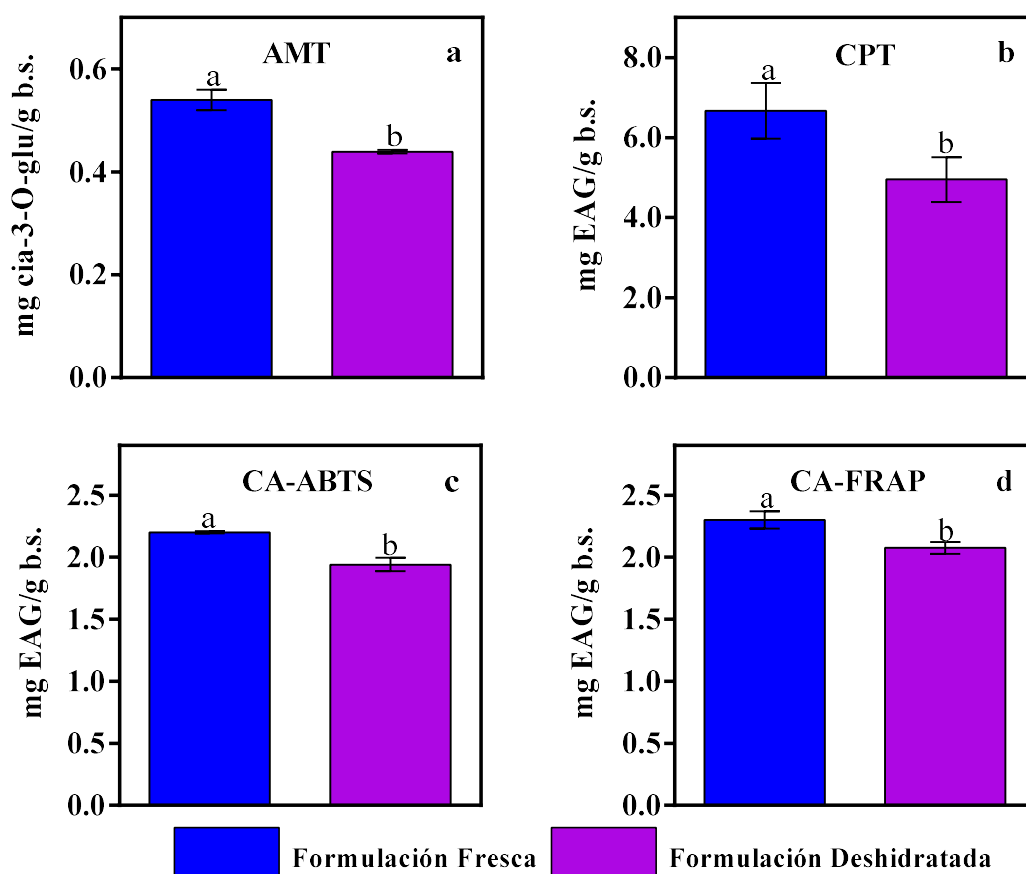


Figura 4.5: Contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) (a), polifenoles totales (CPT) (b), capacidad antioxidante medida mediante los métodos ABTS (c) y FRAP (d).

Diferentes letras indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Se observa que tras el proceso de deshidratación las AMT (**Fig. 4.5-a**) y los CPT (**Fig. 4.5-b**) disminuyeron levemente, mostrando pérdidas de 20% y 25% respectivamente. Esta pérdida se ve reflejada en los compuestos con CA, dado que también mostraron una disminución del 12% para ABTS (**Fig. 4.5-c**) y del 10% en el caso del ensayo de FRAP (**Fig. 4.5-d**). En este sentido, diversos trabajos han reportado la reducción de compuestos bioactivos

debido al proceso de deshidratación de las láminas de fruta. Por ejemplo, Torres y col. (2015) reportaron pérdidas de 31% de CPT y 42% de CA en láminas de manzana y membrillo; Quinteros-Ruiz y col. (2014) obtuvieron pérdidas del 81% para CPT y del 60% de la CA en láminas de rosa mosqueta; y Demarchi y col. (2013) quienes estudiaron los efectos de la temperatura en el desarrollo de láminas de manzana probando diferentes tecnologías de secado y temperaturas, encontraron que, en la situación más favorable, la retención de los compuestos con CA fue de 16%. Por lo tanto, las pérdidas de los compuestos bioactivos son frecuentes en el desarrollo de este tipo de productos.

4.1.2.4 Bioaccesibilidad de los compuestos potencialmente bioactivos

Desde hace varios años se observa que la caracterización de los compuestos bioactivos de un alimento no alcanza para describir los efectos que podrían tener sobre la salud, ya que se ha encontrado que la matriz y la forma en que se encuentran esos compuestos interfieren en gran medida en la absorción intestinal y finalmente podrían no llegar al destino esperado (Pastoriza y col., 2011; Santos y col., 2020). Es decir que según la composición del alimento se puede modificar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de estos compuestos. En este sentido, Kamiloglu y col. (2014) determinaron la bioaccesibilidad de la CA de frutos secos y encontraron que para el higo fue de 41% y para durazno deshidratado de 32%, exponiendo las diferencias que se pueden encontrar según el tipo de alimento. Teniendo en cuenta este contexto, se estimó la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos (AMT y CPT) y de los compuestos con capacidad antioxidante (ABTS y FRAP), sometiendo a la lámina de fruta a una simulación del proceso gastrointestinal (Minekus y col., 2014). En la **Figura 4.6** se comparan los resultados obtenidos para las láminas sin digerir (SD) y para las láminas sometidas a la digestión *in vitro* (D).

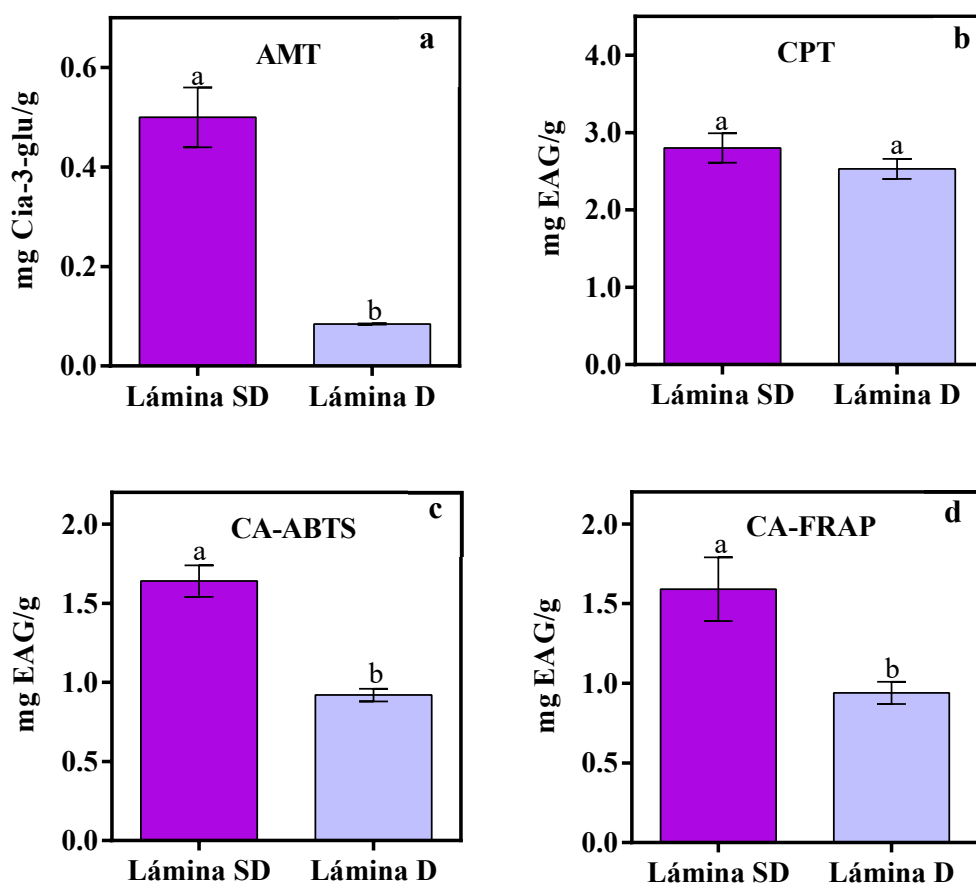


Figura 4.6: Contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) (a), polifenoles totales (CPT) (b), capacidad antioxidante medida mediante los métodos ABTS (c) y FRAP (d) obtenidos para las láminas sin digerir (lámina SD) y digeridas (lámina D). Diferentes letras indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Por un lado, se observa que las AMT (**Fig. 4.6-a**) disminuyeron notablemente, alcanzando sólo un 17% de bioaccesibilidad de estos compuestos. Por otro lado, la bioaccesibilidad de los polifenoles (**Fig. 4.6-b**) y de los compuestos con CA (**Fig. 4.6-c** y **4.6-d**) resultaron en 90% y 50%, respectivamente. Observando estos últimos valores, se podría pensar que la matriz de la lámina de la fruta tuvo un efecto protector sobre la mayoría de los compuestos antioxidantes, evitando su degradación durante la digestión gastrointestinal. Sin embargo, al observar los resultados de las AMT, es posible que hubiera cambios durante la

digestión. En este sentido, Gómez-Mattson y col. (2021) reportaron que luego de la digestión *in vitro* de polvo de sauco, las AMT disminuyeron entre un 50 y un 80% y, por otro lado, obtuvieron una recuperación de los compuestos con CA de aproximadamente 50%. Según estos autores la disminución de las AMT podría deberse a la rotura del anillo de las antocianinas debido a las condiciones alcalinas en la fase intestinal. Este mecanismo ha sido descrito por Castañeda-Ovando y col. (2009), quienes señalan que, al aumentar el pH de las antocianinas por encima de 5, el carbono 2 del anillo pyrilium sufre un ataque nucleofílico desencadenado por el agua. En consecuencia, se pierden dos electrones, y se rompe el anillo formando en primer lugar una base hidratada y posteriormente, al subir el pH por encima de 6, una chalcona. Esto explicaría en parte que el contenido de CPT se haya mantenido luego de la digestión, ya que las chalconas son flavonoides. Sin embargo, se debe considerar que puede existir un balance entre los polifenoles degradados, los generados por cambios estructurales de las moléculas como es el caso de las antocianinas y los liberados desde la matriz del alimento debido al efecto de la digestión.

En cuanto a la CA obtenida de la fracción insoluble luego de la digestión *in vitro*, se obtuvo un valor de $134,53 \pm 10,4$ mg EAG/g de lámina de fruta. Este valor fue mucho más alto de lo esperado, sin embargo, estos resultados se encuentran en concordancia con Archaina y col. (2019), quienes reportaron que la CA del residuo obtenido luego de la digestión *in vitro* de unos bocaditos de grosella negra liofilizados, aumentó casi 14 veces con respecto al valor obtenido sin digerir el bocadito. Sin embargo, según estos autores, la mayor parte del bocadito luego de la digestión *in vitro* pasó a ser parte de la fracción insoluble, tal como sucedió con las láminas de fruta en las que el precipitado correspondió a un 80% de la muestra. Lo interesante de este resultado, es que los compuestos con CA dirigidos al colon podrían ser benéficos, ya que según Wu y col. (2015), una vez en el intestino grueso o en el colon, estos compuestos pueden biotransformarse y absorberse. En este punto, se debe tener en cuenta el papel que

cumple la microbiota colónica, la cual se encarga de procesar la mayoría de los flavonoides no absorbidos en el intestino delgado y transformarlos en especies bioaccesibles (Santos y col., 2020). Además, la presencia de esta fracción insoluble podría resultar beneficiosa para la microbiota, puesto que recientes evidencias científicas apuntan a que ciertos polifenoles podrían ejercer su acción beneficiosa actuando como prebióticos a través de la modulación de la microbiota fomentando la proliferación de bacterias beneficiosas (Van Hul y Cani, 2019; Liu y col., 2019).

4.1.2.5 Análisis sensorial

4.1.2.5.1 Estudio sensorial cualitativo

Con la finalidad de evaluar la percepción de los consumidores sobre las láminas de fruta se realizó un estudio sensorial cualitativo utilizando la técnica proyectiva de asociación de palabras. En esta técnica los participantes deben manifestar lo primero que piensan sobre el producto expuesto, permitiendo con sus respuestas identificar el vocabulario con el cual los consumidores asocian al producto de interés (Archaina y col., 2019; Vázquez-Sánchez y col., 2021). En este ensayo, se obtuvieron un total de 489 palabras mencionadas por 359 participantes. La **Figura 4.7** muestra una nube de palabras con los resultados obtenidos.



Figura 4.7 Nube de palabras. Se muestran las diferentes palabras mencionadas por los participantes (n=359) como parte de los resultados del análisis sensorial cualitativo.

A partir de las respuestas de los participantes, las palabras mencionadas se agruparon en categorías teniendo en cuenta el significado de cada una de ellas. Las categorías que surgieron fueron: Saludable, Interesante, Novedoso, Sorprendente, Agradable, Rico, Prometedor, Poco atractivo, Desconocido y Raro. Adicionalmente, se evaluó el porcentaje de mención de cada categoría. La **Figura 4.8** muestra los resultados obtenidos.

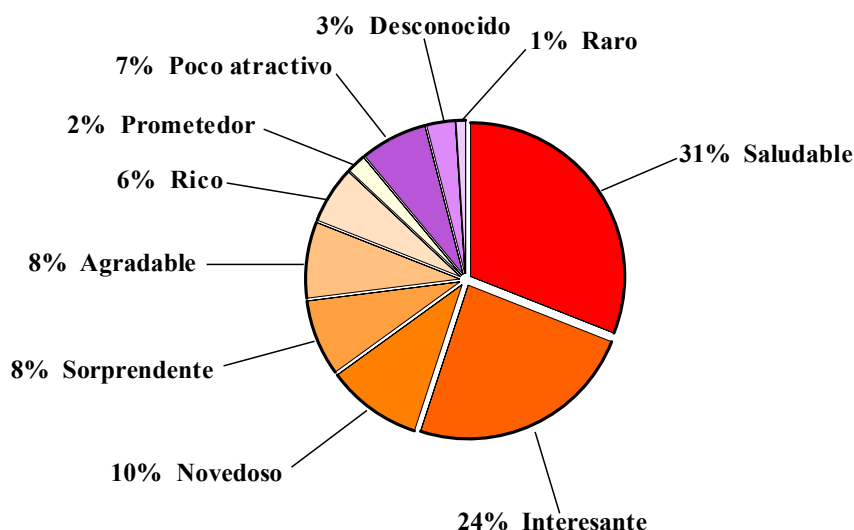


Figura 4.8: Categorías identificadas a partir de los resultados del análisis sensorial cualitativo con sus porcentajes de mención.

Los resultados mostraron que el 89% de las palabras mencionadas pertenecía a categorías de agrado (saludable, interesante, novedoso, sorprendente, agradable, rico, prometedor), por otro lado, el 4% consideró el producto "raro" y "desconocido" y solo el 7% de los participantes lo consideró "poco atractivo". Por lo tanto, según este estudio las láminas de frutas tal como se formularon podrían ser aceptadas por los consumidores.

Además de evaluar la percepción de los participantes sobre las láminas de fruta, se consultó la intención de compra de este producto. Los resultados mostraron que el 73% de los participantes reportaron intención de comprar la lámina de fruta, mientras que el 24% indicó que podría comprarla y solo el 3% mencionó que nunca la compraría. Estos resultados sugieren que el producto podría tener una buena aceptación en el mercado local.

4.1.2.5.2 Análisis sensorial cuantitativo

Los parámetros sensoriales son una de las propiedades más importantes de los productos alimenticios ya que brindan información sobre si el producto será aceptado por los consumidores y si tiene posibilidades de instalarse en el mercado o si es necesario reformularlo (Cardenas-Mazón y col., 2018). En este sentido, las pruebas afectivas permiten cuantificar el agrado o disgusto de un producto a partir de la utilización de escalas hedónicas (Lawless y Heimann, 2010). En este trabajo, 96 personas degustaron las láminas de frutas e indicaron el grado de satisfacción global y de cada atributo que presentaban estas golosinas, y por otro lado expresaron el grado de intensidad percibido de cada atributo.

4.1.2.5.2.1 Evaluación del grado de satisfacción global y por atributo

En la prueba de evaluación del grado de satisfacción global, el 92% del total de respuestas se distribuyeron entre las opciones de agrado: "Me gusta levemente" 23%, "Me gusta" 50% y "Me gusta mucho" 19%, y sólo el 4% de las respuestas se encontraron dentro de las opciones de disgusto (Me disgusta levemente 1%, me disgusta 1% y me disgusta mucho 2%). por lo tanto, la aceptabilidad general de este producto fue muy alta. En la **Figura 4.9** se muestran los resultados obtenidos.

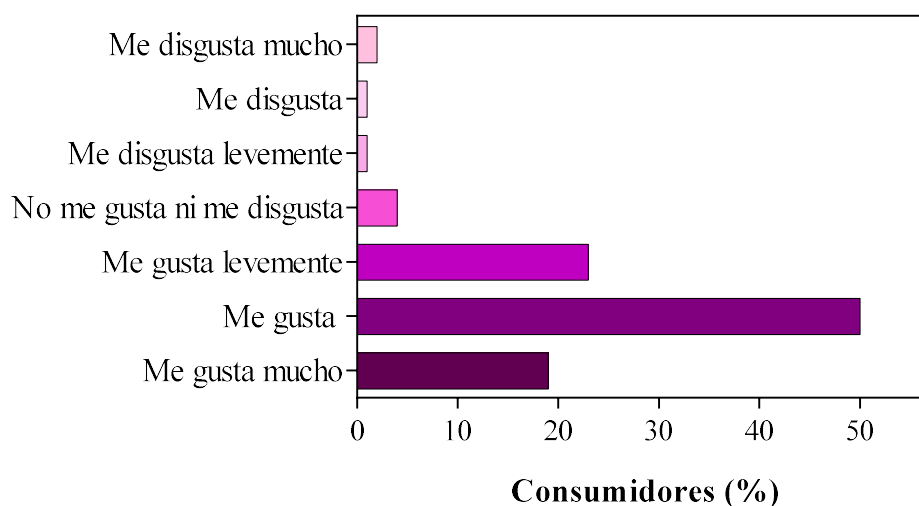


Figura 4.9: Grado de satisfacción global de las láminas de fruta (96 consumidores).

Por otro lado, los resultados de la evaluación del grado de satisfacción por atributos (**Figura 4.10**) también fueron positivos, dado que un alto porcentaje de respuestas (70-80%) expresaron opciones de agrado ("me gusta levemente" y "me gusta") en los atributos evaluados. Del porcentaje restante, entre 7 y 16% seleccionaron la opción "No me gusta ni me disgusta" y solo entre el 8 y el 13% eligieron las opciones de desagrado: "Me disgusta levemente" y "Me disgusta".

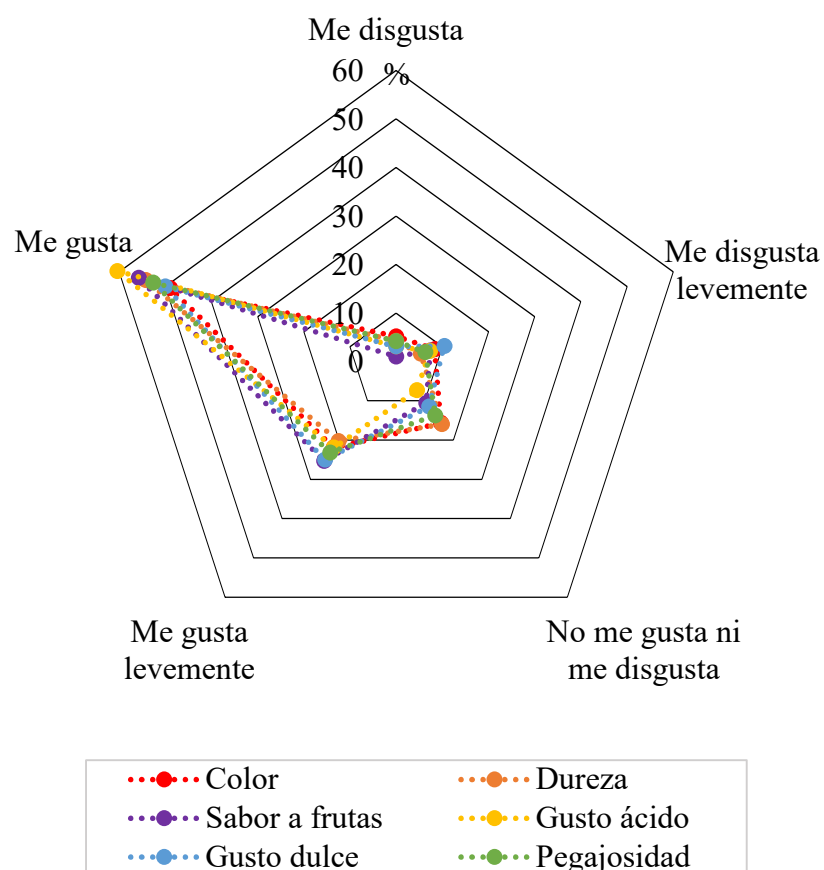


Figura 4.10: Evaluación del grado de satisfacción por atributo de las láminas de fruta.

4.1.2.5.2.2 Evaluación de la intensidad de los atributos

Además de evaluar el grado de satisfacción, también se estudió la intensidad que presentaban los atributos en las láminas de fruta. Para ellos se utilizó la escala JAR (*Just-About-Right*) la cual permite determinar la intensidad de cada atributo según la percepción de los consumidores. La **Figura 4.11** muestra los resultados obtenidos.

