



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Frutos de sauco (*Sambucus nigra* L.) para el desarrollo de productos con potencial bioactivo: extractos optimizados mediante tecnologías verdes para la formulación de ingredientes y su aplicación en la obtención de snacks frutales de bajas calorías

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

Lic. Milagros Lucía Gomez Mattson

Directora de tesis: Dra. Daniela Salvatori

Co-Directora: Dra. Carolina Schebor

Consejera de estudios: Dra. Andrea Nieto

Lugar de trabajo: PROBIEN (CONICET-Universidad Nacional del Comahue), Neuquén

Ciudad de Buenos Aires, 2022

Frutos de sauco (*Sambucus nigra* L.) para el desarrollo de productos con potencial bioactivo: extractos optimizados mediante tecnologías verdes para la formulación de ingredientes y su aplicación en la obtención de snacks frutales de bajas calorías

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue obtener ingredientes y alimentos con potencial bioactivo a partir de frutos de sauco (*Sambucus nigra* L.). Se optimizaron distintos procesos de extracción de compuestos bioactivos, como extracción asistida por enzimas (EAE) y por ultrasonidos (EAU) y se evaluaron distintos métodos de deshidratación para la estabilización de extractos óptimos (EO). Se analizaron las propiedades fisicoquímicas y bioactivas, con énfasis en la degradación de compuestos fenólicos antociánicos y no antociánicos, responsables del color y de la actividad antioxidante. Posteriormente se estudió la estabilidad del ingrediente en polvo de mejor performance y se analizó la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes. En una última etapa se desarrollaron snacks liofilizados de manzana previamente enriquecidos en compuestos de sauco incorporados mediante procesos de impregnación, evaluando sus propiedades físicas, estructurales y bioactivas. La extracción EAE resultó mucho más eficiente que la EAU, obteniéndose luego de la liofilización un ingrediente en polvo de color púrpura y concentrado en bioactivos, con una gran recuperación de la actividad antioxidante al cabo del proceso de digestión *in vitro* y del transporte trans-epitelial. El estudio de estabilidad mostró que envasado adecuadamente, el polvo puede ser expuesto a temperatura ambiente sin pérdida de color y de compuestos bioactivos. Los resultados evidenciaron el alto potencial del polvo obtenido como ingrediente funcional, colorante natural o nutracéutico. En cuanto a la aplicación propuesta del EO, se obtuvieron snacks frutales crujientes cuyo consumo implica un aporte mucho elevado de polifenoles a la dieta, superando con una sola porción (30 g) el consumo diario en países de mayor ingesta. El estudio de percepción del consumidor realizado mostró que el snack de mejores propiedades bioactivas y mecánicas podría ser considerado un posible prototipo a lanzar al mercado.

Palabras clave: extracto de sauco, polvo liofilizado, ingrediente antioxidante, snack de fruta enriquecido

Elderberry fruits (*Sambucus nigra* L.) for the development of products with bioactive potential: extracts optimized by green technologies for the formulation of ingredients and their application for low-calorie fruit snacks production

ABSTRACT

The present work aimed to develop ingredients and food products with bioactive potential from elderberry (*Sambucus nigra* L.) fruits. Different extraction processes for bioactive recovery were optimized, such as enzyme assisted extraction (EAE) and ultrasound assisted extraction (UAE), along with the evaluation of different drying methods used to stabilize the obtained optimum extracts (EO). Bioactive and physicochemical properties were analyzed, with emphasis on degradation of anthocyanin and non-anthocyanin phenolic compounds, responsible of color and antioxidant activity. Subsequently, the storage stability of the powdered ingredient with best performance was studied, along with the antioxidant compounds bioaccessibility. Finally, freeze-dried apple snacks previously enriched with elderberry polyphenols were obtained by applying impregnation technologies, studying physical, structural and bioactive properties.

EAE resulted in a more efficient process than UAE, generating after freeze-drying, a purple powdered ingredient with high polyphenol content and good recovery of antioxidant activity after *in vitro* digestion and through trans-epithelial transport. The stability study demonstrated that, in proper packaging, the freeze-dried powder could be exposed to room temperature preserving the color and bioactive content. The obtained results showed the high potential of the elderberry powder to be used as natural colorant, functional ingredient or nutraceuticals. Regarding the proposed EO application, crispy fruit-snacks were developed, whose consumption would imply a high polyphenol contribution to the diet, overcoming with a single serving (30 g) the daily consumption in countries with higher intake. Consumers' perception study showed that the snack with best bioactive and mechanical properties could be considered as a first prototype to be launched onto the market.