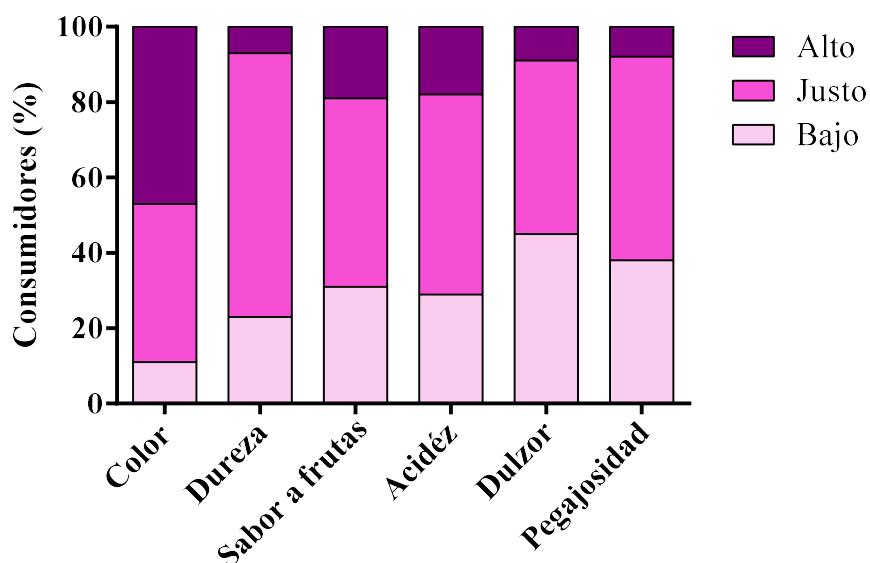


Figura 4.11: Porcentaje de consumidores que seleccionaron los diferentes niveles en la escala JAR para cada atributo de las láminas de fruta.

Se puede observar que un alto porcentaje de consumidores consideró que la intensidad de muchos de los atributos estudiados de las láminas de frutas era “justa”. Es así, que para la dureza un 70% consideró que este atributo estaba justo, para el sabor a frutas un 53%, para la acidez un 50%, para el color 42%, para el dulzor 46% y para la pegajosidad un 46%. Aunque todos estos porcentajes son altos, se puede observar que los últimos tres atributos mencionados obtuvieron en la categoría “justo” menos del 50%. En este sentido, un porcentaje significativo de consumidores consideró que el color tenía una intensidad alta (47%), y la acidez y dulzura presentaron una intensidad baja (45% y 38%, respectivamente). Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos en el grado de satisfacción del producto, se puede observar que, si bien algunos de los consumidores consideraron que estos atributos no estaban en el punto correcto, el 70% se mostró satisfecho con estos atributos. Todos estos resultados sugieren que no serían necesarios cambios en la formulación de las láminas de fruta y que el producto podría tener un alto potencial para ser considerado un prototipo para su lanzamiento al mercado.

4.1.2.6 Estabilidad

Los cambios fisicoquímicos de las láminas de fruta se estudiaron durante aproximadamente 6 meses (184 días) de almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C). En la **Figura 4.12** se muestran los resultados obtenidos respecto a la evolución de a_w y el contenido de agua de las láminas de fruta durante el almacenamiento.

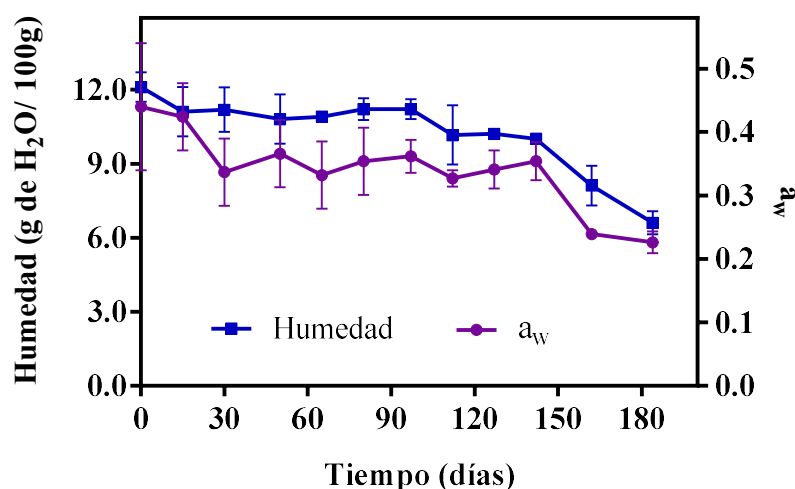


Figura 4.12: Variación de la a_w y el contenido de agua de las láminas de fruta durante 6 meses de almacenamiento a 25 °C.

Se observa que la a_w y el contenido de agua de las láminas de frutas disminuyeron conforme avanzó el periodo del almacenamiento. Sin embargo, a partir de aproximadamente 5 meses esta disminución fue significativa, alcanzando un 30% de pérdida de humedad y 47% de pérdida de a_w . Desde el punto de vista de la estabilidad microbiológica, no se esperaría que se deterioren dado que se trata de un producto con $a_w < 0,6$ (Azeredo y col., 2006; Tontul y Topuz, 2018), sin embargo, a nivel textural se generaron cambios ya que se pudo percibir visualmente y a través del tacto que las láminas de fruta almacenadas más de cinco meses estaban duras y quebradizas. Según Diamante y col. (2014) las variables más influyentes en la estabilidad de las láminas de frutas son la temperatura de almacenamiento y el material

utilizado en el embalaje del producto. En este sentido, Iriwandi y col., (1998) estudiaron el efecto que tenían cuatro materiales de embalaje (laminado de aluminio, polipropileno, polietileno de alta densidad y polietileno de baja densidad) durante el almacenamiento a temperatura ambiente de láminas de durián, y reportaron que al cabo de 12 semanas en todos los casos observaron pérdida de humedad y aumento de la dureza. En esta misma línea, Giacalone y col. (2019), realizaron un estudio de vida útil acelerado de láminas de fruta a base de kiwiño (baby kiwi) y manzanas Granny Smith y reportaron que las muestras perdieron peso durante el almacenamiento, posiblemente debido a un efecto de deshidratación. Sin embargo, también observaron un fuerte retraso de la pérdida de humedad cuando las láminas se encontraban envasadas con láminas de polietileno.

Por otro lado, también se evaluaron los cambios en el color superficial de las láminas de fruta en función del tiempo de almacenamiento. Este estudio es muy importante debido a que la aceptación por parte de los consumidores está relacionada a la apariencia visual, y cualquier cambio perceptible podría ocasionar el rechazo del producto (Maskan y col., 2002). En la **Figura 4.13** se muestra la evolución en el tiempo de los valores de L^* , a^* b^* de las láminas de fruta.

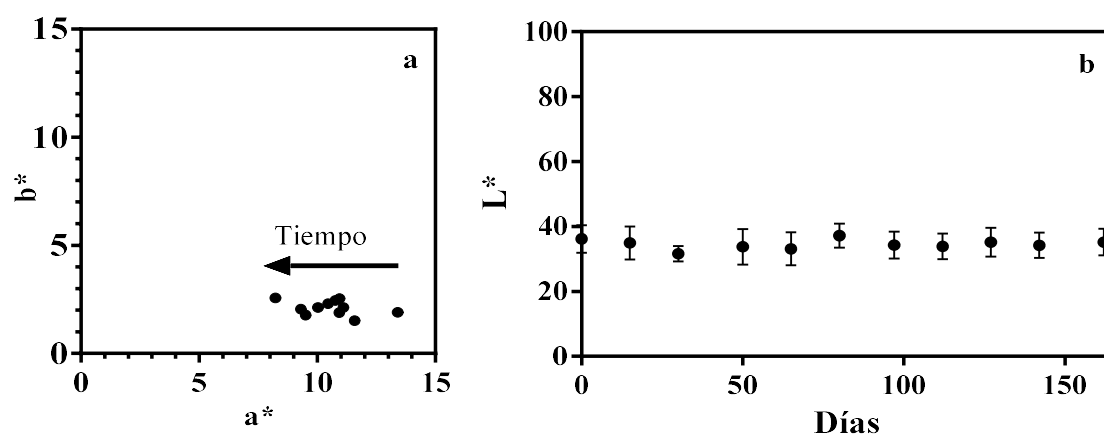


Figura 4.13: Evaluación del color de las láminas de frutas durante 6 meses de almacenamiento. a) Evolución de los parámetros a^* y b^* durante el almacenamiento; b) Variación del parámetro L^* en función del tiempo.

Durante el almacenamiento de láminas de frutas, frecuentemente la coloración se ve afectada debido a reacciones de pardeamiento no enzimático (Maillard). Estas reacciones se ven favorecidas en alimentos con bajas a_w , azúcares reductores y compuestos que presenten grupos aminos (Quinteros-Ruiz y col., 2012). Este efecto en la coloración de láminas de fruta fue reportado por diversos autores. Kumar y col. (2010) elaboraron láminas de papaya y encontraron que al cabo de cuatro meses no fueron sensorialmente aceptables debido a la coloración parda que presentaron las muestras. Quinteros-Ruiz y col., (2012) realizaron un estudio acelerado de la vida útil de láminas de manzana y reportaron que el índice de pardeamiento aumentó significativamente durante el tiempo de estudio. Giacalone y col. (2019) observaron que los valores de L^* disminuyeron y los pigmentos pardos aumentaron durante el tiempo de almacenamiento de láminas de manzana y kiwiño. En el caso de las láminas de manzana y acáchul, se puede observar que sólo el parámetro a^* disminuyó durante el tiempo de almacenamiento, mientras que b^* y L^* se mantuvieron sin cambios significativos (**Figura 4.13**). Esto también fue visualizado mediante el ángulo de tono, que empezó con un valor de 8° y al finalizar el tiempo de almacenamiento presentó un valor de 11° . Estos resultados sugieren que los cambios en el color de las láminas fueron leves, por lo que, si hubo reacciones de pardeamiento, estas no afectaron la apariencia de las láminas. En este sentido, la utilización del polvo de acáchul en la formulación de las láminas de fruta fue beneficiosa no sólo por el aporte de compuestos bioactivos, sino que también por mantener estable la coloración del producto durante el tiempo de almacenamiento.

En cuanto a los compuestos potencialmente bioactivos, la **Figura 4.14** muestra los resultados obtenidos para las AMT, CPT y CA en el transcurso de los 6 meses de almacenamiento.

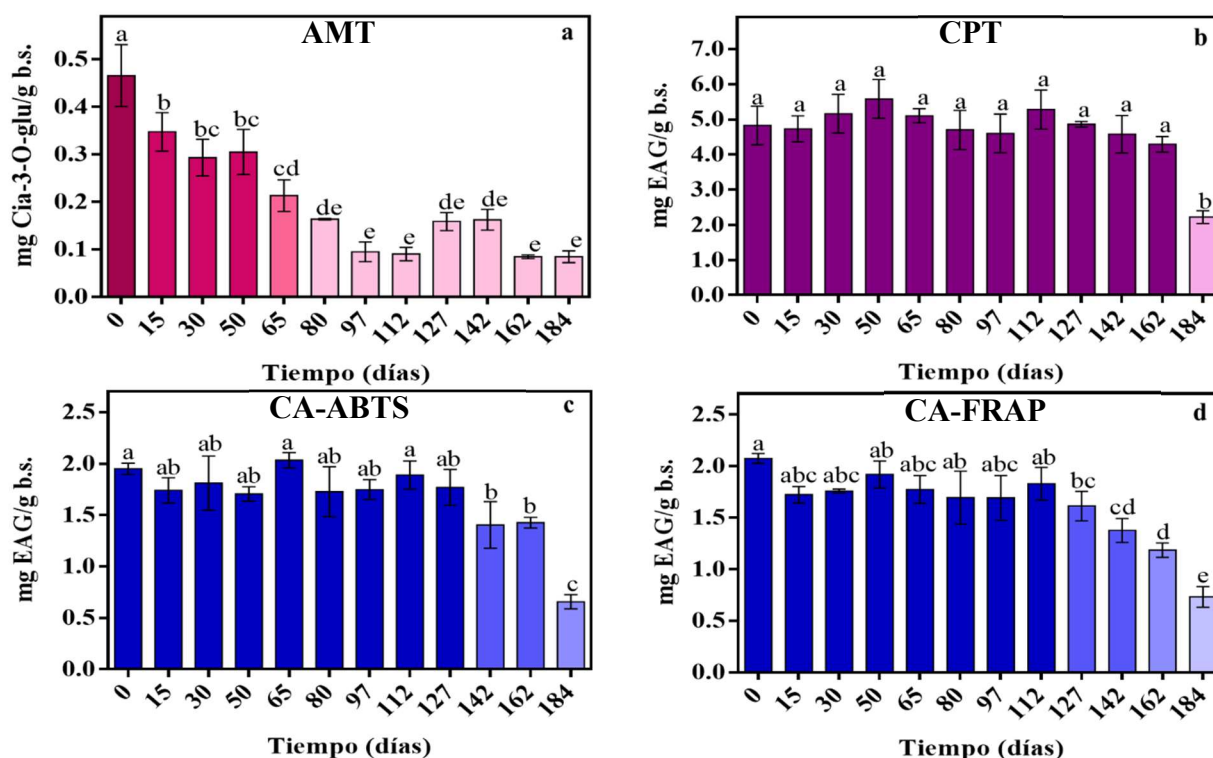


Figura 4.14: Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de las láminas de fruta durante 6 meses de almacenamiento. a) AMT; b) CPT; c) CA (ABTS); d) CA (FRAP). Diferentes letras indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

En la **Figura 4.14-a** se observa una disminución significativa de las AMT en desde el día 15, la cual representó una pérdida del 28%. Posteriormente, estos compuestos se mantuvieron estables hasta el día 65 donde la recuperación fue del 50% y finalmente al día 184 la pérdida total de AMT fue de 81%. Por otro lado, analizando la CA (**Figs. 4.14-c y d**) se observa que entre los días 127 y 142 los compuestos con CA comenzaron a presentar cambios significativos, obteniendo una recuperación del 91% en el día 127 para ABTS y del 66% en el día 142 para FRAP. Al finalizar el tiempo de almacenamiento (día 184), ambas metodologías mostraron una recuperación de la CA de 35%. Esta disminución podría deberse al deterioro de las AMT dado que se ha demostrado que las mismas presentan alta CA (Tsai y col., 2002; Hu y col., 2016; Teng y col., 2017; Martín-Gómez y col., 2020;). No obstante, es posible que

durante el almacenamiento también se estén generando nuevos compuestos de naturaleza polifenólica y que estén aportando CA, porque el CPT (**Fig. 4.14-b**) sólo mostró una disminución significativa el último día. En este sentido, distintos autores han reportado aumentos en el contenido de polifenoles durante el almacenamiento de productos deshidratados a bases de berries. Por ejemplo, Flores y col. (2014) estudiaron las AMT y el CPT durante el almacenamiento de polvos de arándanos obtenidos mediante secado por aspersión (utilizando proteína de suero como matriz) y reportaron que al cabo del tiempo de 35 días (a 22 °C, 37 °C y 45°C) fue significativa la disminución de las AMT, sin embargo, los polifenoles aumentaron casi al doble. Busso-Casati y col. (2019), estudiaron el almacenamiento a 38 °C de polvos liofilizados desarrollados a partir de arándano, grosella negra, saúco y maqui, y reportaron que al cabo de 60 días todos los polvos mostraron una disminución de las AMT cercana al 20%, pero en el caso de los polifenoles observaron que en general los valores fueron superiores a los iniciales. Además, Rocha-Parra y col. (2016) sugirieron la formación de nuevos compuestos antioxidantes, dado que informaron que la CA de un polvo de vino liofilizado se mantuvo estable durante 145 días de almacenamiento a 38 °C a pesar de haber observado la degradación de antocianinas específicas. Es decir, que a pesar de que las AMT se vean disminuidas, la CA no se ve afectada de la misma manera.

De acuerdo con los estudios realizados en función de la variación del contenido de agua, la a_w , el color, y las propiedades funcionales, se puede inferir que las láminas de manzana y acáchul presentaron una vida útil de 4 meses, posterior a este tiempo, el parámetro que más les afectó fue la deshidratación. Posiblemente, utilizando otro tipo de envase se podría aumentar la vida útil del producto.

4.2 Sección II: Ingrediente de proteínas lácteas y ácido fólico

Esta sección se focaliza en el desarrollo y caracterización de dos ingredientes conteniendo ácido fólico (AF). Uno de ellos se conformó por β -lactoglobulina (β lg) y AF (β lg-AF) y el otro por un aislado de proteína de suero (Whey Protein Isolate, WPI) y AF (WPI-AF). El propósito de desarrollar estos ingredientes fue mejorar la estabilidad de la vitamina dado que es sensible a varios factores como la luz, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, entre otros (Gregory, 1989; Berry Ottaway, 2010; Frommherz y col., 2014). Adicionalmente, la selección de las dos proteínas tuvo como objetivo estudiar el comportamiento del AF con una proteína pura como es la β lg y con una mezcla de proteínas constituida en gran medida por β lg (WPI), de manera de conocer las interacciones de la vitamina en un sistema simple y en otro más complejo, pero más económico.

4.2.1 Caracterización de las interacciones entre las proteínas y la vitamina B9

El desarrollo de los ingredientes β lg-AF y WPI-AF se basó en la formación de complejos entre las proteínas lácteas y la vitamina. En un estudio previo, Pérez y col. (2014) trabajando con β lg y AF en una proporción 1:10 (β lg:AF) a pH 7, desarrollaron nanocomplejos conformados por una molécula de proteína unida a tres moléculas de AF y observaron que las interacciones eran principalmente hidrofóbicas. También informaron que era posible aumentar la carga de AF en la proteína, dado que los nanocomplejos mostraron tamaños mayores a medida que aumentaba la concentración de la vitamina de 0,002 a 0,2%. A partir estos resultados, surgió la idea de desarrollar ingredientes concentrados de proteínas lácteas y ácido fólico para su empleo en la suplementación de alimentos. La propuesta para este trabajo fue adaptar el procedimiento de nanocomplejamiento utilizado por Pérez y col. (2014), para obtener ingredientes concentrados.

Para establecer las condiciones de pH más adecuadas para la generación de los ingredientes, se realizaron pruebas preliminares acidificando las soluciones de proteína y AF al 1,0 % con HCl, desde pH 7 hasta pH 2. Estas pruebas mostraron que a pH 6 y 7 los complejos se encontraban en solución, a pH 5 una parte precipitó y el resto quedó en solución, y a valores menores de pH se observó la precipitación completa, mostrando el líquido superior totalmente transparente (**Figura 4.15**). La precipitación fue valorada positivamente como una posible separación de fase del complejo, facilitando el proceso de separación para la generación de un ingrediente. Según Pérez y col. (2014) los nanocomplejos de β lg-AF presentaron inestabilidad coloidal a valores de pH menores a 5 (β lg 0,2% - AF 0,002 a 0,2%).

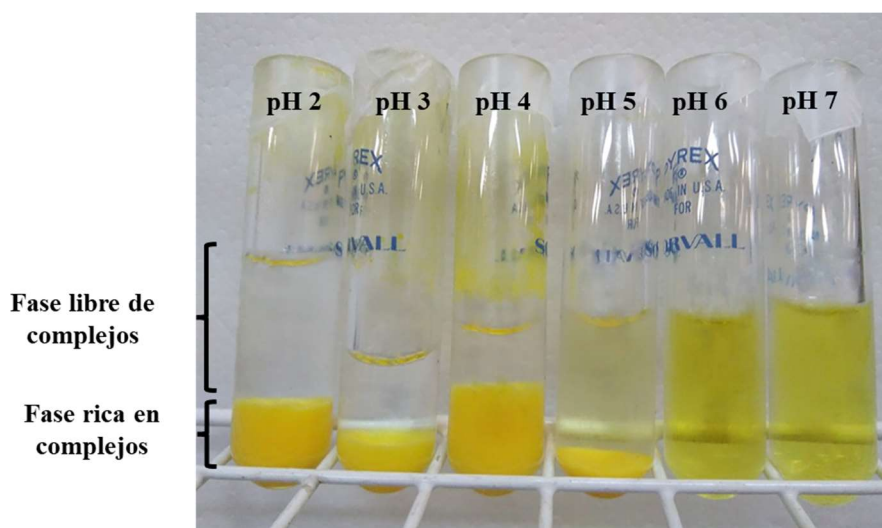


Figura 4.15: Complejos β lg-AF desarrollados a una concentración de 1g de especie disuelta/100 g de solución (siendo las especies disueltas β lg y AF), a distintos valores de pH (2 a 7) ajustados con HCl.

Este fenómeno de precipitación espontánea y completa no fue observado en los controles de proteína pura (**Figura 4.16**).

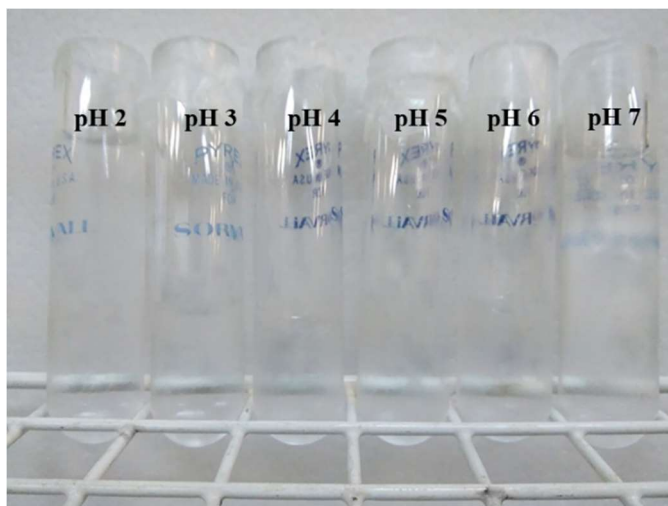


Figura 4.16: Soluciones controles de β lg desarrolladas a una concentración de 1g de proteína/100 g de solución, ajustadas a distintos valores de pH (2-7). Acidificación realizada con HCl.

Por otro lado, en los controles de AF, se observó un aumento de la turbidez a partir de pH 5, pero no se observó precipitación completa a ninguno de los valores de pH estudiados (Figura 4.17).

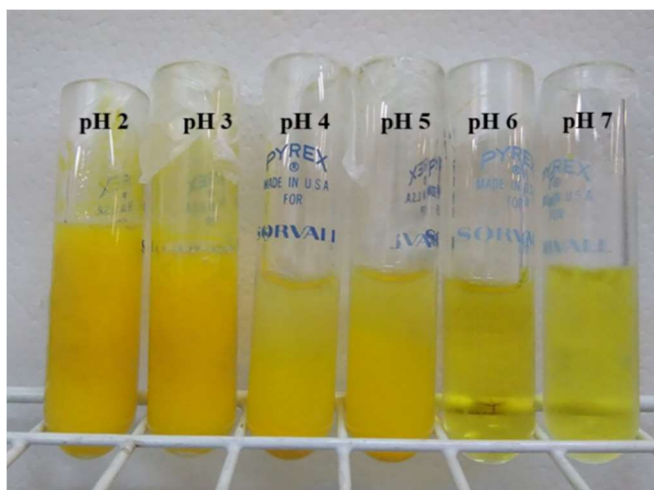


Figura 4.17: Soluciones controles de AF desarrolladas a una concentración de 1g de AF/100 g de solución, ajustadas a distintos valores de pH (2-7). Acidificación realizada con HCl.

Una vez definida la posibilidad de generar los complejos por precipitación al disminuir el pH, se reemplazó el HCl por un ácido de uso alimentario (ácido cítrico) y se estableció como condición de trabajo el pH 3 tanto para los complejos β lg-AF como WPI-AF (**Figura 4.18**). A continuación, se describen los resultados obtenidos a partir de los sistemas acidificados con ácido cítrico.

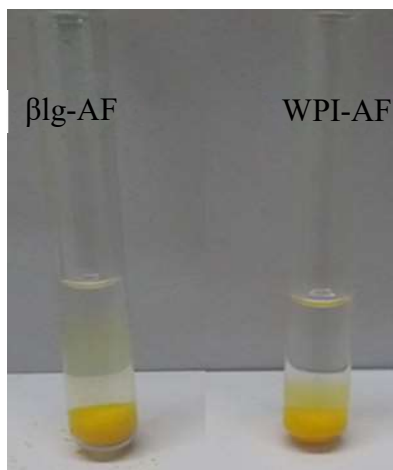


Figura 4.18: Desarrollo de complejos β lg-AF y WPI-AF a pH 3. Acidificación realizada con ácido cítrico.

4.2.1.1 *Análisis de FT-IR*

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) es una herramienta ampliamente conocida para analizar compuestos de distinta naturaleza. Cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes (Kacuraková y Wilson, 2001; Carbonaro y Nucara, 2009; Barraza-Garza y col., 2013). En este trabajo, se utilizó esta metodología para estudiar las interacciones proteína-AF generadas en los ingredientes. En la **Figura 4.19** se muestran los espectros FT-IR adquiridos para las proteínas β lg y WPI, el AF y sus respectivos complejos proteína-AF. Los principales picos característicos del AF (líneas

negras) surgen de las vibraciones OH, NH, C=N y C=O. Este espectro coincide con los resultados reportados en otros trabajos (Raouf y col., 2014; Assadpour y col., 2017). Se destacan los picos ubicados a 1456, 1485 y 1519 cm^{-1} que corresponden al anillo de pteridina; la flexión de NH que se observa en 1544 y 1606 cm^{-1} ; el aromático C=C a 1571 cm^{-1} ; el C=N a 1639 cm^{-1} y el estiramiento de C=O a 1692 cm^{-1} . El estiramiento OH de los grupos carboxílicos (región del ácido L-glutámico), y el NH del anillo de pteridina muestran sus señales entre 3000 y 3600 cm^{-1} .

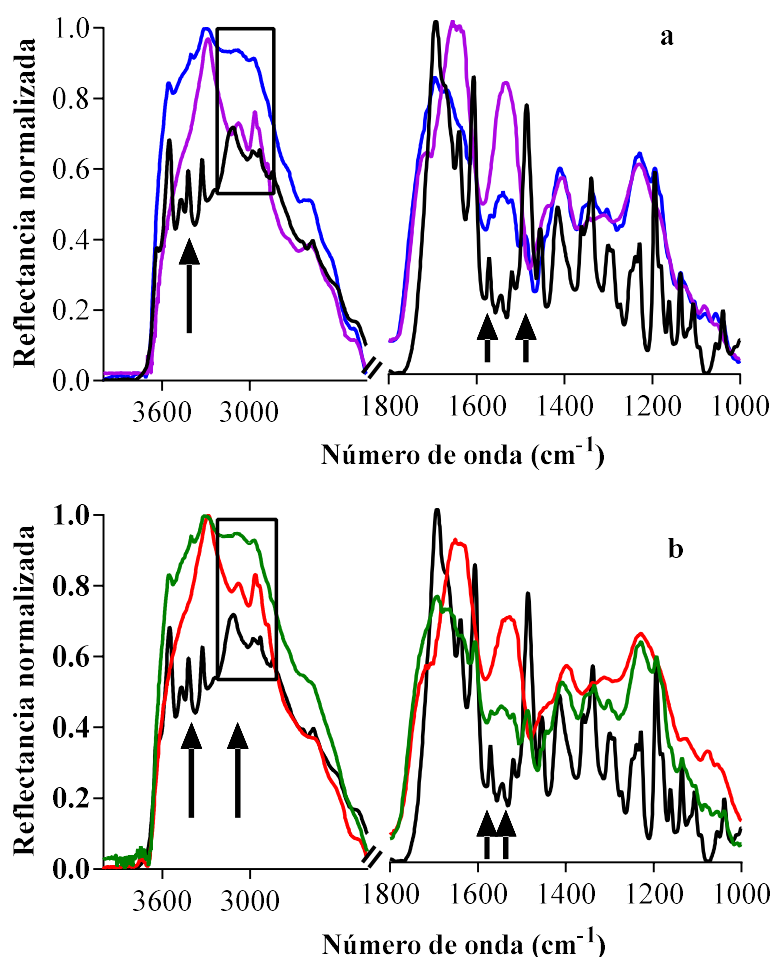


Figura 4.19: Espectros FT-IR. **a)** AF (negro), β lg (violeta) y β lg-AF (azul). **b)** AF (negro), WPI (rojo), WPI-AF (verde).

Por otro lado, la **Figura 4.19** también muestra los picos característicos principales de las proteínas (amida I, II y III a ~ 1650 , ~ 1550 y $1400-1200\text{ cm}^{-1}$, respectivamente), así como las principales señales de estiramiento de OH en la región entre $3000-3600\text{ cm}^{-1}$ (Assadpour y col., 2017; Barth, 2007). La señal de la amida I proviene mayoritariamente del estiramiento C=O, mientras que la de amida II y la amida III son mayoritariamente una combinación de la flexión NH y el estiramiento CN (fuera de y en fase, respectivamente).

En cuanto a los espectros de los complejos proteína-AF, se encontró que ambos presentaron bandas características de los constituyentes individuales (proteínas y AF), y señales que indicaban la interacción entre las proteínas y el AF. Por ejemplo, la presencia de AF en los complejos se observó en las bandas 1486 , 1606 , 1639 y 1692 cm^{-1} , y la contribución de las proteínas en las regiones de amida II, III y I (en menor medida). Las interacciones entre los componentes se observaron en varios números de onda dado que surgieron cambios en la posición y la forma de los picos. En ambos complejos se observó el desplazamiento del pico a 3418 cm^{-1} hacia 3400 cm^{-1} (grupos carboxílicos OH y NH_2 y NH del anillo de pteridina); la combinación de picos proteicos a 3074 y 3288 cm^{-1} y los de AF a 3111 y 3323 cm^{-1} dio una nueva y más amplia señal entre 3400 y 3000 cm^{-1} como consecuencia de los nuevos enlaces de hidrógeno establecidos en los complejos. También se observaron desplazamientos en el máximo de amida I (1660 a 1682 cm^{-1}) y en la región de amida II de 1571 a 1569 cm^{-1} para $\beta\text{lg-AF}$ y de 1572 a 1570 cm^{-1} para WPI-AF , posiblemente debido a la interacción establecida entre las proteínas y el grupo funcional C=O del ácido p-amino-benzoico. Ese evento también puede observarse por el cambio de la banda de estiramiento asimétrico de 1546 a 1541 cm^{-1} , que es debido a la interacción con los estiramientos de C=C del anillo heterocíclico y del anillo heterocíclico del anillo de pteridina (Li y col., 2012). Adicionalmente, se observó un cambio en la señal de pteridina del AF de 1485 a 1490 cm^{-1} en los complejos (aunque la proteína mostró alguna contribución a 1490 cm^{-1} , pero la forma de la banda correspondía a la señal de AF).

Además, la señal del anillo de pteridina a 1692 cm^{-1} que surge de C=O fue más estrecha en los complejos que en AF revelando un cierto grado de participación reducida en la resonancia con el NH (Li y col., 2012) posiblemente promovida por la interacción general con las proteínas. Este análisis reveló que las interacciones de AF con las proteínas podrían presentarse través del anillo de pteridina, del ácido p-amino-benzoico y de grupos del ácido glutámico.

4.2.1.2 Potencial ζ de los constituyentes y de los complejos

El potencial ζ es una medida de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas (Malvern, 2011). Según Cheema y col. (2015) es el potencial que opera en el plano de una partícula cargada durante el movimiento electroforético. Esta medición es muy útil para comprender las interacciones que presenta un compuesto tal como lo describen Pérez y col. (2014). En este trabajo, se midió el potencial ζ de los constituyentes de los complejos (proteínas y AF) y de los complejos (β lg-AF, WPI-AF) en las mismas condiciones. La **Figura 4.20** muestra los resultados obtenidos. Se puede observar que las proteínas obtuvieron valores positivos, siendo para β lg= $21,3 \pm 0,6\text{ mV}$ y para WPI= $23,0 \pm 1,0\text{ mV}$. Ambos resultados fueron consistentes con reportes previos observados en otros trabajos. En el caso de la β -lactoglobulina, Huang y col. (2009) demostraron que esta proteína presentó cargas netas positivas cuando se encontraba a un pH por debajo de su punto isoeléctrico (PI) 4,8, y reportaron un valor similar al obtenido en este trabajo en condiciones de pH 3. En cuanto al WPI, Hu y col. (2020) reportaron que presentó un potencial ζ de $\sim 25,7\text{ mV}$ cuando se encontraba en solución acuosa a pH 3,5. Este resultado se debería a que los grupos amino de las proteínas se encontrarían cargados positivamente mientras que los grupos carboxilo estarían en estado neutro (Chanamai y McClements, 2002; Huang y col., 2009).

Con respecto al potencial ζ del AF, se obtuvo un valor negativo, el cual estuvo de acuerdo con el reportado por Pérez y col. (2014) y Ochnio y col. (2018). Este resultado podría estar relacionado a los pK_a que presenta la molécula de AF, dado que según Tyagi y Penzkofer (2010), esta vitamina presenta dos pK_a en los que se involucra la protonación del N1 (2,35) y del N10 (0,20) de la molécula. Por lo tanto, en condiciones de pH por encima de 2,35 no sería posible que el AF mostrara cargas positivas.

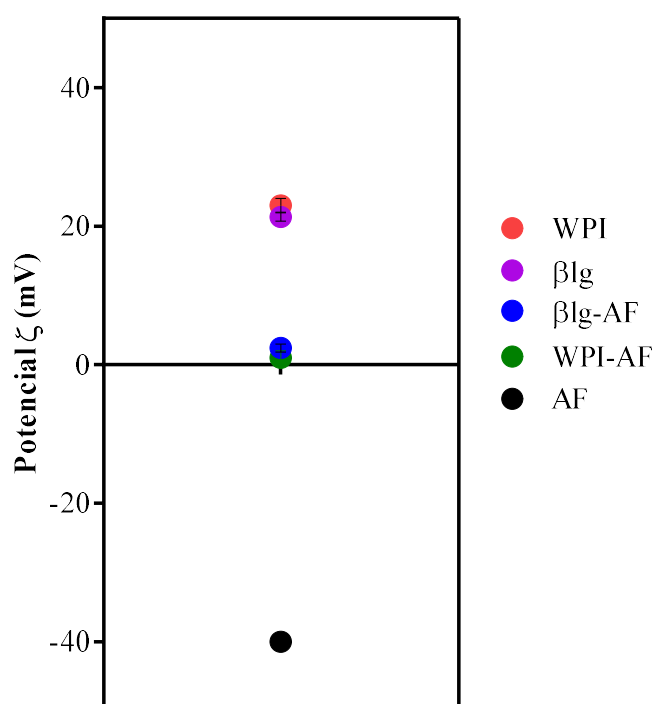


Figura 4.20: Potencial ζ de los complejos y de sus constituyentes en polvo resuspendidos en agua cuyas concentraciones finales eran de 5g especie disuelta /100g de solución (especie disuelta= proteína o AF) a pH 3 y temperatura ambiente.

En cuanto a los complejos, se puede observar que se obtuvieron valores de potencial ζ cercanos a cero. En comparación con los valores de potencial ζ obtenidos para los constituyentes puros de los complejos, estos resultados son indicativos de la anulación de cargas o cancelación global de carga inducidas por interacciones proteína-vitamina. Este

resultado podría sugerir que las interacciones que gobiernan mayoritariamente a la proteína y al AF para generar estos complejos son del tipo electrostático.

4.2.2 Caracterización del tamaño de partícula en escalas nano y micro

4.2.2.1 *Análisis del tamaño de partícula en nanoescala.*

Con la finalidad de conocer los tamaños de partícula que presentaron los complejos, se analizaron los diámetros hidrodinámicos de las muestras. Las distribuciones del tamaño de partículas a pH 3 expresadas en intensidad (emitida originalmente por el software del equipo), en % de volumen y en % de número se muestran en la **Figura 4.21** para las muestras de β lg y β lg-AF.

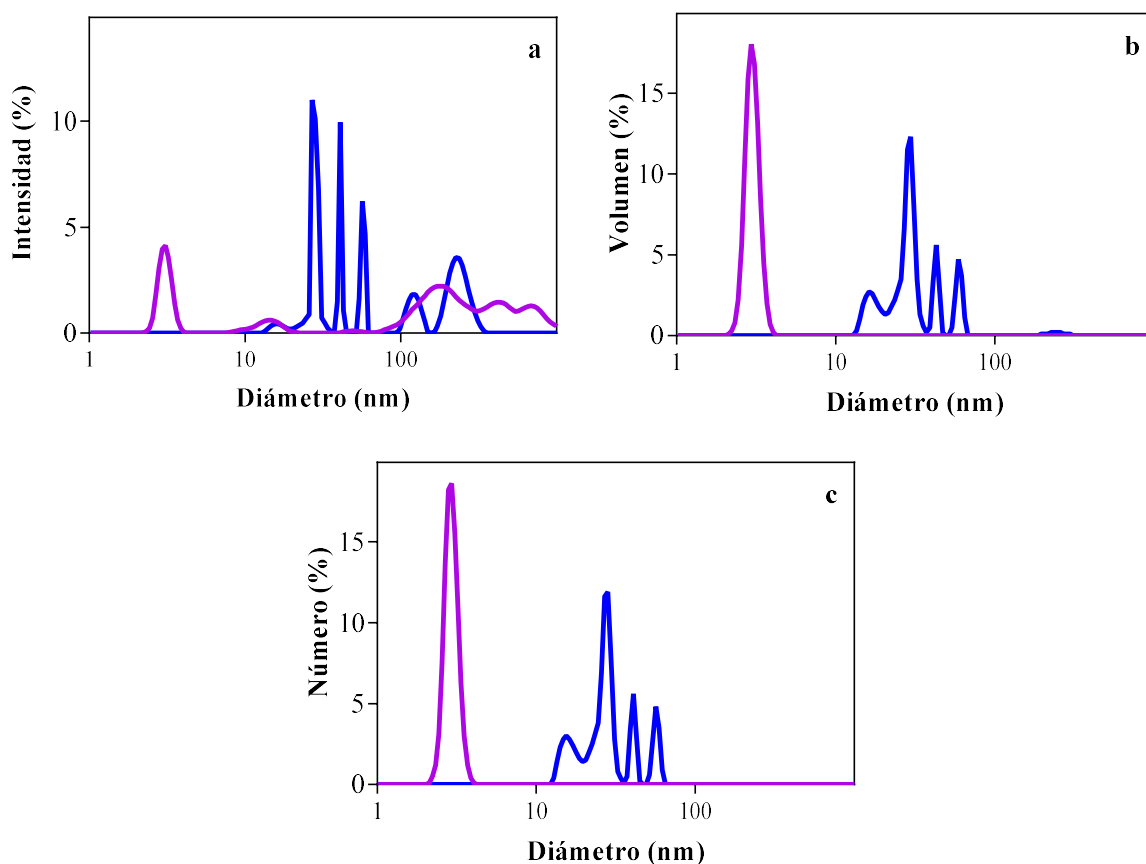


Figura 4.21 Distribución del tamaño de partícula expresado en % de intensidad (a), % de volumen (b) y % de número (c) de la proteína β lg (violeta) y el complejo β lg-AF (azul).

La distribución de tamaño generada por DLS es una distribución de intensidad, sin embargo, estos resultados están relacionados con la dispersión de la muestra y no dan información acerca del tamaño de partícula ni de la proporción de poblaciones que están presentes en la solución. Por este motivo, los datos se transforman mediante la teoría de Mie a distribuciones expresadas en volumen y en número (Malvern, 2011). De esta manera, es posible describir la proporción relativa de poblaciones de partículas múltiples presentes en la muestra en función de su masa o volumen o directamente el número en lugar de basarse en su dispersión.

En el caso de la proteína β lg, se observa que la distribución en función de la intensidad (**Fig. 4.21-a**) es multimodal, sin embargo, los resultados expresados en volumen y en número muestran que la distribución es monomodal presentando sólo una población dominante con un pico a un diámetro de 3,0 nm y límites entre 2,2 nm y 3,9 nm. Este resultado está de acuerdo con estudios recientes de Martínez y Pilosof (2018) quienes observaron el mismo patrón para β lg en soluciones con un rango de pH de 2,5-4,0.

En cuanto a los complejos β lg-AF, la distribución obtenida fue multimodal. En el caso de la distribución expresada en volumen (**Fig. 4.21-b**) se observan 5 picos, sin embargo, la distribución expresada en número (**Fig. 4.21-c**) destaca sólo 4 picos. En comparación con la proteína pura, estos picos se encuentran a valores mayores de diámetro hidrodinámico. Esto refleja la formación y coexistencia de agregados con diferentes tamaños. Los picos más destacados se observaron a 15,5; 28,3; 41,0 y 56,0 nm, cuya distribución de tamaño de partícula global presentó límites entre 12,3 y 65,0 nm. Estos resultados indican una interacción molecular en los sistemas mixtos de β lg y AF. Este efecto coincide con Pérez y col. (2014), quienes observaron que al añadir AF a soluciones de β lg en condiciones de pH 7 los tamaños de partícula se duplicaron.

Por otro lado, en la **Figura 4.22** se muestran los resultados obtenidos para WPI y el complejo WPI-AF.

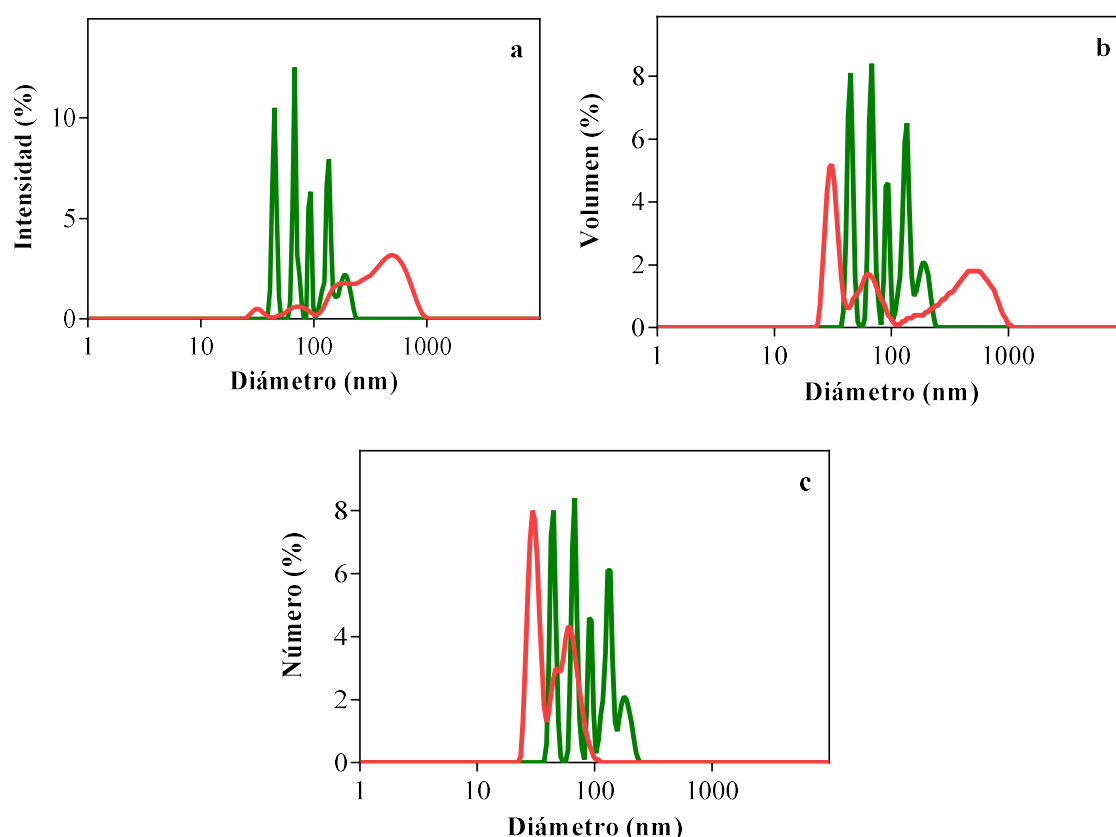


Figura 4.22. Distribución del tamaño de partícula expresado en % de intensidad (a), % de volumen (b) y % de número (c) de la proteína WPI (rojo) y el complejo WPI-AF (verde).