Key words: elderberry extract, freeze-dried powder, antioxidant ingredient, enriched fruit-snack

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras las Dras. Daniela Salvatori y Carolina Schebor, por su enseñanza durante estos años de investigación y durante la escritura de mi tesis, por su confianza, su constante guía y apoyo, y por la oportunidad de sumergirme en el mundo de la investigación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad de Buenos Aires y a la Universidad Nacional del Comahue por la beca otorgada y la oportunidad de continuar mi formación profesional en la investigación y docencia.

Al Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, CONICET-UNCO), al Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ, UBA-CONCIET), a los Departamentos de Química Orgánica y de Industrias de la Universidad de Buenos Aires, y a la Facultad de Ciencias y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional del Comahue, por disponer sus instalaciones para la ejecución de este trabajo.

A mis compañeros de grupo, Pau, Pancho, Agus y Lore, por las risas, los mates y comidas, por su amistad, cariño, consejos, compañía y apoyo diarios en estos años. A Maite, Rocío y Agus, por su compañía durante las estadías en Buenos Aires, los viajes a congresos, y por su apoyo, cariño y consejo constante en esta aventura que comenzamos juntas.

A los miembros de los grupos de Estudio de Materiales Adsorbentes (GEMA) y de Procesos Avanzados de Oxidación y Nanoadsorbentes (PAON) del PROBIEN, no sólo por disponer de sus laboratorios para finalizar esta tesis, sino también por las risas y compañía diarias. A Flor, Beti, Euge, Carmen, Cele, Vir y Flor, que junto con Pau me ayudaron, acompañaron e hicieron estos años de trabajo más divertidos.

A Leonardo y Marcela del Laboratorio de Cromatografía del Instituto PROBIEN, por su trabajo, asesoría y acompañamiento en los análisis realizados en esta tesis. Al Dr. Oscar Pérez, del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN, UBA-CONICET), y a la Dra. Guillermina Bongiovanni del Instituto PROBIEN, por poner a disposición sus laboratorios para realizar los ensayos con líneas celulares. A cada miembro de estos laboratorios que haya participado en estos ensayos.

A Lili y Miria por su apoyo durante los años de docencia, por su consejo y sostén cuando lo necesité.

A mis amigas de la vida, Piru, Guada, Flo, Flory, Nat, Lu, Vale, Desi, Male, Luci, Flor, Cari, Vale, Guadi, por acompañarme durante todos estos años de formación y crecimiento personal y profesional, por enseñarme todos los días que los sueños se cumplen y que compartirlos con ellas hace la vida más linda. A Juan, mi amigo incondicional, por estar siempre. A Cami, Pieri, Ju, Abi, Romi, Almi y Ceci, que con su magia, locura y amistad me hicieron sentir que estaba en casa. A cada compañera y compañero de handball y fútbol, por la amistad y compañía.

A mis abuelos y abuelas, tíos, tías, primos y primas, por los almuerzos los domingos, por las fiestas, paseos, sus mimos y amor incondicional.

A mis hermanos, Guadi, Maqui y Santi, por ser mis cómplices, sostén y compañeros de aventuras desde siempre, por su amor infinito. A mis padres, que me permitieron liberar mi curiosidad por el mundo, por ayudarme siempre a cumplir mis sueños, por su consejo y amor. A mis sobrinos, Feli y Juli, y a “la Chiru”, que alegran mi vida todos los días.

A todas las personas que han aportado su granito de arena en todos estos años, ¡Gracias!