En comparación con β lg (**Figura 4.21**), las soluciones de WPI manifestaron tamaños mayores y mayor polidispersidad en términos porcentuales de volumen y número. La distribución del tamaño de partícula de WPI expresada en volumen fue trimodal con picos en 31,0; 65,0 y 496,0 nm, y con una distribución global entre 22,5 y 992,3 nm. Sin embargo, el análisis expresado en número no mostró el pico a 496,0 nm, lo que refleja que los tamaños de partículas mayores observados no tuvieron peso estadístico en la distribución global. Por tanto, en la **Figura 4.22-c** solo se observaron dos picos, a 29,62 y a 62,04 nm, con límites de distribución de 23,5 y 103,1 nm.

Las diferencias observadas entre ambas proteínas se relacionan a la naturaleza de cada una: el WPI, a diferencia de la β lg pura, es una mezcla de proteínas con diferente tamaño e incluso con diferentes estados de agregación inducidos por el tratamiento térmico durante el proceso de secado por aspersión para obtener este polvo. Se ha detectado que las proteínas presentes en las soluciones acuosas de WPI pueden sufrir desnaturalización térmica parcialmente (Dissanayake y col., 2010; Nishanthi y col., 2017). La pérdida parcial de las estructuras terciarias y secundarias conduce a la exposición de grupos internos que pueden unirse a otras moléculas de proteínas por enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y/o formación de enlaces disulfuro, favoreciendo el proceso de agregación. Para los complejos WPI-AF (**Figura 4.22**), la distribución presentó un mayor número de poblaciones y los límites de la distribución global fueron: 37,3 a 236,9 nm. La agregación de proteínas inducida por AF fue de mayor tamaño que la observada para β lg.

Además de evaluar el diámetro de partícula, el software del equipo entrega el índice de polidispersidad (IPD) que presentan las muestras. Este índice es un número adimensional y se define como la relación entre el cuadrado de la desviación estándar y el cuadrado del tamaño medio (Vinod y Philip, 2017). En la **Tabla 4.5** se muestran los resultados obtenidos para las muestras estudiadas. Se encontró un aumento en los valores obtenidos de IPD para los complejos que fue significativo con respecto al control β lg. Estos resultados posiblemente estén relacionados a las interacciones proteína-vitamina que en condiciones ácidas se manifestaron formando una gran variedad de agregados. En consecuencia, los complejos resultaron tener una distribución de tamaño de partícula más amplia y mayor polidispersidad. Estos resultados son consistentes con las directrices del manual del equipo Malvern utilizado, dado que establece que valores de IPD superiores a 0,7 indican que la muestra tiene una distribución de tamaño muy amplia (Malvern, 2011).

Tabla 4.5: Valores de polidispersidad (IPD) de las proteínas y los complejos (proteína-AF).

Muestra	IPD
Blg	$0,36 \pm 0,05^a$
WPI	$0,5 \pm 0,1^{ab}$
β lg-AF	$0,7 \pm 0,2^b$
WPI-AF	$0,8 \pm 0,2^b$

Valores expresados como la media $\pm$ la desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

4.2.2.2 Análisis del tamaño de partícula en microescala

La microestructura de los complejos después del proceso de agregación se estudió por microscopía de barrido de láser confocal (CLSM). La **Figura 4.23** muestra las imágenes obtenidas para la proteína β lg (**a**) y el complejo β lg-AF (**b**) a pH 3.

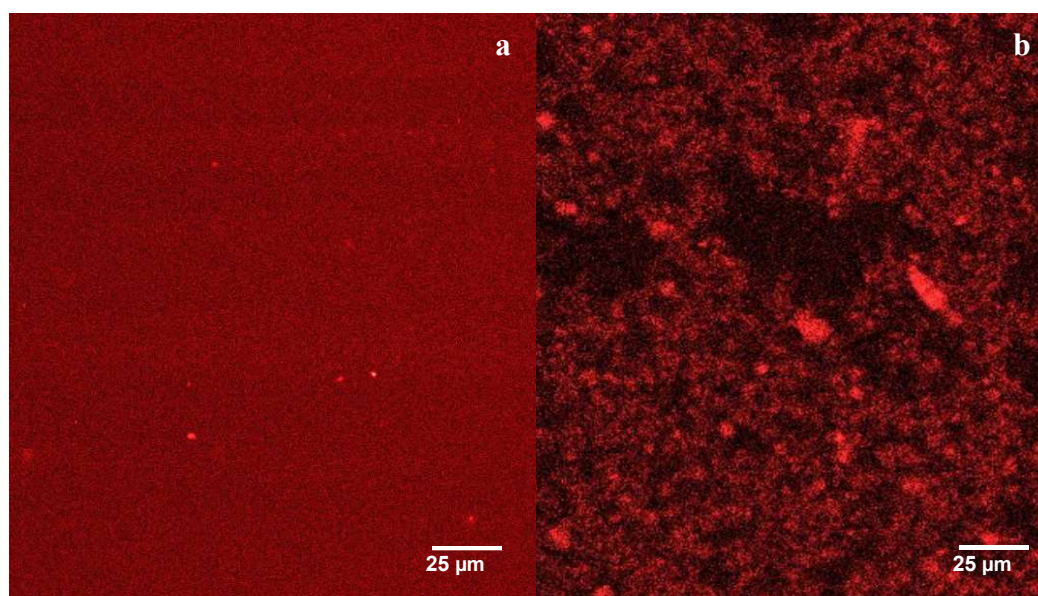


Figura 4.23: Imágenes de microscopía de barrido de láser confocal: **a)** β lg y **b)** β lg-AF.

Para la solución de proteína control (β lg) se puede observar un patrón de fluorescencia homogéneo (dominios no separados), por el contrario, las muestras correspondientes a los complejos β lg-AF exhibieron dominios más densos de pequeños agregados y la coexistencia de algunos espacios vacíos. Estos agregados se observan heterogéneos y se podrían clasificar en un amplio rango entre la nano y la microescala. En este sentido, la determinación de la distribución del tamaño de partícula mediante DLS y la visualización de imágenes CLSM resultaron complementarias.

Respecto al WPI y al complejo WPI-AF, la **Figura 4.24** presenta las imágenes obtenidas por CLSM.

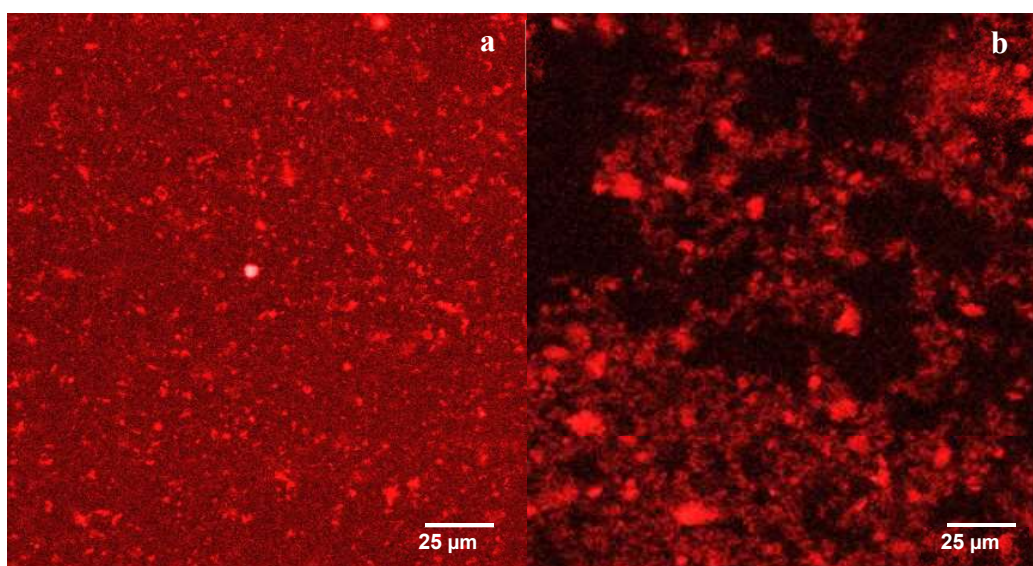


Figura 4.24: Imágenes de microscopía de barrido de láser confocal: **a)** WPI y **b)** WPI-AF

Las imágenes del WPI (**Figura 4.24-a**) reflejaron una clara diferencia con respecto a β lg (**Figura 4.23-a**). Se puede observar que el material de partida es heterogéneo en términos de patrón microestructural mostrando pequeños agregados dispersos. Este resultado concuerda con las características propias del WPI (Al-Jasaar y col., 2020). Por otro lado, las imágenes obtenidas para los complejos β lg-AF y WPI-AF (**Figs.4.23-b** y **4.24-b**) fueron muy similares,

ambas revelaron agregados proteicos cuya microestructura se observa más heterogénea que sus respectivos controles. Arzeni y col. (2014) reportaron agregados con características similares, aunque de menor tamaño, en nanocomplejos de albúmina y AF cuando los observaron con CLSM. Los resultados sugieren que la variedad de estructuras de tamaños heterogéneos fue promovida por el complejamiento de AF, observándose un mayor impacto para β lg que para WPI como lo confirman los resultados de CLSM.

4.2.3 Caracterización de la formación de los complejos

4.2.3.1 Cinética de agregación

Una vez estudiadas las interacciones y los tamaños de partícula de los complejos, el interés se centró en conocer la formación de los complejos, el cual se abordó estudiando la cinética de agregación. Para realizar este estudio fue necesario trabajar en un régimen diluido de concentraciones, debido a la imposición metodológica de las altas concentraciones que inducen agregación proteica casi instantánea. En la **Figura 4.25** se muestran las curvas obtenidas para los sistemas β lg-AF, WPI-AF y para el control AF, en distintas concentraciones: 0,00625 g/100g (**a**); 0,0125 g/100g (**b**) y 0,0182 g/100g (**c**). Los controles de proteínas no se muestran debido a que no se observó turbidez en el tiempo de estudio. La proteína β lg a pH 3 se encuentra en solución principalmente como monómero (Uhrínová y col., 2000), por lo que resulta coherente que la turbidez no sea detectable en las condiciones estudiadas. Esta proteína presenta su máximo punto de autoasociación (formación de oligómeros) y agregación en el pH coincidente con el PI (4,8) (Uhrínová y col., 2000; Huag y col., 2009; Martínez y Pilosof, 2018). Por otro lado, el control de AF presentó turbidez en el tiempo, mostrando diferencias en las curvas obtenidas entre la concentración 0,00625 y las de 0,0125 y 0,01825 g/100g de AF. Esto se explica teniendo en cuenta los reportes de Younis y col. (2009), quienes encontraron

que, en medio ácido, las repulsiones electrostáticas entre las moléculas del AF se reducen, produciendo una autoasociación y posteriormente la formación cristales líquidos polimorfos mediante *autoensamblaje molecular* con estructura columnares. En este sentido, las diferencias entre las curvas de concentraciones diferentes de AF podrían deberse a un efecto de la concentración sobre la tendencia a la autoasociación molecular del AF.

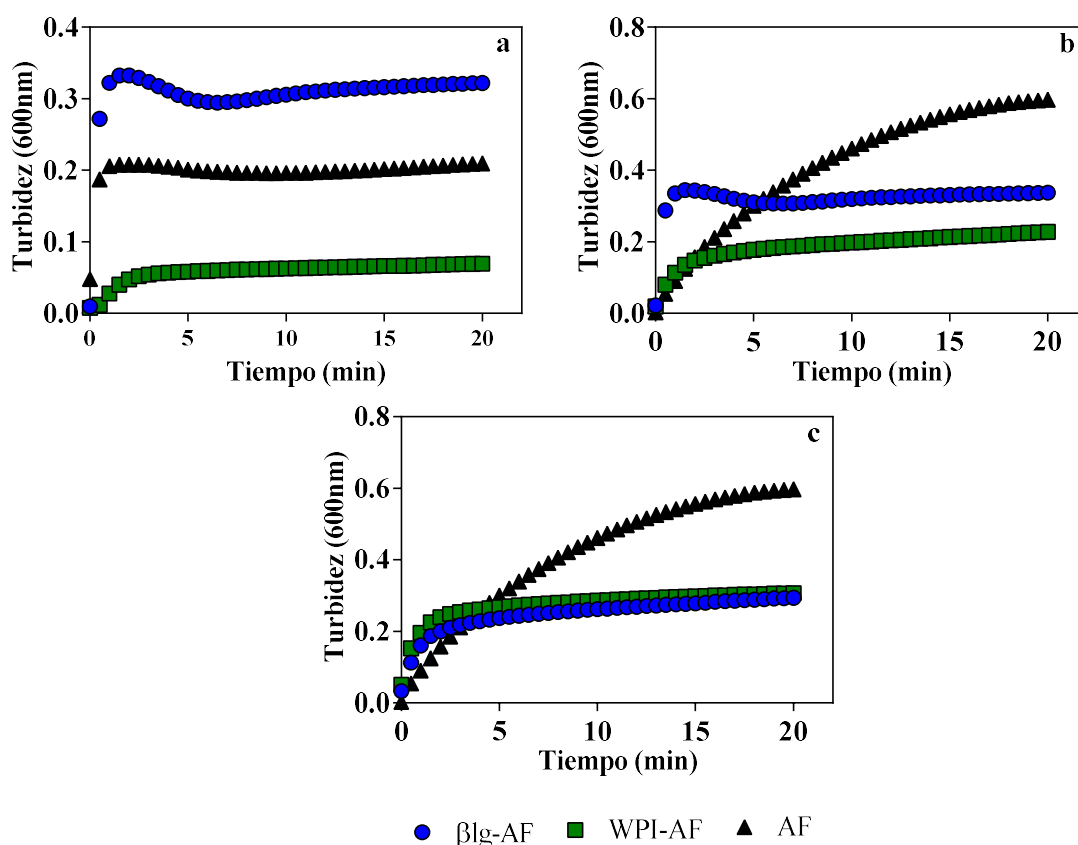


Figura 4.25: Cinética de agregación de los complejos β lg-AF y WPI-AF a pH 3 y del control AF a pH 3. Concentraciones (proteína y AF): 0,00625 g/100g (a); 0,0125 g/100g (b) y 0,0182 g/100g (c).

En cuanto a los complejos, los sistemas mixtos (proteína-AF) mostraron curvas diferentes respecto a sus constituyentes a pH 3. Además, se destaca la alta velocidad de agregación en el proceso de formación de los complejos, ya que alcanzaron el equilibrio en

menos de cinco minutos. En este sentido, el efecto de agregación fue similar al observado por Tavares y col. (2015) para complejos de AF y lactoferrina. Dicho efecto se podría relacionar a la ausencia de repulsiones generadas por las fuerzas de Coulomb entre las proteínas y el AF, dado que como se explicó en el **ítem 4.1.2.1**, las cargas netas de los complejos se encuentran anuladas.

4.2.4 Caracterización potencialmente funcional de los complejos

4.2.4.1 *Capacidad antioxidante de los complejos*

Distintos estudios han señalado que el AF, además de ser una vitamina importante en la nutrición debido a los efectos sobre el tubo neural en el desarrollo embrionario (FAO, 2002; Assanelli y col., 2004; Frommherz y col. 2014), podría presentar un efecto antioxidante beneficioso para la salud. En este sentido, Liu y col. (2012) demostraron este efecto a nivel biológico, ya que suplementaron con AF a lechones con retraso del crecimiento intrauterino y observaron una disminución en el estrés oxidativo sobre la ruta metabólica de la homocisteína. En esta misma línea, Alvares-Delfino y col. (2007) evaluaron los niveles de homocisteína y el estrés oxidativo en pacientes en hemodiálisis y encontraron una mejora de la capacidad antioxidante plasmática total con la administración de AF. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se evaluó la capacidad depuradora del radical ABTS⁺ a fin de obtener una estimación de la potencial capacidad antioxidante de los complejos desarrollados. En la **Tabla 4.6** se muestran los resultados obtenidos. El AF mostró tener CA frente al radical sintético ABTS⁺ inclusive en las concentraciones más bajas estudiadas (0,00625%). Además, la CA no se vio disminuida en los complejos en comparación con el AF puro. Estos resultados son interesantes ya que, al diseñar un producto con una visión nutracéutica, el objetivo es que

tenga múltiples funcionalidades, como por ejemplo que sea nutritivo y que tenga efectos beneficiosos tanto para la salud como para la conservación del propio alimento.

Tabla 4.6: Capacidad antioxidante del AF y de los complejos proteína-AF.

Muestras	Concentración (%)	CA (mg EAG/ml de muestra)
AF	0,01825	0,0145 ± 0,0003 ^a
	0,01250	0,0099 ± 0,0002 ^b
	0,00625	0,0041 ± 0,0002 ^c
βlg-AF	0,01825	0,0151 ± 0,0002 ^a
	0,01250	0,0099 ± 0,0004 ^b
	0,00625	0,0039 ± 0,0004 ^c
WPI-AF	0,01825	0,0145 ± 0,0002 ^a
	0,01250	0,0097 ± 0,0010 ^b
	0,00625	0,0024 ± 0,0002 ^d

Valores expresados como la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Se ha demostrado que el AF también presenta un efecto antioxidante muy eficiente frente a otros radicales tales como CCl_3O_2^- , N_3^- , SO_4^{2-} , Br_2^{2-} , $\cdot\text{OH}$, and O^{2-} (Joshi y col., 2001), lo que amplía el espectro de radicales con los que podría reaccionar. Sumado a esto, se ha destacado que el AF presenta un potente poder inhibitorio de la peroxidación lipídica (Jhosi y col., 2001; Gliszczyska-Swigło, 2007; Alvares-Delfino y col., 2007; Zhao y col., 2018), siendo este un efecto muy beneficioso para la salud. Sin embargo, considerando que el efecto antioxidante proviene sólo del AF, cada 0,00625g de AF se evidencia una capacidad antioxidante equivalente en ácido gálico (EAG) de 0,41mg, es decir 65,6 mg EAG/g de AF. Teniendo en cuenta la dosis diaria recomendada ($400\mu\text{g} = 0,0004\text{g}$) la vitamina aportaría una CA de 0,03 mg EAG. Comparado con la valoración de la CA del puré de manzana reportado

en la **Sección 1**, este valor es 6 veces menor, por lo tanto, la contribución en cuanto a CA no sería significativa con respecto a otros alimentos de una dieta.

4.2.4.2 Digestión *in vitro* y biodisponibilidad de AF ante *L. casei* BL23

Se realizó la digestión *in vitro* tanto de los complejos β lg-AF y WPI-AF, como de sus controles β lg, WPI y AF a fin de evaluar la concentración de AF biodisponible ante *L. casei* BL23. El sobrenadante obtenido de este procedimiento simula ser el fluido intestinal el cual presenta los compuestos que serían absorbidos por el intestino delgado, siendo en este caso el compuesto de interés la vitamina B9. Los resultados se muestran en la **Figura 4.26**.

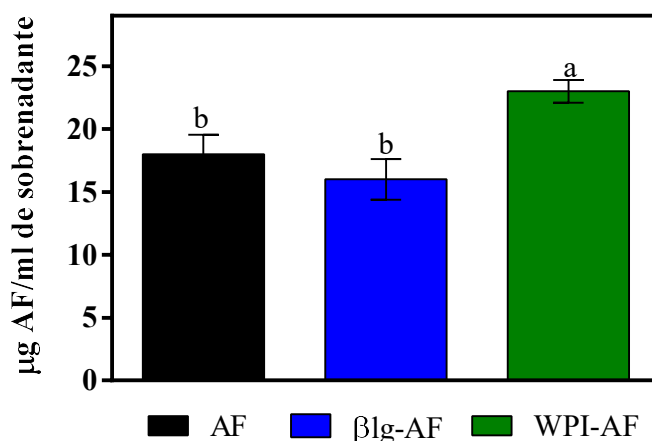


Figura 4.26: Concentración de vitamina B9 en términos de biodisponibilidad ante *L. casei* BL23 luego de la digestión *in vitro*. Los complejos y el AF se prepararon a una concentración 0,01825% p/p a pH 3. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Se puede observar que tanto la vitamina libre como la presente en los complejos se mostraron biodisponibles para el modelo bacteriano, incluso después de las condiciones de procesamiento a las que fueron sometidas las muestras. Los resultados del control de las proteínas sin AF, mostraron que no hubo crecimiento microbiano (ausencia de absorbancia a

600 nm), confirmando la validez del sistema experimental (auxotrofia de la cepa con respecto al folato).