**“Las preguntas son inicios
si no hay preguntas
nada comienza...”**

Maru Leone

A mis padres y hermanos.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Materia prima.....	1
1.1.1. Frutas finas: características generales, producción y cultivo.....	1
<i>Producción y cultivo en Argentina.....</i>	<i>2</i>
1.1.2. Sauco: características generales.....	3
1.1.2.1. Composición química y actividad antioxidante.....	3
<i>Macro y micronutrientes.....</i>	<i>3</i>
<i>Compuestos fenólicos.....</i>	<i>5</i>
<i>Características y estabilidad de compuestos antociánicos.....</i>	<i>7</i>
<i>Capacidad antioxidante.....</i>	<i>10</i>
1.1.2.2. Actividad biológica y toxicidad.....	11
1.1.2.3. Producción, disponibilidad y usos en Argentina.....	12
1.2. Métodos de extracción de compuestos bioactivos.....	13
<i>Tecnologías verdes para la extracción de polifenoles.....</i>	<i>14</i>
1.3. Métodos de estabilización y preservación de extractos/jugos con actividad antioxidante.....	17
<i>Secado por atomización.....</i>	<i>19</i>
<i>Secado por liofilización.....</i>	<i>21</i>
1.4. Alimentos e ingredientes funcionales.....	23
1.4.1. Uso de frutas finas como ingredientes en alimentos.....	23
1.4.2. Potencial de procesos de “Impregnación de matrices húmedas” para el desarrollo de alimentos funcionales.....	25
1.5. Estabilidad de productos deshidratados.....	28
1.6. Bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes.....	30
1.7. Desarrollo de productos basado en la percepción del consumidor.....	31
2. Objetivos.....	34
2.1. Objetivo general.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1. Materiales.....	36
3.1.1. Materia prima.....	36
3.1.2. Aditivos y reactivos.....	36

3.2. Obtención de ingredientes ricos en compuestos bioactivos.....	37
3.2.1. Métodos de extracción de compuestos bioactivos.....	37
3.2.1.1. Extracción asistida por ultrasonido.....	37
3.2.1.1.1. Equipamiento y metodología de extracción.....	37
3.2.1.1.2. Diseño y optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido.....	37
3.2.1.2. Extracción enzimática.....	39
3.2.1.2.1. Metodología de extracción.....	39
3.2.1.2.2. Diseño y optimización del proceso de extracción enzimática.....	40
3.2.2. Estudio de citotoxicidad del extracto óptimo.....	41
<i>Cultivo celular</i>	41
<i>Bioensayos con el modelo in vitro</i>	41
3.2.3. Métodos de estabilización del extracto óptimo	41
3.2.3.1. Secado por atomización.....	42
3.2.3.2. Secado por liofilización.....	42
3.3. Estudio de estabilidad del ingrediente en polvo seleccionado.....	42
3.4. Desarrollo de un producto tipo snack de fruta potencialmente funcional empleando un ingrediente de sauco.....	43
3.4.1. Proceso de impregnación de matrices húmedas para la incorporación de compuestos bioactivos.....	43
<i>Pretratamiento de escaldado y proceso de impregnación</i>	44
3.4.2. Obtención de snacks por liofilización.....	46
3.5. Análisis fisicoquímico y potencial bioactivo de materia prima, extractos, ingredientes en polvo y snacks de fruta.....	46
3.5.1. Contenido de agua.....	46
3.5.2. Actividad acuosa y sólidos solubles.....	47
3.5.3. pH y acidez total.....	47
3.5.4. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC-DAD/RAD.....	47
<i>Preparación de extractos</i>	47
<i>Análisis cromatográfico</i>	48
3.5.5. Temperatura de transición vítrea (T_g) e isoterma de sorción de agua.....	48
3.5.6. Solubilidad.....	49
3.5.7. Color superficial.....	49
3.5.8. Análisis de compuestos bioactivos.....	50
3.5.8.1. Obtención de extractos.....	50

A. Fruta, UO, EO, J y polvos de sauco.....	50
B. Snacks de manzana impregnados.....	50
3.5.8.2. Contenido de antocianinas monoméricas totales (ACY)	51
3.5.8.3. Color polimérico (CP).....	51
3.5.8.4. Contenido de polifenoles totales.....	52
A. Determinación de compuestos fenólicos totales (CPT).....	52
B. Polifenoles asociados a la pared celular del fruto (PPC).....	53
3.5.8.5. Compuestos fenólicos individuales por HPLC-DAD.....	53
Purificación de extractos metanólicos.....	53
Identificación y cuantificación.....	53
3.5.8.6. Actividad antioxidante (AA)	55
Decoloración del radical ABTS ^{•+}	55
Poder reductos del Fe ²⁺ (FRAP).....	56
3.5.9. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	56
3.5.10. Estudio de digestión <i>in vitro</i> y bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes.....	56
3.5.10.1. Simulación del tracto gastrointestinal (TGI) <i>in vitro</i>	56
3.5.10.2. Actividad antioxidante luego del transporte epitelial.....	58
3.5.11. Análisis microestructural.....	59
Microscopía Óptica (MO).....	59
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	59
3.5.12. Determinación de propiedades mecánicas.....	60
3.5.13. Análisis de percepción del consumidor.....	61
3.6. Análisis estadístico.....	63
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 65
4.1 Caracterización de frutos de sauco.....	65
4.1.1. Propiedades fisicoquímicas del fruto.....	65
4.1.2. Compuestos bioactivos.....	66
Caracterización espectrofotométrica.....	67
Caracterización por análisis cromatográfico y espectroscopía ATR-FTIR.....	69
4.2. Procesos de extracción y estabilización de compuestos bioactivos de sauco.....	73
4.2.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	74
4.2.1.1. Optimización del proceso de extracción.....	74
Obtención del extracto óptimo (UO).....	74