Es de notar que la concentración de AF del complejo β lg-AF fue similar a la del control AF, sin observarse diferencias significativas. Sin embargo, en el caso del complejo WPI-AF se observaron valores superiores respecto de la misma concentración de AF libre y de β lg-AF. Por un lado, estos resultados sugieren que el complejo WPI-AF fue más estable a los tratamientos de la digestión *in vitro* en comparación con el complejo β lg-AF y el AF libre. No obstante, como el sistema de medición de AF es un método biológico, también se podría inferir que la vitamina podría mostrarse más biodisponible en el sistema WPI-AF ante *L. casei* BL23. Estos resultados también fueron observados por Ochnio y col. (2018) quienes desarrollaron nanocomplejos de AF a partir de aislados de proteínas de soja y encontraron que la cuantificación del AF mediante el modelo *L. casei* BL23 fue mayor cuando la vitamina se encontraba interaccionando con las globulinas. En este sentido, se ha establecido previamente que *L. casei* BL23 tiene sus propios sistemas de transporte de folatos (Henderson y col., 1979; Eudes y col., 2008). Además, los lactobacilos también presentan un sistema proteolítico para el transporte de productos proteicos a través de la membrana celular (Kunji y col., 1996; Alcántara y col., 2016). Este sistema de transporte degrada las caseínas de la leche, fuente proteica natural de este tipo de microorganismos, que representa el 80% del total de proteínas de la leche bovina. El sistema proteolítico está compuesto por una única serina proteinasa extracelular (PrtP) anclada a la pared celular de *L. casei* BL23 que degrada las caseínas en productos de degradación de diferentes tamaños. Estos péptidos pueden atravesar la membrana citoplasmática mediante un sistema de translocación que los introduce al interior celular. El sistema de transporte de péptidos está constituido por tres elementos que tienen diferentes afinidades en cuanto a tamaño y composición (Kunji y col., 1996; Savijoki y col., 2006; Pangallo y col., 2019;). Por lo tanto, según las distintas fracciones de péptidos obtenidas

mediante PrtP, el sistema de translocación favorecerá el transporte de determinados péptidos más que de otros. Teniendo en cuenta este contexto, Ochnio y col. (2018), sugirieron que el ingreso de AF a las células podría ser potenciado cuando es transportado en nanocomplejos AF-proteína activando otros mecanismos de transporte como los mencionados anteriormente y no sólo a través de los sistemas de transportadores canónicos para folatos. En el caso del complejo WPI-AF, las diversas proteínas que lo integran podrían estar promoviendo un efecto similar al descrito por Ochnio y col. (2018) lo que generaría un aumento en la biodisponibilidad del AF ante *L. casei* BL23.

Si bien estos hallazgos son positivos debido a que el complejamiento del WPI con AF podría aumentar la biodisponibilidad de la vitamina, se genera un planteo respecto a la medición de la vitamina mediante este sistema biológico. Es decir, si se comparan los resultados de WPI-AF con los obtenidos con β lg-AF y AF libre, en términos de concentración en el fluido intestinal (evaluación de la bioaccesibilidad de la vitamina), suponiendo que la estabilidad de los tres sistemas durante la digestión *in vitro* fuera la misma, entonces en el caso del WPI-AF, la vitamina estaría siendo cuantificada en exceso. Por este motivo, se encontró más apropiado discutir los resultados en términos de biodisponibilidad ante *L. casei* BL23, y no en términos de concentraciones o bioaccesibilidad.

4.2.5 Evaluación de la estabilidad física del ingrediente: Temperatura de transición vítrea

Para evaluar la estabilidad física de los ingredientes liofilizados, se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g) de los complejos β lg-AF y WPI-AF mediante DSC y se comparó con los controles de AF, β lg y WPI. Previamente a la medición de T_g , se evaluó la humedad de las muestras liofilizadas, las cuales mostraron resultados similares, sin diferencias

significativas: $2,0 \pm 0,3$ g H₂O/100g b.s. Los termogramas obtenidos se muestran en la **Figura 4.27**.

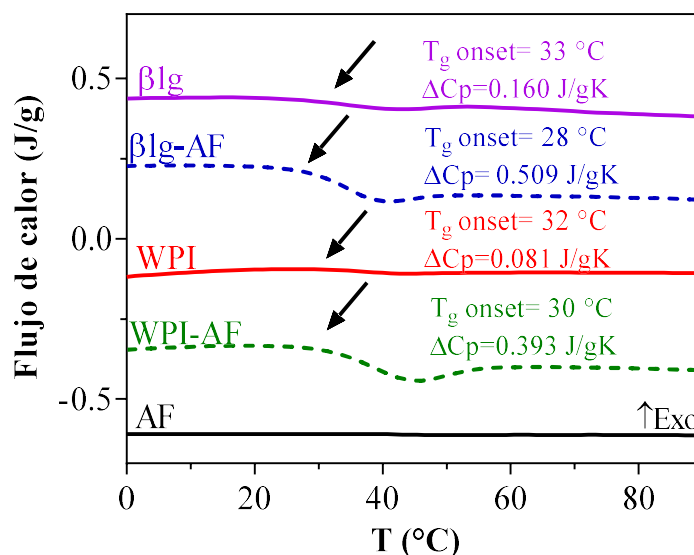


Figura 4.27: Termogramas obtenidos por DSC de los complejos y los respectivos controles liofilizados (velocidad de barrido: 10 °C/min).

La transición vítrea se aprecia como un cambio en la línea de base de las curvas evaluadas por DSC. La curva correspondiente al AF puro no presentó transiciones en el rango de temperatura estudiado, dado que el producto se encontraba en estado cristalino. El valor de T_g para las otras cuatro muestras estudiadas fue de alrededor de 30 °C. Las proteínas suelen presentar valores elevados de T_g . En el caso de β lg y WPI, Zhou y Labuza (2007) reportaron valores de T_g de 114 °C y 119 °C, respectivamente, conteniendo un 7% de humedad (b.s.). Por otro lado, Lu y Zografi (1997) informaron un valor de T_g de ácido cítrico seco de 11 °C. Por lo tanto, los valores de T_g determinados en este trabajo resultan de la mezcla de los diferentes componentes compatibles que contribuyeron a obtener la fase amorfa: proteínas de alta T_g y ácido cítrico de baja T_g . Por otro lado, la presencia de AF no ejerció un efecto relevante sobre los valores de T_g . Esta es una característica positiva desde el punto de vista del desarrollo de

un ingrediente deshidratado consistente en un complejo proteína-ácido fólico. Sin embargo, cabe destacar que los valores de T_g no fueron muy elevados en comparación con la temperatura ambiente, por lo que sería importante la utilización de un envase adecuado para evitar la ocurrencia de cambios físicos deteriorativos durante el almacenamiento, manipulación y transporte de ingredientes liofilizados

4.3 Sección III: Láminas de fruta + ingrediente de proteínas lácteas y ácido fólico

En esta sección se desarrolló una lámina de fruta suplementada con vitamina B9. Esta golosina consistió en la lámina de fruta desarrollada en la **sección I** suplementadas con el ingrediente de WPI-AF elaborado y caracterizado en la **sección II**. Se seleccionó este ingrediente dado que es más económico que el ingrediente β lg-AF, y además los estudios realizados en el régimen diluido mostraron mejores propiedades en cuanto a la biodisponibilidad de la vitamina, lo cual podría resultar muy beneficioso para potenciales consumidores. En esta sección, el objetivo fue investigar acerca de la estabilidad y bioaccesibilidad de la vitamina luego del procesamiento y digestión *in vitro* de la golosina.

Para los fines de la investigación se desarrolló una lámina de manzana y acáchul que contenía WPI-AF (L-WPI-AF), y, además, se elaboraron dos controles que consistieron también en láminas de frutas, pero con AF libre de proteínas y con WPI libre de AF (LC-AF y LC-WPI, respectivamente). Las tres láminas frutales no mostraron diferencias en cuanto a su apariencia, propiedades físicas y tampoco fueron diferentes respecto a las láminas de fruta a las cuales no se les había incorporado ningún ingrediente. Esto era esperable dado que la cantidad de ingrediente que fue necesario agregar para que una lámina aportara 400 μ g de vitamina B9 fue extremadamente baja en comparación con el resto de los ingredientes. Por ejemplo, en el caso del ingrediente WPI-AF, los cálculos indicaron que para 100 g de formulación fresca era necesario añadir 0,0074 g del polvo deshidratado de WPI-AF. Cabe destacar que estos cálculos se realizaron en función de la proporción de AF que contenía el ingrediente en polvo. Para esto se tuvo en cuenta la relación entre los tres componentes mayoritarios que se incorporaron en la solución del complejo y que posteriormente se

deshidrataron: AF, WPI y ácido cítrico (utilizado para ajustar a pH 3). En el caso de los controles se utilizó la misma metodología.

4.3.1 Biodisponibilidad del AF presente en las láminas de fruta ante *L. casei* BL23

Las láminas de frutas suplementadas con el ingrediente de AF y los controles (LC-AF y LC-WPI) se sometieron a una digestión *in vitro*. Posteriormente se cuantificó la concentración de AF presente en el sobrenadante obtenido del procedimiento de la digestión *in vitro*, mediante el método microbiológico de *L. casei* BL23. Tal como fue discutido en la **sección II**, el crecimiento de *L. casei* BL23 depende de la concentración y biodisponibilidad de folatos en la muestra y en el caso del WPI-AF, la interacción entre esta proteína y la vitamina podría aumentar su biodisponibilidad. En este contexto, se tuvo como objetivo investigar si estos efectos continuaban cuándo el ingrediente se incorporaba a una matriz más compleja como es el caso de las láminas de fruta. En la **Figura 4.28** se muestran los resultados.

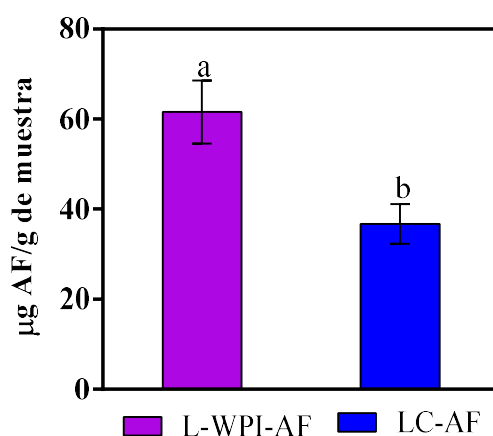


Figura 4.28: Concentración de vitamina B9 en términos de biodisponibilidad ante *L. casei* BL23 presente en la lámina de frutas suplementada con WPI (L-WPI-AF) y la lámina control AF (LC-AF) luego de la digestión *in vitro*. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$,

Luego de la digestión *in vitro*, tanto las láminas suplementadas con WPI-AF (L-WPI-AF) como las láminas control LC-AF mostraron resultados ante *L. casei* BL23, indicando que luego del proceso de desarrollo de las golosinas se conservó, al menos en parte, la vitamina. Además, las láminas LC-WPI no presentaron absorbancia a 600 nm sugiriendo que las golosinas no presentaban folatos naturales (procedentes de las frutas) dado que las células de *L. casei* BL23 sólo crecen en presencia de folatos (Ochnio y col., 2018).

Por otro lado, se puede observar que L-WPI-AF presentó mayor concentración de AF, en función de *L. casei* BL23, que el control LC-AF. Estos resultados son comparables a los obtenidos en la **sección 2 (4.2.4.2)**, es decir que nuevamente sugieren que el WPI-AF es más estable a los efectos del procesamiento y digestión *in vitro*, y/o que en el complejo la vitamina esté más biodisponible para este microorganismo. Este resultado se muestra interesante a los efectos de mejorar la biodisponibilidad de la vitamina para el organismo, sin embargo, no deja de ser una hipótesis. Por este motivo, el AF presente en las láminas digeridas también se evaluó por un método alternativo.

4.3.2 Cuantificación del AF en las láminas suplementadas luego de realizar la digestión *in vitro* mediante HPLC

La búsqueda de un método alternativo tuvo dos objetivos: por un lado, corroborar las hipótesis surgidas en este trabajo sobre el comportamiento del AF cuando se encuentra formando un complejo con WPI (¿la vitamina es más estable y/o más biodisponible en presencia del WPI?), y por otro lado, cuantificar el AF mediante un método más rápido y eficiente. Además, cabe aclarar que la medición mediante HPLC puede distinguir entre las diferentes formas que puede tomar la vitamina (mono, di o triglutamato) en los alimentos

(Koning, 1999; Olivares y col., 2004). Por otro lado, Cheung y col. (2008) describieron a la metodología oficial microbiológica como dificultosa y lenta para obtener resultados debido a que los períodos mínimos de análisis son de 5 días. En el presente trabajo también se observaron inconvenientes al utilizar la metodología oficial, las cuales fueron mencionadas en el ítem 3.2.9.2.1. Por lo tanto, una metodología alternativa podría agilizar los tiempos de análisis, obtener resultados más rápidos, distinguir entre los distintos folatos naturales, aunque en este último punto sería necesario contar con los estándares, y además reducir pérdidas económicas.

Para cumplir con estos objetivos, se utilizó la metodología descrita por Koning (1999) en la que se usa HPLC. Los resultados obtenidos por esta metodología se muestran en la **Figura 4.29**.

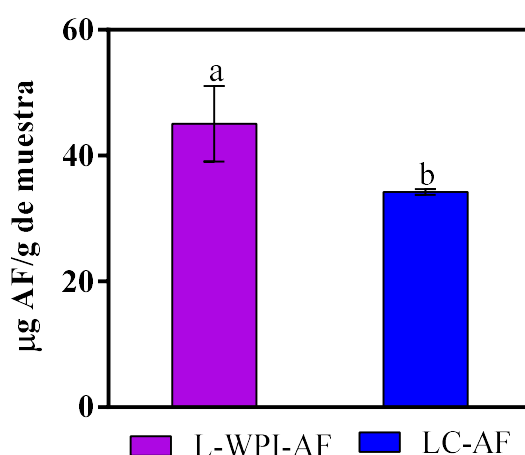


Figura 4.29: Concentración de vitamina B9 presente en la lámina de frutas suplementada con WPI (L-WPI-AF) y la lámina control AF (LC-AF) luego de la digestión *in vitro* medido por HPLC. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Se puede observar que fue factible utilizar la metodología alternativa por HPLC para cuantificar el AF en los sistemas digeridos que contenían esta vitamina. Por otro lado, los valores obtenidos para el sistema digerido L-WPI-AF fueron mayores que los obtenidos para el control LC-AF. Este resultado comprueba una de las hipótesis planteadas durante este

trabajo: el AF es más estable cuanto interacciona con WPI. Es decir que esta proteína logró disminuir la degradación del AF durante el procesamiento de las láminas de fruta, teniendo en cuenta que fueron procesos extremos, dado que las láminas con el ingrediente estuvieron expuestas durante 6 h a 60 °C y posteriormente a los distintos tratamientos que presentó la digestión *in vitro* (enzimáticos, variación de pH). Estos resultados se asemejan a los encontrados por Aceituno-Medina y col. (2015) quienes reportaron mayor termorresistencia de AF encapsulado con proteínas de amaranto y pululano que en la vitamina libre. Sin embargo, en este caso no se detectaron interacciones entre el AF y los componentes de la matriz encapsulante cuando se realizó un análisis de FT-IR, como sí fue observado para las proteínas lácteas y el AF (**Figura 4.19**). En el caso de las muestras L-WPI-AF, el WPI estaría generando un efecto protector tanto por las interacciones presentes, como por el efecto como matriz encapsulante.

Por otro lado, la comparación de los resultados obtenidos mediante el método alternativo de HPLC (**Figura 4.29**) y el método microbiológico oficial (**Figura 4.28**), no mostraron diferencias significativas para el control (LC-AF), pero sí para el sistema L-WPI-AF, obteniéndose un 30% más de AF por el método microbiológico. Estos resultados podrían corroborar la segunda hipótesis planteada en esta sección: el WPI incrementa la biodisponibilidad de la vitamina ante *L. casei* BL23. Otros autores cuantificaron AF en alimentos ricos en esta vitamina, también encontraron valores inferiores por el método HPLC que los obtenidos por la metodología microbiológica oficial, sin embargo, en estos trabajos se destacó que los alimentos analizados contenían diferentes formas de folatos, los cuales fueron valorados mediante la utilización de estándares como 10-HCO folato, 5-HCO-H₄ folato, 5-CH₃-H₄-folato, entre otros (Koning, 1999; Olivares y col. 2004). En este caso, se ha observado que esto no explicaría los resultados, dado que las láminas sin suplementar (LC-WPI) no mostraron resultados por el método microbiológico. Por lo tanto, el WPI-AF estaría siendo

incorporado al interior de las células de *L. casei* BL23 de la misma manera que plantearon Ochnio y col. (2018) y que fue explicada en los resultados del ítem 4.2.4.2. En este sentido, resulta importante mencionar el tratamiento previo que se le realiza a las muestras para cuantificar AF mediante el método oficial. En el método oficial se plantea la necesidad de extraer los folatos de los alimentos en formas mono, di o triglutamilfolato, mediante un tratamiento enzimático con una proteasa y una amilasa, posteriormente un tratamiento térmico para liberar los folatos de la matriz, y finalmente una desconjugación de los poliglutamatos, mediante enzimas específicas, para transformar a los folatos en formas medibles por el microorganismo (Koning, 1993). Sin embargo, se ha indicado que no se justifica este procedimiento para el caso de alimentos fortificados, dado que el ácido fólico es un monoglutamato, por lo que solo sería necesario extraer la vitamina del alimento, sin necesidad de desconjugarlo (Arcot y col., 2002). En el caso de la vitamina presente en las láminas de fruta, las mismas atravesaron tratamientos enzimáticos y tratamientos a distintos valores de pH debido a la digestión *in vitro*, pero queda en evidencia que este procedimiento solamente fue suficiente para extraer a la vitamina en estado libre, y no cuando se encontró interaccionando con el WPI. Por lo tanto, en este caso, la cuantificación mediante el método alternativo ofrece una ventaja dado que no sobreestima la vitamina adicionada.

4.3.3 Bioaccesibilidad de la vitamina B9

La bioaccesibilidad se expresa como un porcentaje de la cantidad del constituyente liberado en el tracto intestinal con respecto a su contenido total (Shahidi y Peng, 2018). Teniendo presente este término, en este trabajo se evaluó la bioaccesibilidad de la vitamina B9 presente en las láminas suplementadas con el ingrediente WPI-AF y en la lámina control (LC-AF). Este valor se calculó de los a partir de los resultados obtenidos por el método alternativo

de HPLC (4.3.2) y no mediante los obtenidos por el método oficial por lo expuesto anteriormente. Se observó que la vitamina presentó una bioaccesibilidad del 50% en las láminas L-WPI-AF y 37% en las láminas LC-AF. Estos resultados son consistentes con los discutidos anteriormente en el ítem 4.3.2, demostrando una vez más la contribución en cuanto a protección y estabilidad que brinda la proteína a la vitamina. No obstante, aunque el WPI generó una protección al AF, esta fue parcial, dado que el 50% de AF restante probablemente se deterioró. Esto era esperable debido a las condiciones del procesamiento de las láminas de fruta y la digestión *in vitro*. En este sentido, Delchier y col. (2014) estudiaron la degradación de los folatos presentes en espinaca y judías en función del tiempo y la temperatura, y mostraron que las pérdidas de folatos fueron de 70% para la espinaca y de 80% para las judías, cuando fueron expuestas a 65 °C, 60 y 90 min, respectivamente. En el caso de las láminas suplementadas, tanto L-WPI-AF como LC-AF, fueron expuestas durante 6 horas a 60 °C, en consecuencia, resulta razonable que haya tenido lugar una cierta degradación de la vitamina B9.

Conclusión

5. Conclusión

Se desarrolló una lámina de fruta utilizando manzana y polvo de acácul. Estos componentes aportaron características físicas, como el color y la textura, generando un producto final muy atractivo, características que fueron apoyadas por los estudios sensoriales cualitativos y cuantitativos que demostraron un alto porcentaje de satisfacción del producto y de intención de compra.

Por otro lado, se logró obtener dos ingredientes (β lg-AF y WPI-AF) desarrollados a partir de β -lactoglobulina, aislado de proteína de suero y ácido fólico. Los estudios permitieron caracterizar los sistemas e interpretar las formas de interacción entre las proteínas y el ácido fólico, y adicionalmente, la biodisponibilidad del AF luego de someter los ingredientes a una digestión *in vitro*.

Finalmente, se utilizó el ingrediente WPI-AF para suplementar las láminas de fruta con vitamina B9, resultando el AF más estable frente a las condiciones de procesamiento de la golosina y más bioaccesible que en las láminas suplementadas con AF libre. Esta golosina podría ser una alternativa saludable y atractiva para personas con requerimientos elevados de esta vitamina como son las embarazadas.

A continuación, se resumen las principales conclusiones de este trabajo:

1) Láminas de frutas a base de manzana y acácul

Características de los ingredientes

- La caracterización fisicoquímica de los materiales permitió conocer con precisión el material de partida con el que se elaboraron posteriormente las láminas de fruta. El ingrediente más destacado fue el polvo de acácul, dado que se desarrolló a partir de un

fruto silvestre. Este ingrediente presentó un color púrpura intenso siendo adecuado para su empleo como colorante natural.

- Los estudios de isoterma de sorción de agua y T_g permitieron estimar la estabilidad del polvo de acáchul, indicando que se debe almacenar a una a_w menor a 0,33 para que no sufra cambios físicos deteriorativos a temperatura ambiente.
- La caracterización del potencial bioactivo mostró que el polvo de acáchul presentó una elevada capacidad antioxidante, convirtiéndolo en un ingrediente óptimo para desarrollar alimentos potencialmente funcionales.

Características fisicoquímicas y potencialmente funcionales de las láminas de frutas

- Las láminas de frutas se caracterizaron por presentar un color intenso y oscuro debido al polvo de acáchul, además la textura fue gomosa, lo cual es característico en este tipo de productos.
- El proceso de deshidratación afectó levemente el contenido de polifenoles totales y de las antocianinas monoméricas, generando un producto final con un interesante contenido de compuestos con actividad antioxidante.
- En la fracción soluble de la digestión *in vitro* se registró una elevada bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante. Adicionalmente, la fracción insoluble también conservó una alta capacidad antioxidante sugiriendo una posible contribución para producir un efecto biológico positivo en el microbiota intestinal.
- La composición centesimal mostró que esta golosina presenta bajas calorías lo que constituye una característica favorable para personas que siguen una dieta hipocalórica. Además, las láminas de frutas presentaron un interesante contenido de fibra que podría contribuir en múltiples beneficios para la salud vinculados al control de peso, control de la absorción del colesterol sérico y prevención de cáncer de colon.