<i>Caracterización del extracto UO</i>	77
4.2.2. Comparación de distintas tecnologías verdes de extracción en frutos de sauco.....	79
4.2.3. Estabilización del extracto óptimo UO mediante secado por atomización y liofilización.....	80
<i>Propiedades físicas de los polvos UO</i>	80
<i>Evaluación del contenido de compuestos bioactivos en polvos PL y PS</i>	83
4.2.4. Consideraciones sobre extracción EAU y estabilización de extractos líquidos mediante distintos métodos de deshidratación.....	85
4.2.5. Extracción asistida por enzimas (EAE).....	86
4.2.5.1. Optimización del proceso de extracción.....	86
<i>Obtención del extracto óptimo (EO)</i>	86
<i>Caracterización del extracto EO</i>	89
<i>Evaluación de la toxicidad del extracto EO</i>	90
4.2.6. Optimización del proceso de liofilización.....	91
4.2.7. Caracterización del ingrediente óptimo.....	92
<i>Propiedades físicas</i>	92
<i>Contenido de compuestos bioactivos</i>	94
4.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> y bioaccesibilidad del ingrediente liofilizado a partir de EO.....	99
4.4. Estabilidad durante el almacenamiento del ingrediente de sauco liofilizado.....	100
<i>Estabilidad del color</i>	101
<i>Estabilidad de compuestos bioactivos</i>	103
4.5. Aplicación del extracto de sauco EO: desarrollo de un snack frutal de funcionalidad enriquecida.....	106
4.5.1. Estudio del proceso de impregnación de rodajas de manzana con extracto de sauco.....	106
4.5.2. Desarrollo de snacks liofilizados de manzana impregnada.....	109
4.5.2.1. Evaluación de propiedades bioactivas.....	109
<i>Caracterización espectrofotométrica</i>	109
<i>Caracterización cromatográfica</i>	111
4.5.2.2. Propiedades físicas de los snacks relacionadas con la estabilidad.....	117
<i>Humedad, actividad de agua, propiedades de sorción de agua y temperatura de transición vítrea</i>	117
<i>Evaluación de las propiedades mecánicas de los snacks</i>	120
<i>Análisis de la ultraestructura de los snacks mediante MEB</i>	126
<i>Color superficial</i>	131

4.5.2.3. Percepción del consumidor.....	133
5. CONCLUSIONES.....	138
6. BIBLIOGRAFÍA.....	143
6.4. Bibliografía citada.....	143
6.5. Bibliografía generada durante el desarrollo de este trabajo.....	164

NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AA	Actividad antioxidante
ABTS ^{•+}	Radical [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico)]
ACN	Acetonitrilo
ACY	Antocianinas monoméricas totales
ATCC	Colección americana de cultivos celulares
ATR	Reflectancia total atenuada
a _w	Actividad de agua
b.h.	Base húmeda
b.s.	Base seca
C _E	Concentración de enzima
CP	Color polimérico
CPT	Contenido de polifenoles totales
D	Función de deseabilidad o Derringer
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E	Pretratamiento de escaldado
EAE	Extracción asistida por enzimas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
E _d	Módulo de deformabilidad
EO	Extracto óptimo obtenido con extracción asistida por enzimas
FDG	Fluido digestivo gástrico
FDI	Fluido digestivo intestinal
FDO	Fluido digestivo oral
FF	Fruta fresca
F _{máx}	Fuerza máxima
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
HEPES	Buffer N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HR	Humedad relativa
IV	Impregnación a vacío tradicional