Estudios sensoriales

- El estudio sensorial cualitativo permitió conocer la percepción de los consumidores potenciales sobre las láminas de frutas. En este sentido, un gran porcentaje de consumidores otorgó calificaciones en categorías positivas y mostró una intención de compra elevada.
- Un alto porcentaje de integrantes del panel sensorial calificó a las láminas de frutas con puntajes elevados de grado de satisfacción global y por atributos. Por otro lado, la intensidad en las que se presentaban los atributos sensoriales resultó evaluada mayoritariamente en su punto justo.
- Los estudios sensoriales sugieren que no es necesario realizar cambios en la formulación de las láminas de frutas y que el producto podría tener un alto potencial para ser considerado un prototipo para su lanzamiento al mercado.

Estabilidad

- El color rojo/púrpura intenso de las láminas de frutas se mantuvo estable durante los seis meses de almacenamiento, demostrando nuevamente que el polvo de acáchul es una opción muy interesante para ser utilizado como colorante, no sólo por su contribución al color del producto final, sino también por ser estable en el tiempo.
- El contenido de antocianinas monoméricas mostró cambios relevantes en el tiempo, sin embargo, estos cambios no se vieron reflejados en el contenido de polifenoles totales, sugiriendo que las moléculas de antocianinas pueden convertirse parcialmente en productos de naturaleza polifenólica, los cuales también contribuyen a la capacidad antioxidante.
- Luego de 4 meses de almacenamiento, las muestras sufrieron una deshidratación importante a pesar de encontrarse en envases cerrados. Resulta primordial emplear otro tipo de films para envasar las láminas frutales de manera de no comprometer su vida útil físicoquímica y sensorial, particularmente la textura.

2) Ingredientes de proteínas lácteas y vitamina B9

Interacciones proteína- vitamina

- Se logró desarrollar un procedimiento para generar ingredientes concentrados a base de ácido fólico y proteínas lácteas. La reducción del pH de las soluciones de proteínas y AF provocó la formación espontánea de agregados, logrando generar una separación de fases concentrando al ingrediente en la fase inferior.
- El análisis FT-IR permitió conocer las interacciones presentes entre las proteínas y la vitamina. Tanto β lg-AF como WPI-AF mostraron cambios en la posición y forma de picos en varios números de onda, revelando que las interacciones con el AF podrían presentarse a través del anillo de pteridina, del ácido p-amino-benzoico y de grupos del ácido glutámico.
- El estudio del potencial ζ mostró la cancelación de cargas cuando se generaron los complejos, sugiriendo que las interacciones entre las proteínas y la vitamina podrían ser mayoritariamente del tipo electrostático.
- El estudio del tamaño de partícula en nano y microescala permitió conocer y caracterizar los diferentes tamaños de partícula que presentaron estos ingredientes. Se observaron diferencias de tamaños en los complejos respecto a sus constituyentes individuales. El estudio de la cinética de agregación contribuyó con información complementaria acerca del desarrollo de los complejos y las interacciones generadas entre la proteína y la vitamina.

Caracterización del potencial funcional de los complejos

- El AF presentó capacidad antioxidante, siendo más elevada conforme se aumentó su concentración. Sin embargo, teniendo en cuenta las dosis diarias recomendadas, la

contribución del AF en cuanto a CA no sería significativa con respecto a otros alimentos de una dieta.

- Los estudios de biodisponibilidad mediante el modelo *L. casei* BL23 luego del proceso de digestión *in vitro* no mostraron diferencias entre β lg-AF y el control AF, mientras que WPI-AF presentó mayor biodisponibilidad sugiriendo que las células podrían incorporar a la vitamina no sólo por el sistema de transporte de folatos, sino que también podrían emplear un sistema de transporte de proteínas. Esta característica resulta positiva y amerita futuros estudios para dilucidar mecanismos de transporte en modelos *in vivo*, de manera de poder corroborar una mayor biodisponibilidad de la vitamina a través de suplementos WPI-AF.
- La metodología oficial microbiológica para cuantificar AF mediante *L. casei* BL23 se encontró apropiada para evaluar la vitamina en términos de biodisponibilidad, pero resultó inexacta para obtener datos acerca de la concentración real del AF, debido a que no es sencillo liberar al AF de los complejos con proteínas. Esto sugiere que sería más adecuado realizar esta evaluación por un método alternativo, en particular en los casos en los que no se pueda verificar la liberación del AF de la matriz alimentaria en estudio.

Estabilidad física

- La evaluación de la estabilidad de los polvos mediante la temperatura de transición vítrea y la humedad permitió establecer que los ingredientes en polvo presentaron una humedad muy baja y valores de T_g no muy elevados, sugiriendo que estos polvos deben ser almacenados adecuadamente para que no se generen cambios físicos que causen deterioro.

3) Láminas de fruta suplementadas con WPI-AF

- Se desarrolló una lámina de fruta suplementada con WPI-AF con características físicas similares a las láminas sin suplementar.

- El estudio de biodisponibilidad ante *L. casei* BL23 luego de la digestión *in vitro* brindó información acerca de la estabilidad de la vitamina durante el procesamiento y durante la digestión *in vitro*. Por otro lado, las láminas L-WPI-AF obtuvieron mayor biodisponibilidad que las láminas control, sugiriendo que el WPI podría estar protegiendo a la vitamina y al mismo tiempo aumentando su biodisponibilidad.
- A través de la cuantificación de AF mediante HPLC se logró corroborar las hipótesis planteadas respecto a la protección y aumento de biodisponibilidad que podría ejercer el WPI sobre la vitamina.
- Fue posible determinar la bioaccesibilidad de la vitamina a partir de los estudios realizados con el método alternativo de HPLC, mostrando que la vitamina presenta mayor bioaccesibilidad cuando se encuentra complejada con la proteína que cuando se halla de forma libre.
- Los resultados obtenidos de la cuantificación de la vitamina mediante el método microbiológico oficial y el método alternativo de HPLC son un precedente muy importante para futuros estudios de alimentos suplementados con AF mediante ingredientes formulados a base de proteínas.

Bibliografía

6. Bibliografía

- Abdelkarim, G.; Bellaoui, M. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3): 174-179.
- Abbott, J.; Safner, R. A.; Gross, K. C.; Vinyard, B. T.; Janick, J. (2004). Consumer evaluation and quality measurement of fresh-cut slices of ‘Fuji,’ ‘Golden Delicious,’ ‘GoldRush,’ and ‘Granny Smith’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 33:127-140.
- Aceituno-Medina, M.; Mendoza, S.; Lagaron, J. M.; López-Rubio, A. (2015) Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate-pullulan electrospun fibers. *LWT - Food Science and Technology*, 62:970-975.
- Akhtar, M. J.; Khan, M. A.; Ahmad, I. (1999). Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25:269 – 275.
- Alaburda, J.; de Almedida, P.; Shundo, L.; Ruvieri, V.; Sabino M. (2008). Determination of folic acid in fortified wheat flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:336–342.
- Alam, M. N.; Jahan-Bristi, N.; Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21:143–152.
- Alcántara, C.; Bäuerl, C.; Revilla-Guarinos, A.; Pérez-Martínez, G.; Monedero, V.; Zúñiga, M. (2016). Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR-family response regulator in *Lactobacillus casei*. *Molecular Microbiology*, 100(1):25–41.
- Al-Jassar, S. A.; Mikajiri, S.; Roos, Y. J. (2020). Rehydration of whey protein isolate: Effect of temperature, water activity, and storage time. *LWT-Food Science and Technology*, 133:110099.
- Alten, B.; Yesiltepe, M.; Bayraktar, E.; Taskin Tas, S.; Gocmen, A. Y.; Kursungoz, C.; Martínez, A.; Sara, Y. (2018). High-fructose corn syrup consumption in adolescent rats

- causes bipolar-like behavioural phenotype with hyperexcitability in hippocampal CA3-CA1 synapses. *British Journal of Pharmacology*, 75(24):4450-4463.
- Alvares-Delfino, V.D.; Andrade-Vianna, C.; Mocelin, J.M.; Sabbatini-Barbosa, D.; Aiko-Mise, R.; Matsuo, T. (2007). Folic acid therapy reduces plasma homocysteine levels and improves plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. *Nutrition*, 23(3):242-247.
- Antonio-Gómez, M. V.; Salinas-Moreno, Y.; Hernández-Rosas, F.; Martínez-Bustos, F.; Andrade-González, I.; Herrera-Corredor, J. A. (2021). Optimized extraction, microencapsulation, and stability of anthocyanins from *Ardisia compressa* K. Fruit. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 71 (3):299-310.
- Antunes, F.; Andrade, F.; Ferreira, D.; Nielsen, H. M.; Sarmiento, S. (2013). Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins. *Current Drug Metabolism*, 14: 4-20.
- Anzaldúa Morales, A. A. (1994). Pruebas sensoriales. *La Evaluación Sensorial en la Teoría y la Práctica* (1 ed., pp. 87- 92). Editorial Acribia.
- AOAC (1984). "Official Methods of Analysis", 14th ed., Section 2.057; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, U.S.A.
- AOAC (2000, 2005, 2006). Official methods of analysis of AOAC international. (18th ed.). Association of Official Analytical Chemist: Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC (2000). AOAC Official Method 992.05 Folic Acid (Pteroylglutamic Acid) in Infant Formula. In: Horwitz, W. (Ed.) *Official Methods of Analysis* (17 ed. pp. 50.024-50.026). Association of Official Analytical Chemist: Gaithersburg, MD, USA
- Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement: I. Classification, physicochemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agric. Food Chem*, 64(7):997-1027.
- Arancibia-Avila, P.; Namiesnik, J.; Toledo, F.; Werner, E.; Martinez-Ayala, A. L.; Rocha-Guzmán, N. E.; Gallegos-Infante, J. A.; Gorinstein, S. (2012). The influence of different time durations of thermal processing on berries quality. *Food Control*, 587-593.

- Archaina, D.; Sosa, N.; Rivero, R.; Schebor, C. (2019). Freeze-dried candies from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and yoghurt. Physicochemical and sensorial characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 100:444-449.
- Arcot, J.; Shrestha, A. K.; Gusanov, U. (2002). Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. *Food Control*, 13:245–252.
- Ares, G.; Deliza, R.; Barreiro, C.; Giménez, A.; Gámbaro, A. (2010). Comparison of two sensory profiling techniques based on consumer perception. *Food Quality and Preference*, 21(4):417–426.
- Arévalo-Pinedo, A.; Giraldo-Zuniga, A. D.; Dos Santos, F. L.; Arevalo, D. S. Z.; Arevalo, P. R. (2004). Sorption isotherms experimental data and mathematical models for murici pulp (*Byrsonima sericea*). En: Silva M., Rocha S. (eds): Drying 2004, *Proceedings 14th Drying Symposium* (IDS 2004). San Pablo, Brasil, A:634-639.
- Arzeni, C.; Pérez, O. E.; LeBlanc, J. G.; Pilosof, A. M. R. (2015). Egg albumin-folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. *Journal of Functional Foods*, 18:379–386.
- Assadpour, E.; Maghsoudlou, Y.; Jafari, S. M.; Ghorbani, M.; Aalami, M. (2016). Optimization of folic acid nano-emulsification and encapsulation by maltodextrin-whey protein double emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86:197-20.
- Assadpour, E.; Jafari, S. M.; Maghsoudlou, Y. (2017). Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95:238–247
- Assanelli, D.; Bonanome, A.; Pezzini, A.; Albertini, F.; Maccalli, P.; Grassi, M.; ... Visioli, F. (2004). Folic acid and Vitamin E supplementation effects on homocysteinemia, endothelial function and plasma antioxidant capacity in young myocardial-infarction patients. *Pharmacological Research*, 49(1):79–84.
- Awuchi, C. G.; Igwe, V. S.; Amagwula, I., Echeta, C. K. (2020). Health benefits of micronutrients (vitamins and minerals) and their associated deficiency diseases: A systematic review. *International Journal of Food Sciences*, 3 (1):1-32.

- Azeredo, H. M. C.; Brito, E. S.; Moreira, G. E. G.; Farias, V. L.; Bruno, L. M. (2006). Effect of drying and storage time on the physico-chemical properties of mango leathers. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(6):635-638.
- Babalola, S. O.; Ashaye, O. A.; Babalola, A. O.; Aina, J. O. (2002). Effect of cold temperature storage on the quality attributes of pawpaw and guava leathers. *African Journal of Biotechnology*, 1 (2): 57–60.
- Badui Dergal, S. (2006). Vitaminas y nutrientes inorgánicos. Quintanar-Duarte, E. Ed. En: *Química de los alimentos* (4 ed., pp.363-370). Pearson Educación.
- Baker-Smith, C.; de Ferranti, S. D.; Cochran, W.J. (2019). The use of nonnutritive sweeteners in children. *Pediatrics*, 144(5):1-20.
- Baranowska, M.; Koziara, Z.; Suliborska, K.; Chrzanowski, W.; Wormstone, M.; Namieśnik, J.; Bartoszek, A. (2021). Interactions between polyphenolic antioxidants quercetin and naringenin dictate the distinctive redox-related chemical and biological behaviour of their mixtures. *Scientific Reports*, 11:12282.
- Barraza-Garza, G.; de la Rosa, L.; Martínez-Martínez, A.; Castillo-Michel, H.; Cotte, M.; Alvarez-Parrilla, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana Química*, 41(3):125-147.
- Barreira, J. C. M.; Alvarez-Araibi, A.; Ferrerira, I. C. F. R. (2019). Bioactive and functional compounds in apple pomace from juice and cider manufacturing: Potential use in dermal formulations. *Trends in Food Science & Technology*, 90:76–87.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(9):1073-1101.
- Benzie, I. F.; Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70-76.
- Berry Ottaway, P. (2010). Stability of vitamins during food processing and storage. En: *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* (pp. 539-560). Woodhead Publishing Limited.

- Boyer, J.; Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Biomed central-Nutrition Journal*, 3(5):1-15.
- Brandle, J.; Telmer, P. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68:1855-1863
- Brodkorb, A.; Egger, L.; Alminger, M.; Alvito, P.; Assunção, R.; Ballance, S.; ... ; Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.
- Bruzzone, I. (2008). Manzana y Pera. *Alimentos Argentinos*, 47(05): 18-24.
- Busso-Casati, C.; Baeza, R.; Sánchez, V. (2019). Physicochemical properties and bioactive compounds content in encapsulated freeze-dried powders obtained from blueberry, elderberry, blackcurrant and maqui berry. *Journal of Berry Research*, 1-17.
- Calvo, E. B.; Bliglieri, A. (2008). Impacto de la fortificación con ácido fólico sobre el estado nutricional en mujeres y la prevalencia de defectos del tubo neural. *Arch. argent. pediatr.*, 106(6):492-498.
- Cámara Argentina de Fruticultores Integrados (CAFI, 2021). <http://www.cafi.org.ar/>.
- Cappa C.; Lavelli V.; Mariotti M. (2015). Fruit candies enriched with grape skin powders: Physicochemical properties. *LWT- Food Science and Technology*, 62(1):569-575.
- Caravajal-Caravajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista medicina legal de Costa Rica*, 36(1):91-100.
- Carbonaro, M.; Nucara, A. (2009). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids*, 38:679–690.
- Carbonell-Capella, J.M.; Buniowska, M.; Barba, F.; Esteve, M.; Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 155-171
- Cárdenas-Mazón, N.; Cevallos-Hermida, C. E.; Salazar-Yacelga, J. C.; Romero-Machado, E. R.; Patricia L. Gallegos-Murillo, P. L.; Cáceres-Mena, M. E. (2018). Uso de pruebas

- afectivas, discriminatorias y descriptivas de evaluación sensorial en el campo gastronómico. *Dominio de Ciencias*, 4(3):253-263.
- Cardona, S.L.; Cabrera, C. G. (2010). Estudio de la fotodegradación de ácido fólico encapsulado en microesferas de goma arábica y maltodextrina. *Rev Cuba Farm.*, 44(4):443–5.
- Carocho, M., Morales, P. y Ferreira, I. C. F. R. (2017). Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology*, 107:302-317.
- Carpinetti, L.; Martínez, J.; Pilosof, A.; Pérez, O. (2014). β -Lactoglobulin–carboxymethylcellulose core–shell microparticles: Construction, characterization and isolation. *Journal of Food Engineering*, 131:65-74.
- Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. L.; Páez-Hernandez, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859–871.
- Carter, B. G.; Drake, M. A. (2018). Invited review: The effects of processing parameters on the flavor of whey protein ingredients. *J. Dairy Sci.* 101:6691–6702.
- Chandrasekara, A.; Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *J. Funct. Food*, 4(1): 226–237.
- Cheema, M.; Mohan, M. S.; Campagna, S. R.; Jurat-Fuentes, J. L.; Harte, F. M. (2015). The association of low-molecular-weight hydrophobic compounds with native casein micelles in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 98:5155-5163
- Che Man, Y. B.; K.-Sin, K. (1997). Processing and consumer acceptance of fruit leather from the unfertilised floral parts of jackfruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1):102-108.
- Che-Man, Y. B; Jaswir, I.; Yusof, Y.; Selamat, J.; Sugisawa, H. (1997). Effect of different dryers and drying conditions on acceptability and physicochemical characteristics of durian leather. *Journal of Food Processing and Preservation*, 21(5):425-441

- Chanamai, R.; McClements, D. (2002). Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: Influence of pH, CaCl₂ and temperature. *Journal of Food Science*, 67(1):120-125.
- Chen, L.; Remondetto, G.E.; Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17:272-83.
- Cheung, R. H. F.; Morrison, P.; Small D. M.; Marriott, P. J. (2008). Investigation of folic acid stability in fortified instant noodles by use of capillary electrophoresis and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1213: 93–99.
- Cipolletti, M; Fernandez, V.S.; Montalesi, E.; Marino, M.; Fiocchetti, M. (2018) Beyond the antioxidant activity of dietary polyphenols in cancer: the modulation of estrogen receptors (ERs) signaling. *Int J Mol Sci*, 19 (2624):1-23.
- Ciuchi, F.; Di Nicola, G.; Franz, H.; Gottarelli, G.; Marisni, P.; Ponzi-Bozzi, M. G.; Spada, G. P. (1994) Self-Recognition and self-assembly of folic acid salts: columnar liquid crystalline polymorphism and the column growth process. *J. Am. Chem. Soc.* (116):7064-7071.
- Código Alimentario Argentino (CAA).
<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos (actualización 2021). Disponible en:
<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>.
- Coria Cayupán, Y. S.; Ochoa, M. J.; Nazareno, M. A. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. Fruits. Changes in bioactive compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126(2):514-519.
- Crider, K. S.; Bailey, L. B.; Berry, R. J. (2011). Folic acid food fortification—Its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*, 3(3):370–384.
- Czarnowska, M.; Gujska, E. (2012). Effect of freezing technology and storage conditions on folate content in selected vegetables. *Plant Foods Hum Nutr*, 67:401–406.

- Dahiya, S.; Dhawan, S. (2004). Effect of drying methods on nutritional composition of dehydrated aonla fruit (*Emblica officinalis* Garten) during storage. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58:1-9.
- Dangles, O.; Fenger, J. A. (2018). The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. *Molecules*, 23: 1-23.
- Darlington, L. G.; Stone, T. W. (2001). Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *British Journal of Nutrition*, 85:251-269.
- Deis, R. C. (2016). Maltitol syrups and polyglycitols. O'Brien-Nabors (ed.). En: L. *Alternative Sweeteners, Fourth Edition* (pp. 282–291). Taylor & Francis Group.
- Delchier, N.; Ringling, C.; Maingonnat, J.F.; Rychlik, M.; Renard, C. (2014). Mechanisms of folate losses during processing: Diffusion vs. heat degradation. *Food Chemistry*, 157:439-447.
- Demarchi, S. M.; Quinteros, N. A.; Concellón, A.; Giner S. (2013). Effect of temperature on hot-air drying rate and on retention of antioxidant capacity in apple. *Food and Bioproducts Processing*, 91:310-318.
- Di Gioia, F.; Tzortzakis, N.; Roupahel, Y.; Kyriacou, M.; Sampaio, S.; Ferreira, I. C. F. R.; Petropoulos, S. A. (2020). Grown to be blue—Antioxidant properties and health effects of colored vegetables. Part II: Leafy, fruit, and other vegetables. *Antioxidants*, 9 (97): 1-42.
- Di Meo, S.; Reed, T. T.; Venditti, P. Victor, M. V. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-44.
- Diamante, L.; Li, S.; Xu, Q. Busch, J. (2013). Effects of apple juice concentrate, blackcurrant concentrate and pectin levels on selected qualities of apple-blackcurrant fruit leather. *Foods*, 2(3), 430-443.
- Diamante, L. M.; Bai, X.; Busch, J. (2014). Fruit Leathers: Method of preparation and effect of different conditions on qualities. *International Journal of Food Science*, 1-12.

- Díaz-García, A.; Salvá-Ruiz, B.; Bautista-Cruz, N.; Cordezo-Hoyos, L. (2021). Optimization of a natural low-calorie antioxidant tea prepared from purple corn (*Zea mays* L.) cobs and stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *LWT- Food Science and Technology*, 150:111952.
- Dissanayake, M.; Kelly, A.; Vasiljevic, T. (2010). Gelling Properties of Microparticulated Whey Proteins. *J. Agric. Food Chem*, 58:6825-6832.
- Dobrzański, B.; Rabcewicz, J.; Rybczyński, R. (2006). Capítulo 1, Apple. En: *Handling of Apple* (1 ed., pp.17-32). Editor Kowalczyk, J. Editado por: B. Dobrzański Institute of Agrophysics of Polish Academy of Sciences.
- Domínguez-Díaz, D.; Fernández-Ruiz, V.; Cámara, M. (2020). An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *Journal of Functional Foods*, 68:2-14.
- Donato, L.; Guyomarc'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein/ κ -casein complexes in heated skim milk –A review. *Dairy Sci. Technol*, 89:3–29.
- Drake, M. A.; Drake, S.; Bodyfelt, F.; Clark, S.; Costello, M. (2009). History of sensory analysis. Editores: Clark, S., Costello, M., Drake, M. A. y Bodyfelt, F. En: *The sensory evaluation of dairy products*. Editorial: Springer-Verlag.
- Ergün, Z. (2021). Determination of biochemical contents of fresh, oven-dried, and sun-dried peels and pulps of five apple cultivars (Amasya, Braeburn, Golden Delicious, Granny Smith, and Starking). *Journal of Food Quality*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2021/9916694>.
- Eudes, A.; Erkens, G.B.; Slotboom, D.J.; Rodionov, D.A.; Naponelli, V.; Hanson, A.D. (2008) Identification of genes encoding the folate and thiamine binding membrane proteins in firmicutes. *J. Bacteriol.*, 190:7591–759.
- FAO (2002). Vitaminas. M. Latham (ed). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo* (Vol. 29). Colección FAO. <https://www.fao.org/3/w0073s/w0073s0f.htm>.
- FAO-PRODAR (2014). Procesado de frutas. *Ficha técnica Inpho-FAO*, 8-61. <https://www.fao.org/in-action/inpho/publicaciones/detail/es/c/2473/>.

- FAO (2020). Frutas y verduras esenciales en tu dieta. Año Internacional de las Frutas y Verduras 2021. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb2395es>.
- Farooq, M. A.; Aquib, M.; Ghayas, S.; Busrha, R.; Khan, D. H.; Parveen, A.; Wang, B. (2019). Whey protein: A functional and promising material for drug delivery systems recent developments and future prospects. *Polym Adv Technol.*;30:2183–2191.
- Fennema, O. R. (2000). Vitaminas. En: Química de los alimentos (2da ed., pp. 627-633). Acribia SA.
- Flores, F.; Singh, R.; Kong, F. (2014). Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering*, 137:1-
- Foegeding, E. A.; Luck, P.; Vardhanabhuti, B. (2011). Whey protein products. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3, pp.1957-1960). Elsevier Ltd.
- Francini, A.; Sebastiani, L. (2013). Phenolic Compounds in apple (*Malus x domestica* Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing. *Antioxidants*, 2(3):181-193
- Frewer, L.; Scholderer, J.; Lambert, N. (2003). Consumer acceptance of functional foods: issues for the future. *British food Journal*, 105(10), 714-731.
- Frommherz, L.; Martiniak, Y.; Heuer, T.; Roth, A.; Kulling, S. E.; Hoffmann, I. (2014). Degradation of folic acid in fortified vitamin juices during long term storage. *Food chemistry*, 159:122–127.
- Fry, J. C. (2012). Natural low-calorie sweeteners. Baines, D.; Seal, R. (Eds.). En: *Natural Food Additives, Ingredients and Flavours* (41-75). Woodhead Publishing Limited.
- Gambaro, A. (2018). Projective techniques to study consumer perception of food. *Current Opinion in Food Science*, 21:46–50.
- García-Flores, A.; Márquez-Meléndez, E. S.; Ayala-Soto, I. S.; Hernández-Ochoa, L. (2019). Physicochemical and sensory characteristics of a chagalapoli fruit (*Ardisia compressa*) beverage fermented using *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Science*, 1-8.

- García-Gabarra, A. (2006). Ingesta de nutrientes: Conceptos y recomendaciones internacionales (2ª Parte). *Nutr Hosp*, 21(4):437-47.
- Garna, H.; Mabon, N.; Robert, C.; Cornet, C.; Nott, K.; Legros, H.; ... Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol. *Journal of Food Science*, 72(1):001-009
- Gasmalla, M. A.; Yang, R.; Hua X. (2014). Stevia *rebaudiana* Bertoni: An alternative sugar replacer and its application in food industry. *Food Engineering Reviews*, 6:150-162.
- Giacalone, G.; Da Silva, T. M.; Peano, C.; Giuggioli, N. R. (2019). Development of fruit leather from actinidia arguta by product: quality assessment and shelf life studies. *Italian Journal of Food Science*, 31:470-486.
- Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2:1-13.
- Gómez-Giraldo, G. I.; Orrego-Alzate, C. E.; Grajales, L. M.; Telis, V. R. N.; Gabas, A. L.; Telis-Romero, J. (2011). Effect of drying methods on the thermodynamic properties of blackberry pulp powder. *Dyna*, 78(168):139-148.
- Gómez-Morales, L.; Beltrán-Romero, M.; García-Puig, J. (2013). Azúcar y enfermedades cardiovasculares. *Nutrición Hospitalaria*, 28(4):88-94.
- Gómez-Mattson, M.; Corfield, R.; Bajda, L.; Pérez, O.; Schebor, C.; Salvatori, D. (2021). Potential bioactive ingredient from elderberry fruit: Process optimization for a maximum phenolic recovery, physicochemical characterization, and bioaccessibility. *Journal of Berry Research*, 11(1):51-61.
- Góngora-Salazar, V. A.; Vázquez-Encalada, S.; Corona-Cruz, A.; Segura-Campos, M. R. (2018). Stevia *rebaudiana*: A sweetener and potential bioactive ingredient in the development of functional cookies. *Journal of Functional Foods*, 44:183-90.
- Gliszczyska-Swigło, A (2007). Folates as antioxidants. *Food Chemistry*, 101:1480-1483.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 81A(1):90-96.

- Gregg, S. J.; Sing, K. S. W. (1982). Adsorption, surface area and porosity, 2nd ed. Capítulos 2 y 3, Academic Press, Londres.
- Gregory, J. F. (1989). Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33:1-101.
- Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: A review. *European Food Research and Technology*. 241:1-14.
- Guerrero, L.; Claret, A.; Verbeke, W.; Enderli, G.; Zakowska-Biemans, S.; Vanhonacker, F.; Hersleth, M. (2010). Perception of traditional food products in six European regions using free word association. *Food Quality and Preference*, 21(2):225–233.
- Gujral, H. S.; Brar, S. S. (2007). Effect of hydrocolloids on the dehydration kinetics, color, and texture of mango leather. *International Journal of Food Properties*, 6(2):269-279.
- Gujral, H. S.; Khanna, G. (2002). Effect of skim milk powder, soy protein concentrate and sucrose on the dehydration behaviour, texture, color and acceptability of mango leather. *Journal of Food Engineering*, 55(4):343–348.
- Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94:651–715.
- Gupta, (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *IJPSR*, 6(2): 546-566.
- Gutiérrez-Grijalva, E.P.; Ambriz-Pérez, D.L.; Leyva-López, N.; Castillo-López, R.I.; Heredia, J.B. (2016). Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 66(2): 87–100.
- Hager, T.; Howard, L.; Prior, R. (2008). Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blackberry Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:689-695.
- Halabi, A.; Deglaire, A.; Hamon, P.; Bouhallab, S.; Dupont, D.; Croguennec, T. (2020). Kinetics of heat-induced denaturation of proteins in model infant milk formulas as a function of whey protein composition. *Food Chemistry*, 302:125296.

- Hariram-Nile, S.; Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2):134-144.
- Heasman, M.; Mellentin, J. (2001). What are Functional Foods? En: *The Functional Foods Revolution. Healthy People, Healthy Profits*. (1ra ed., pp. 4-32). Editorial Routledge.
- Henríquez, C.; Almonacid, S.; Chiffelle, I.; Valenzuela, T.; Araya, M.; Cabezas, L.; Simpson, R.; Speisky, H. (2010). Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4):523-536.
- Heredia-Vásquez, J. (2013). Propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de polvos nanoestructurados de *Ardisia Compressa* Kunth. Tesis de maestría. Universidad de Veracruz, 1-28.
- Hernández S. S.; Briseño, M. A. M.; Hernández, R. V. G. (2017). Diversificación de la sombra tradicional de cafetales en Veracruz mediante especies maderables. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(40):7-18.
- Henderson, G. B.; Zevely, E. M.; Huennekens, F. M. (1979). Coupling of energy to folate transport in *Lactobacillus casei*. *Journal of Bacteriology*, 139(2):552-559.
- Henriquez, C.; Almonacid, S.; Chiffelle, I.; Valenzuela, T.; Araya, M.; Cabezas, L.; Simpson, R.; Speisky, H. (2010). Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chilean journal of agricultural research*, 70(4):523-536.
- Hieke, S.; Cascanette, T.; Pravst, I.; Kaur, A.; Van-Trijp, H.C.M.; Verbeke, W.; Grunert, K. G. (2016). The role of health-related claims and health-related symbols in consumer behaviour: The CLYMBOL project. *Agro Food Industry Hi Tech*, 27(3):26-29.
- Hu, Y.; Deng, L.; Chen, J.; Zhou, S.; Liu, S.; Fu, Y.; Yang, C.; Liao, Z.; Chen, M. (2016). An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars. *Food Chemistry*, 194:46-54.

- Hu, Y.; He, C.; Jiang, C.; Liao, Y.; Xiong, H.; Zhao, Q. (2020) Complexation with whey protein fibrils and chitosan: A potential vehicle for curcumin with improved aqueous dispersion stability and enhanced antioxidant activity. *Food Hydrocolloids*, 104:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105729>
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*, 53: 1841-1856.
- Huag, I. J.; Skar, H. M.; Vegarud, G. E.; Langsrud, T.; Draget, K. I. (2009). Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 23:2287–2293.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126:1821-1835.
- Imamura, F.; O'Connor, L.; Ye, Z.; Mursu, J.; Hayashino, Y.; Bhupathiraju, S. N.; Forouhi, N. G. (2016). Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *British Journal of Sports Medicine*, 50(8), 496-504.
- Imeh, U.; Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22):630-6306.
- Irwandi, J.; Che Man, Y. B.; Yusof, S.; Jinap, S.; Sugisawa, H. (1998). Effects of type of packaging materials on physicochemical, microbiological and sensory characteristics of durian fruit leather during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(3):427–434.
- Jackson, P.; Romo M.; Castillo, M.; Castillo-Durán, C. (2004). Las golosinas en la alimentación infantil. *Revista Médica de Chile*, 132:1235-1242.
- Jastrebova, J.; Axelsson, M.; Strandler, H.S.; Jagerstad, M. (2013). Stability of dietary 5-formyl-tetrahydrofolate and its determination by HPLC : a pilot study on impact of pH, temperature and antioxidants on analytical results. *Eur Food Res Technol*. 237:747–54.

- JECFA (1993). <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=4276>.
- JECFA (2019). <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=267>.
- Joaquín-Cruz, E.; Dueñas, M.; García-Cruz, L.; Salinas-Moreno, Y.; Santos-Buelga, C.; García-Salinas, C. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition, and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70:151-157.
- Joshi, R.; Adhikari, S.; Patro, B. S.; Chattopadhyay, S.; Mukherjee, T. (2001). Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 30 (12):1390-1399.
- Joshi, K.; Kumari, A.; Arora, S.; Singh, A.K. (2016). Development of an analytical protocol for the estimation of maltitol from yoghurt, burfi and flavoured milk. *LWT-Food Science and Technology*, 70:41-45.
- Kacurakova, M.; Wilson, R. H. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44:291-303.
- Kamiloglu, S.; Pasli, A. A.; Ozcelik, B.; Capanoglu, E. (2014). Evaluating the *in vitro* bioaccessibility of phenolics and antioxidant activity during consumption of dried fruits with nuts. *LWT- Food Science and Technology*, 56(2):284-289.
- Kamiloglu, S.; Pasli, A.A.; Ozcelik, B.; Van Camp, J.; Capanoglu, E. (2015). Influence of different processing and storage conditions on *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. *Food Chem.* 186: 74–82.
- Karki (2011). Evaluation of fruit leathers made from New Zealand grown blueberries. Lincoln University Digital Thesis.
- Khan, R. S.; Winger, R.; Win, A. (2013). Functional food product development-Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends in Food Science & Technology*, 30:27-37.

- Khanizadeh, S.; Tsao, R.; Rekika, R.; Yang, R.; Charles, T.; Rupasinghe, V. (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:396- 401.
- Khalloufi, S.; El-Maslouhi, S.; Ratti, C. (2000). Mathematical model for prediction of glass transition temperature of fruit powders. *Food Engineering and Physical Properties*, 65(5):845-848.
- Kim, H. S.; Quon, M. J.; Kim, J. A. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol*, 2: 187-195.
- Kimpel, F.; Schmitt J. J. (2015). Review: Milk Proteins as Nanocarrier Systems for Hydrophobic Nutraceuticals. *Journal of Food Science*, 80 (11): 2361-2366.
- Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5):923-933.
- Koning, E. J. M. (1999). A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *Journal of AOAC International*, 82:119-127.
- Koutsos, A.; Tuohy, K. M.; Lovegrove, J. A. (2015). Apples and cardiovascular health-is the gut microbiota a core consideration? *Nutrients*, 7: 3959–3998.
- Kris-Etherton, P. N.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M. Binkoski, A. E. Hilper, K. F.; Griel, A. E. Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9b): 71-88.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 9(2):90-106.
- Kurt, A.; Bursa, K.; Toker, O. S. (2021). Gummy candies production with natural sugar source: Effect of molasses types and gelatin ratios. *Food Science and Technology International*, doi:10.1177/1082013221993566.

- Lawless, H. T.; Heymann, H. (2010). Introduction. Heldman, D. R. Ed. En: *Sensory Evaluation of food. Principles and practices* (2° ed., pp. 1-17). Springer.
- Lee, G.H.; Hsieh, F. G. (2008). Thin-layer drying kinetics of strawberry fruit leather, *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 51 (5): 1699-1705.
- Leiva Díaz, E.; Giannuzzi, L.; Giner, S. A. (2009). Apple pectic gel produced by dehydration. *Food and Bioprocess Technology*, 2 (2):194–207.
- Ley Nacional 25630 (2002). <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-25630-77088/texto>.
- Lewicki, P. P. (1997). The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. *International Journal of Food Science and Technology*, 32(6):553-557
- Li, G.; Magana, D.; Dyer, R. B. (2012). Photoinduced electron transfer in folic acid investigated by ultrafast infrared spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(10):3467–3475.
- Liao, Lauryn (2019). A sweet state of mind: The effects of high fructose corn syrup on the brain. *Horizons*: 4(1):1-6.
- Lisbona-Catalán, A.; Palma-Milla, S.; Parra-Ramírez, P.; Gómez-Candel, C. (2013). Obesidad y azúcar: aliados o enemigos. *Nutrición Hospitalaria*, 28(4):81-87.
- Li, Y. C.; Hu, T.C.; Chang, K.E. (2018). Identifying food-related word association and topic model processing using LDA. *Journal of Library and Information Studies*, 16:23-43.
- Liu, J.; He, Z.; Ma, N.; Chen, Z. Y. (2019). Beneficial effects of dietary polyphenols on high-fat diet-induced obesity linking with modulation of gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1):33-47.
- Liu, J.; Yao, Y.; Yu, B.; Mao, X.; Huang, Z.; Chen, D. (2012). Effect of folic acid supplementation on hepatic antioxidant function and mitochondrial-related gene expression in weanling intrauterine growth retarded piglets. *Livestock Science*, 146:123-132.

- Liu, Y.; Tikunov, Y.; Schouten, R. E.; Marcelis, L. F. M.; Visser, R. G. F.; Bovy, A. (2018). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: A review. *Frontiers in Chemistry*, 1-17.
- López-Yerena, A.; Guerra-Ramírez, D.; Vázquez-Sánchez, A.; González-López, J. (2017). Determinación del potencial nutracéutico de frutos de *Ardisia compressa* K. colectados en Xicotepec de Juárez, Puebla. *Revista de Sistemas Experimentales*, 4(10):49-56.
- Lumus-Mondaca, R.; Vega-Gálvez, A.; Zura-Bravo, L.; Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132:1121-1132.
- Lu, Q.; Zografí, G. (1997). Properties of citric acid at the glass transition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(12): 1373-1378.
- Lu, R.; Abbott J. A. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. Kilcast, D. (Eds.), *Texture in Food: Solids Food* (1 ed., vol. 2, pp.109-145). Woodhead Publishing Ltd.
- Malvern I. (2011). Inform White Paper. Dynamic Light Scattering Common Terms Defined (pp.1-6). Malvern Guides. www.malvern.com.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5): 727-747.
- Martínez-Blanco, A.; Almeraya-Quintero, S.; Guajardo-Hernandez, L. G.; Pérez-Hernandez, L. M.; Regalado-López, J. (2019). La utilidad de *Ardisia compressa kunth* en parcelas cafetaleras. *Agroproductividad*, 12(9):41-46.
- Martín-Gómez, J.; Varo, A.; Mérida, J.; Serratos, M. P. (2020). Influence of drying processes on anthocyanin profiles, total phenolic compounds and antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *LWT - Food Science and Technology*, 108931.
- Martínez, J.H.; Velázquez, F.; Burrieza, H.P.; Martínez, K.D.; Paula Domínguez Rubio, A.; dos Santos Ferreira, C.; Pérez, O.E. (2019). Betanin loaded nanocarriers based on quinoa seed 11S globulin. Impact on the protein structure and antioxidant activity, *Food Hydrocolloids* 87:880-890.

- Martínez, J.; Pilosof, A. M. R. (2018). On the relationship between pH-dependent β -lactoglobulin self assembly and gelation dynamics. *International Food Research Journal*, 25(2):676-683.
- Martínez, N.; Andrés A. M.; Chiralt A.; Fito P. (2000). *Temodinámica y Cinética de Sistemas Alimento Entorno* (2 ed.). Editorial UPV.
- Martirosyan, D. M.; Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease*, 5(6):209-223.
- Marzelly, A. G.; Lindriati, T.; Yuwanti, S. (2017). Karakteristik fisik, kimia, dan sensoris fruit leather pisang ambon (*Musa paradisiaca* s.) dengan penambahan gula dan karagenan. *Jurnal Agroteknologi*, 11:172-185
- Maskan, A.; Kaya, S.; Maskan, M. (2002). Hot air and sun drying of grape leather (pestil), *Journal of Food Engineering*, 54 (1):81–88.
- Maskan, A.; Kaya, S.; Maskan, M. (2002). Effect of concentration and drying processes on color change of grape juice and leather (pestil). *Journal of Food Engineering* 54:75-80
- Masson, M.; Delarue, J.; Bouilliot, S.; Sieffermann, J. M.; Blumenthal, D. (2016). Beyond sensory characteristics, how can we identify subjective dimensions? A comparison of six qualitative methods relative to a case study on coffee cups. *Food Quality and Preference* 47:156–165.
- Matías, R.; Ribeiro, P. R. S.; Sarraguça, M. C.; Lopes, J. A. (2014). A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. *Anal. Methods*, 6:3065-3071.
- Meilgaard, M.; Thomas Carr, B.; Vance Civille, G. (2006). Controls for test room, products and panel, Capítulo 3. En: *Sensory Evaluation Techniques*. (4ta ed.). CRC Press. Nueva York, Estados Unidos. ISBN 10: 0849338395.
- Merenkova, S. P.; Zinina, O. V.; Stuart, M.; Okuskhanova, E. K.; Androsova, N. V. (2020). Effects of dietary fiber on human health: A review. *Human. Sport. Medicine*, 20(1):106-113.

- Mesías, F. J.; Escribano, M. (2018). Projective techniques. Ares, G. y Varela, P. Eds. En: *Methods in Consumer Research: New Approaches to Classic Methods* (Vol. 1, pp. 79-102). Elsevier.
- MHLW. (1991). Food for specified health uses (FOSHU). <https://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>.
- Mihafu, F. D.; Issa, J. Y.; Kamiyango, M. W. (2019). Implication of sensory evaluation and quality assessment in food product development: A Review. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 8(3):690-702.
- Millone, M. V.; Olagnero, G. F.; Santana, E., C. (2011). Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. *Diaeta*, 29(134):7-15.
- Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6):1113–1124.
- Modupe, O.; Maurras, J.; Diosady, L. (2020). A spectrophotometric method for determining the amount of folic acid in fortified salt. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2:100060.
- Mohammed, A-L. Y.; Dyab, A.K. F.; Taha, F.; Abd-El-Mageed, A.I. A. (2021). Encapsulation of folic acid (vitamin B9) into sporopollenin microcapsules: Physico-chemical characterisation, *in vitro* controlled release and photoprotection study. *Materials Science & Engineering C*, 128:112271.
- Moreno, C. (2012). Un tema complejo: normativa y alimentos funcionales. *Alimentos Argentinos*, 55:61-63.
- Moskowitz, H. R.; Beckley, J. H.; Resurreccion, A. V. (2012). What types of tests do sensory researchers do to measure sensory response to the product? and ... why do they do them? Capítulo 9. En: *Sensory and Consumer Research in Food Product Design and Development*. 2da ed. Blackwell Publishing Ltd. & Institute of Food Technologists John Wiley & Sons. Iowa, Estados Unidos. ISBN: 978-11-199-4595.

- Moynihan, P. (2016). Sugars and dental caries: Evidence for setting a recommended threshold for intake. *Advances in Nutrition*, 7:149-56.
- Mrad, N. D.; Bonazzi, K.; Boudhrioua, N.; Kechaou, N.; Courtois, F. (2013). Moisture sorption isotherms, thermodynamic properties, and glass transition of pears and apples. *Drying Technology*, 31:1969-1978.
- Musacchi, S.; Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234:409-430.
- Musset, G. B.; Castells, M. L. (2017). Valorización del lactosuero. *Transferencia tecnológica-INTI*, 1-94.
- Nazir, M.; Arif, S.; Sanaullah-Khan, R.; Nazir, W.; Khalid, N.; Maqsood, S. (2019). Opportunities and challenges for functional and medicinal beverages: Current and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 88:513–526.
- Nichol, A.; Holle, M. J.; An, R. (2018). Glycemic impact of non-nutritive sweeteners: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1-9.
- Nishanthi, M.; Chandrapala, J.; Vasiljevic, T. (2017). Compositional and structural properties of whey proteins of sweet, acid and salty whey concentrates and their respective spray dried powders. *International Dairy Journal*, 74:49-56.
- Ochnio, M. E.; Martínez, J. H.; Allievi, M. C.; Palavecino, M.; Martínez, K. D.; Pérez, O. E. (2018). Proteins as nano-carriers for bioactive compounds. The case of 7S and 11S soy globulins and folic acid complexation. *Polymers*, 10(2):1–21.
- Olivares, A. B.; Bernal, M. J.; Ros, G.; Martínez, C.; Periago, M. J. (2004). Folatos y su disponibilidad en alimentos evaluados por cromatografía líquida (HPLC). validación y aplicaciones en calidad nutricional de alimentos. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 20:59-73.
- OMS (2018). Alimentación sana. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>.

- Palacios Sánchez, L. (2013). Breve historia de las vitaminas. *Rev. Medica Sanitas* 16 (3):42-145.
- Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5 (47):1-15.
- Pangallo, D.; Kraková, L.; Puškárová, A.; Šoltys, K.; Bučková, M.; Koreňová, J.; ... Kuchta, T. (2019). Transcription activity of lactic acid bacterial proteolysis-related genes during cheese maturation. *Food Microbiology*, 82, 416–425.
- Partearroyo, T.; Gonza, M.; Ortega, R.M.; Serra-Majem, L.; Varela-Moreiras, G. (2017). Dietary sources and intakes of folates and vitamin B12 in the Spanish population : Findings from the ANIBES study. *PLoS One*, 12:1-19.
- Pastoriza, S.; Delgado-Andrade, C.; Haro, A.; Rufián-Henares, J. A. (2011). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry*, 129:1926-1932.
- Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 53:5036–5040.
- Pérez J. C. J. (2016). Breve historia de la hematología I: las anemias. Pére, J.; Almaguer D. eds. En: *Hematología. La sangre y sus enfermedades* (2ed. Pp.5-12). McGraw Hill.
- Pérez, O. E.; David-Birman, T.; Kesselman, E.; Levi-Tal, S.; Lesmes, U. (2014). Milk protein-vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on *in vitro* gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocoll*, 38:40–7.
- Perry, J. R.; Ying, W. (2016). A review of physiological effects of soluble and insoluble dietary fibers. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 06:476.
- Phimpharian, C.; Jangchud, A.; Jangchud, K.; Therdthai, N.; Prinyawiwatkul, W.; No, K. (2011). Physicochemical characteristics and sensory optimisation of pineapple leather snack as affected by glucose syrup and pectin concentrations. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (5):972-981.

- Picouet, P.A.; Landl, A.; Abadias, M.; Castellari, M.; Viñas, I. (2009). Minimal processing of a Granny Smith apple purée by microwave heating. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10:545-550.
- Pita Martín de Portela, M. L. (2006). *Energía y macronutrientes en la nutrición del siglo XXI*. La prensa médica Argentina.
- Pita Martín de Portela, M. L. (1995). Energía y macronutrientes en la nutrición del siglo XXI. Energía (41-129). La prensa médica Argentina, Buenos Aires.
- Plaza-Díaz, J.; Martínez, O.; Gil Hernández, A. A. (2013). Los alimentos como fuente de mono y disacáridos: aspectos bioquímicos y metabólicos. *Nutrición Hospitalaria*, 28(4):5-16.
- Poe M. (1977). Acidic dissociation constants acid, and methotrexate of folk acid, dihydrofolic. *J Biol Chem*, 252(11):3724–3729.
- Poljšak, B.; Fink, F. (2014). The protective role of antioxidants in the defense against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-23.
- Pratt, M.; Lightowler, H.; Henry, C.J.; Thabuis, C.; Wils, D.; Guérin-Deremaus, L. (2011). No observable differences in glycemic response to maltitol in human subjects from 3 ethnically diverse groups. *Nutrition Research*, 31:223-228.
- Pushpa, G.; Rajkumar, P.; Gariepy, Y.; Raghavan, G. S. V. (2006). Microwave drying of enriched mango fruit leather. *The Canadian Society for Bioengineering*. Paper N° 6-208: 1-11.
- Quintero-Ruiz, N.; Demarchi, S. M.; Massolo, F. J.; Rodoni, L. M.; Giner, S. A. (2012). Evaluation of quality during storage of apple leather. *LWT - Food Science and Technology*, 47:485-492.
- Quinteros-Ruiz, N. A.; Demarchi S.; Giner, S. (2014). Effect of hot air, vacuum, and infrared drying methods on quality of rose hip (*Rosa rubiginosa*) leathers. *International Journal of Food Science and Technology*, 49:1799-1804.
- Raab, C.; Oehler, N. (1986). Making dried fruit leather, Fact Sheet 232, *Oregon State University Extension Service*, 1-2. <http://hdl.handle.net/1957/19428>

- Raouf, L. A. M.; Hammud, K.; Mohammed, J.; Mohammed, E. (2014). Qualitative and Quantitative Determination of Folic acid in Tablets by FTIR Spectroscopy. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3(3):773–780.
- Ramírez-Navas, J. S. (2012). Análisis sensorial: pruebas orientadas al consumidor. *Revista ReCiTeIa -Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 12(1): 85-97.
- Reyes, L. (2007). La teoría de acción razonada: implicaciones para el estudio de las actitudes. *Investigación educativa*, 7:66-77.
- Rivero, R.; Archaina, D.; Sosa, N.; Schebor, C., (2021). Development and characterization of two gelatin candies with alternative sweeteners and fruit bioactive compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 141: 110894.
- Rocha-Parra, D. F.; Lanari, M. C.; Zamora, M. C.; Chirife, J. (2016). Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT - Food Science and Technology*, 70:162-170.
- Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Lerma-García, M.J.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J.M. (2017). Protection of folic acid through encapsulation in mesoporous silica particles included in fruit juices. *Food Chem.* 218:471-478.
- Samuel, P.; Ayoob, K. T.; Magnuson, B. A.; Wölwer-Rieck, U.; Bendix-Jeppesen, Roger, P. J.; Rowland, I.; Mathews, R. (2018). Stevia leaf to stevia sweetener: exploring its science, benefits, and future potential. *The Journal of Nutrition*, 148(7):1-20.
- Santos, D. I.; Saraiva, J. M. A.; Vicente, A. A.; Moldão-Martins, M. (2020). Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. Barba F., Saraiva, J. M., Cravotto, G., Lorenzo, J. *Innovative Thermal and Nonthermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (pp. 23-54). Woodhead Publishing Ltd.
- Saxena, S.; Verma, J.; Gautam, S. (2016). Potential Prophylactic Properties of Apple and Characterization of potent bioactive from cv. “Granny Smith” displaying strong antimutagenicity in models including human lymphoblast TK6^{+/-} cell line. *Journal of Food Science*, 81(2): 508-518.

- Savijoki, K.; Ingmer, H.; Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394–406.
- Schmidt, H. H.; Stocker, R.; Vollbracht, C.; Paulsen, G.; Riley, D.; Daiber, A.; Cuadrado, A. (2015). Antioxidants in translational medicine. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23 (14):1130-1152.
- Scholl, T.; Johnson, W. (2000). Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr*, 71:1295-303
- Secretaría de Agroindustria-MAGyP, (2014). Ficha técnica N° 24: Edulcorantes. *Alimentos Argentinos*, 2-4.
- Serafini, M.; Stanzione, A.; Foddai, S. (2012). Functional foods: traditional use and European legislation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(1):7–9.
- Šeremet, D.; Mandura, A.; Vojvodić, A.; Martinić, A.; Galić, K.; Komes, D. (2020). Challenges in confectionery industry: Development and storage stability of innovative white tea-based candies. *Journal of Food Science*, 85(7): 2060-2068.
- Shahidi, F.; Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal Food Bioactives*, 4:11–68.
- Shimizu, T. (2003). Health claims on functional foods: The Japanese regulations and an international comparison. *Nutrition Research Reviews*, 16: 241-252.
- Siebert, M.; Günter-Berger, R.; Pfeiffer, F. (2019). Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a p-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99:6644–6648.
- Silva de Paula, N.; Gomes-Natal, D. N.; Ferreira, H. A.; de Souza Dantas, M. I.; Rocha Ribeiro, S. M.; Duarte Martino, H. (2013). Characterization of cereal bars enriched with dietary fiber and omega 3. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(3):269-273.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.

- Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Mlcek, J.; Jurikova, T.; Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:24673-24706.
- Slavin, J.L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition*, 21:411-418.
- Sobana, A.S.; Anna Anandh, M.; Rajagunalan, S. (2021). Development and standardization of dietetic kulfi with guava pulp and palm sugar candy and its quality evaluation. *The Pharma Innovation Journal*, 10(6):169-173.
- Sociedad Argentina de Pediatría (2008). Ley de fortificación de las harinas. *Sociedad Argentina de Pediatría*, 1-4.
- Song, Q. H.; Hwang, K. C. (2007). Direct observation for photophysical and photochemical processes of folic acid in DMSO solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 185:51–56.
- Staniszewska, I.; Dzadz, L.; Xiao, H.; Zielinska, M. (2020). Evaluation of storage stability of dried cranberry powders based on the moisture sorption isotherms and glass transition temperatures. *Drying Technology*, 1-9.
- Stavrou, I. J.; Cristou, A.; Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2018). Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food Chemistry*, 1-59.
- Štěpánek, P. (1993). Static and dynamic properties of multiple light scattering. *The Journal of Chemical Physics*, 99: 6384-6393.
- Suarez de Ronderos, M. P. (2003). Ácido fólico: Nutriente redescubierto. *Acta méd. Costarricense*, 45 (1):1-4.
- Sudha, M. L.; Baskaran, V.; Leelavathi, K. (2007). Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*, 104(2), 686–692.
- Suna, S. (2019). Effects of hot air, microwave and vacuum drying on drying characteristics and *in vitro* bioaccessibility of medlar fruit leather (pestil). *Food Sci Biotechnol*, 1-10.

- Sun-Waterhouse, D. (2011). The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 46:899-920.
- Švarca, P. L.; García-Moreno, P. J.; Mendes, A. M.; Fallahasghari, E. Z. (2020). Encapsulation of L-5-methyltetrahydrofolate by electrospraying for food applications. *Journal of Food Engineering*, 277:109901.
- Syamaladevi, R. M.; Sablani, S. S.; Tang, J.; Powers, J.; Swanson, B. G. (2009). State diagram and water adsorption isotherm of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Food Engineering*, 91(3):460-467.
- Tahmassebi, J. F.; BaniHani, A. (2020). Impact of soft drinks to health and economy: a critical review. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 21:109–117
- Tamime A. Y. (2013). Whey processing. Tamime, A. Ed. En: *Membrane Processing: Dairy and Beverages Applications* (pp. 203-225). John Wiley & Sons.
- Tavares, G.; Croguennec, T.; Hamon, P.; Carvalho, A. F.; Bouhallab, S. (2015). Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 48:238-247
- Telis, V. R. N.; Sobral, P. J. A. (2001). Glass transitions and state diagram for freeze-dried pineapple. *LWT- Food Science and Technology*, 34(4):199-205.
- Te Morenga, L.; Mallard, S.; Mann, J. (2013). Dietary sugars and body weight: Systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *British Journal of Sports Medicine*, 346:1-25.
- Tena, N.; Martín, J.; Asuero, A. G. (2020). State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. *Antioxidants*, 9(5):451.
- Teng, H.; Fang, T.; Lin, Q.; Song, Q.; Liu, B.; Chen, B. (2017). Red raspberry and its anthocyanins: bioactivity beyond antioxidant capacity. *Trends in Food Science & Technology*, 66:153-165.

- Thi, N. B. D.; Lin, C. Y.; Kumar, G. (2016). Waste-to-wealth for valorization of food waste to hydrogen and methane towards creating a sustainable ideal source of bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, 122:29-41.
- Thomas, A. H. (2001). Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. Tesis Doctoral de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2215>
- Thompson, T. (2000). Folate, iron, and dietary fiber contents on the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 100:1389-1396.
- Timmermann, E. (2003). Multilayer sorption parameters: BET or GAB values? *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 220:235-260.
- Tollin, K.; Erz, A.; Vej, J. (2017). The strategic viewpoints of innovation and marketing teams on the development of novel functional food. D. Bagchi, S. Nair (Eds.), En: *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products* (pp. 63-83), Academic Press, Cambridge.
- Tontul, I.; Topuz, A. (2018). Production of pomegranate fruit leather (pestil) using different hydrocolloid mixtures: An optimization study by mixture design. *Journal of Food Process Engineering*, 41(3):1-12.
- Torres C.; Romero, L. A.; Diaz, R. I. (2015). Quality and sensory attributes of apple and quince leathers made without preservatives and with enhanced antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 62:996-1003.
- Tsai P.; McIntosh, J.; Pearce, P.; Camden, B.; Jordan, B. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*, 35: 351-356.
- Tsao, R.; Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018:29-40.

- Tungmunnithum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 18: 5(3):1-16.
- Tu, S. H.; Chen, L. C.; Ho, Y. S. (2017). An apple a day to prevent cancer formation: Reducing cancer risk with flavonoids. *Journal of Food and Drug Analysis*, 34:29-40.
- Tuszynska, M. (2012). Folic acid the occurrence and the role in human nutrition. *Research Institute of Horticulture*, 76:43-54.
- Tyagi, A.; Penzkofer, A. (2010). Fluorescence spectroscopic behaviour of folic acid. *Chemical Physics*, 367:83–92.
- Uhrínová, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrín, D., Sawyer, L. and Barlow, P. N. 2000. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, 39:3565-3574.
- Valenzuela, C. y Aguilera, J. M. (2013). Aerated Apple Leathers: Effect of Microstructure on Drying and Mechanical Properties. *Drying Technology*, 31(16):1951-1959.
- Valenzuela, C.; Aguilera, J. M. (2015). Effects of different factors on stickiness of apple leathers. *Journal of Food Engineering*, 149:51-60.
- Valenzuela, C.; Aguilera, J. M. (2015). Effects of maltodextrin on hygroscopicity and crispness of apple leathers. *Journal of Food Engineering*, 144:1-9.
- Van Hul, M.; Cani, P. D. (2019). Targeting carbohydrates and polyphenols for a healthy microbiome and healthy weight. *Current nutrition reports*, 8(4):307-316.
- Vatthanakul, S.; Jangchud, A.; Jangchud, K.; Therdthai, N.; Wilkinson, B. (2010). Gold kiwifruit leather product development using Quality function deployment approach. *Food Quality and Preference*, 21: 339-345.
- Vásquez, C.; Díaz-Calderón, P.; Enrione, J.; Matiacevich, S. (2013). State diagram, sorption isotherm and color of blueberries as a function of water content. *Thermochimica Acta*, 570:8-15.

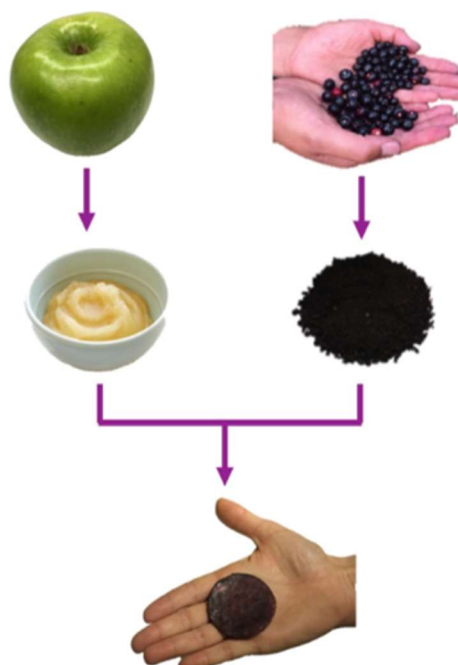
- Vázquez-Sánchez, A. Y.; Corfield, R.; Sosa, N.; Salvatori, D.; Schebor, C. (2021). Physicochemical, functional, and sensory characterization of apple leathers enriched with acáchul (*Ardisia compressa Kunth*) powder. *LWT - Food Science and Technology* 146: 111472.
- Vázquez-Sánchez, A. Y., Aguilar-Zárate, P.; Muñiz-Márquez, D. B.; Wong-Paz, J. E.; Rojas, R.; Ascacio-Valdés, J. A.; Martínez-Ávila, G. C. G. (2019). Effect of ultrasound treatment on the extraction of antioxidants from *Ardisia compressa* Kunth fruits and identification of phytochemicals by HPLC-ESI-MS. *Heliyon*, 5(12), E03058.
- Vidal, L.; Ares, G.; Giménez, A. (2013). Projective techniques to uncover consumer perception: Application of three methodologies to ready-to-eat salads. *Food Quality and Preference*, 28(1):1–7.
- Vinod, S.; Philip, J. (2017). Role of field-induced nanostructures, zippering and size polydispersity on effective thermal transport in magnetic fluids without significant viscosity enhancement. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 444:29-42.
- Vivek, K.; Subbarao, K. V.; Routray, W.; Kamini, N. R.; Dash, K. K. (2020). Application of fuzzy logic in sensory evaluation of food products: A comprehensive study. *Food and Bioprocess Technology*, 13: 1-29.
- Wadhwa, M.; Bakshi, S. P. M. (2013). Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. *RAP Publication-FAO*, 1-54.
- Wang, R.; Xu, P.; Chen, Z.; Zhou, X.; Whang, T. (2019). Complexation of rice proteins and whey protein isolates by structural interactions to prepare soluble protein composites. *LWT - Food Science and Technology*, 102:207-213.
- Wang, R.; Xu, P.; Chen, Z.; Zhou, X.; Whang, T. (2019). Complexation of rice proteins and whey protein isolates by structural interactions to prepare soluble protein composites. *LWT - Food Science and Technology*, 102:207-213.
- Watts, B. M.; Ylimaki, G. L.; Jeffert, L. E.; Elías, L. G. (1992). *Métodos básicos sensoriales para la evaluación de alimentos* (Vol. 1). Ottawa, Canadá: International Development Research Centre. ISBN: 0-88936-564-4.

- Wu, H.; Johnson, M. C.; Lu, C. H.; Fritsche, K. L.; Thomas, A. L.; Cai, Z.; Greenlief, C. M. (2015). Determination of anthocyanins and total polyphenols in a variety of elderberry juices by UPLC-MS/MS and other methods. *Acta Horticulturae*, 1061:43-52.
- Young, N.W.G; O'Sullivan, G. R. O. (2011). The influence of ingredients on product stability and shelf life. Eds. Kilcast, D.; Subramaniam, P. En: *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (pp. 132-183). Woodhead Publishing
- Younis, I. R.; Stamatakis, M. K.; Callery, P. S.; Meyer-stout, P. J. (2009). Influence of pH on the dissolution of folic acid supplements. *International Journal of Pharmaceutics*, 367:97-102.
- Zargaraan, A.; Kamaliroosta, L.; Yaghoubi, A. S.; Mirmoghtadaie, L. (2016). Effect of substitution of sugar by high fructose corn syrup on the physicochemical properties of bakery and dairy products: A review. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(4):3-11.
- Zhao, M.; Zhou, J.; Chen, Y.; , Yuan, L.; Yuan, M.; Zhang, X.; Hu, Y.; Yu, Y. (2018). Folic Acid Promotes Wound Healing in Diabetic Mice by Suppression of Oxidative Stress. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64 (1):26-33.
- Zhou, P.; Labuza, T. (2007). Effect of water content on glass transition and protein aggregation of whey protein powders during short-term storage. *Food Biophysics*, 2:108–116.
- Zorzi, M.; Gai, F.; Medana, C.; Aigotti, R.; Morello, S.; Peiretti P. G. (2020) Bioactive compounds and antioxidant capacity of small berries. *Foods*, 9(63):1-13.

Anexos

7. Anexos

Anexo 1: Encuesta emitida para el análisis sensorial cualitativo



Golosina elaborada a base de pulpa de manzana y polvo de acáchul (frutos rojos silvestres de origen mejicano con alto poder antioxidante) sin azúcares añadidos

1. ¿Qué opinás de este producto?

2. ¿Comprarías este producto?

Anexo 2: Encuesta utilizada para el análisis sensorial cuantitativo

Edad: _____

Género: _____

Fecha: _____

Usted ha recibido una muestra correspondiente a una golosina formulada con manzana y acáchul endulzada con estevia. Su tarea consiste en consumirla y evaluar el **nivel de intensidad** y **nivel de satisfacción** de cada atributo, y la **aceptabilidad global** del producto, marcando con una **X** donde considere apropiado.

Referencias

- **Nivel de intensidad de atributos:**

MB: muy bajo; **B:** bajo; **I:** ideal; **A:** alto; **MA:** muy alto

- **Nivel de satisfacción de atributos y aceptabilidad global:**

1: Me disgusta mucho; **2:** me disgusta; **3:** me disgusta levemente; **4:** no me gusta ni me disgusta; **5:** me gusta levemente; **6:** me gusta; **7:** me gusta mucho.

COLOR**Nivel de intensidad de atributos**

MB	B	I	A	MA

Nivel de satisfacción de atributos

1	2	3	4	5	6	7

AROMA**Nivel de intensidad de atributos**

MB	B	I	A	MA

Nivel de satisfacción de atributos

1	2	3	4	5	6	7

GUSTO DULCE**Nivel de intensidad de atributos**

MB	B	I	A	MA

Nivel de satisfacción de atributos

1	2	3	4	5	6	7

GUSTO ÁCIDO

Nivel de intensidad de atributos

MB	B	I	A	MA

Nivel de satisfacción de atributos

1	2	3	4	5	6	7

PEGAJOSIDAD

Nivel de intensidad de atributos

MB	B	I	A	MA

Nivel de satisfacción de atributos

1	2	3	4	5	6	7

Nivel de intensidad de atributos

MB	B	I	A	MA

Nivel de satisfacción de atributos

1	2	3	4	5	6	7

DUREZA

Prueba de aceptabilidad global

1	2	3	4	5	6	7

Comentarios: _____

¡¡Muchas gracias!!