IVA	Impregnación combinada vacío-presión atmosférica
J	Jugo de sauco control
MC	Rodaja de manzana control
MC-E	Rodaja de manzana control, escaldada
MD	Maltodextrina
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MIV	Rodaja de manzana impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 10 min presión atmosférica)
MIV-E	Rodaja de manzana escaldada, impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 10 min presión atmosférica)
MIVA	Rodaja de manzana impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 6 h presión atmosférica)
MIVA-E	Rodaja de manzana escaldada, impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 6 h presión atmosférica)
MO	Microscopio óptico
RA	Rendimiento en antocianinas
RE	Rendimiento de extracción
RP	Rendimiento en polifenoles
SC	Snacks de manzana control
SC-E	Snacks de manzana control, escaldada
SIV	Snack de manzana impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 10 min presión atmosférica)
SIV-E	Snack de manzana escaldada, impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 10 min presión atmosférica)
SIVA	Snack de manzana impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 6 h presión atmosférica)
SIVA-E	Snack de manzana escaldada, impregnada con extracto de sauco (10 min vacío + 6 h presión atmosférica)
SPE	Extracción en fase sólida
t ₁	Periodo de tiempo a vacío
t ₂	Periodo de tiempo a presión atmosférica
T	Temperatura
TEER	Resistencia eléctrica transepitelial
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
U5	Extracto de sauco con 5 min de ultrasonido

U10	Extracto de sauco con 10 min de ultrasonido
UC	Extracto de sauco control (sin aplicación de ultrasonido)
UO	Extracto óptimo obtenido con extracción asistida por ultrasonido
W	Trabajo de fractura

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Materia prima

1.1.1. Frutas finas: características generales, producción y cultivo

Las frutas finas, también conocidas como frutos rojos, constituyen un grupo de pequeños frutos con características productivas diferentes. Pueden dividirse en tres grupos de cultivos de acuerdo a su expresión vegetativa, que además reúnen distintos géneros y especies: cherries (frutales de carozo), berries herbáceos y berries arbustivos. Dentro del primer grupo encontramos especies del género *Prunus*, específicamente la cereza (*Prunus avium*) y la guinda (*Prunus cerasus*). Éstos son cultivos perennes, con mayor rendimiento de cultivo. Como berries herbáceos encontramos la frutilla (*Fragaria ananassa* e híbridos), que ya es considerada un cultivo hortícola y es la fruta fina más difundida en nuestro país (Caminiti, 2005). Finalmente, dentro de los arbustivos, encontramos la frambuesa (*Rubus idaeus*), el arándano (*Vaccinium corymbosum*), la zarzamora (*Rubus fruticosus* e híbridos del género *Rubus*), la grosella espinosa o uva espina (*Ribes grosularia*), la grosella negra o cassis (*Ribes nigrum*), la grosella roja o corinto (*Ribes rubrum*) y el sauco (*Sambucus nigra*). Éstas también son perennes y se caracterizan por su sabor ácido y mayor perecibilidad.

Las frutas finas han adquirido gran relevancia a nivel comercial debido a sus propiedades nutricionales y nutraceuticas, conferidas por la presencia de compuestos fenólicos principalmente flavonoides, que le aportan una elevada capacidad antioxidante y efectos benéficos para la salud. Se han informado evidencias que muestran que el consumo regular de frutas finas como las berries podría reducir el riesgo de desarrollo y/o progresión de varias enfermedades crónicas, incluyendo las cardiovasculares, las degenerativas, diabetes tipo 2 y ciertas formas de cáncer, entre otras (Seeram, 2008; Basu y col., 2010; Guerrero y col., 2010; Jimenez-Garcia y col., 2013; El-Mostafa y col., 2014; Nile y Park, 2014; Yang y Kortessniemi, 2015; Arnold, 2016; Vega-Galvez y col., 2020; Pap y col., 2021). Esta es la razón por la cual la demanda ha crecido notablemente durante la última década, sobre todo en países desarrollados del hemisferio norte. En este marco, nuestro país juega un papel muy importante en la producción contra estacionalidad del hemisferio norte, y se posiciona en la exportación de berries a estos países, así como también en el abastecimiento de la demanda local, que comienza a crecer con la necesidad de productos más saludables. Sin embargo, el consumo interno sigue siendo mayoritariamente de frutillas, arándanos, frambuesas y zarzamoras, las cuatro berries más populares en nuestro país.

Por otro lado, muy poca atención se ha prestado en nuestro país a los berries comestibles silvestres. Estos son frutos de color rojo, violáceo o morado que crecen en las zonas cordilleranas del sur de Chile y

Argentina. El interés por su estudio obedece a una tendencia mundial de búsqueda de frutas y nuevas materias primas con altos contenidos de compuestos antioxidantes.

Producción y cultivo en Argentina

Actualmente, Argentina se aboca en mayor medida al cultivo de cerezas (2300 hectáreas en las provincias de Mendoza, Río Negro, Neuquén, Chubut, Santa Cruz y Buenos Aires) y frutillas (1000-1150 hectáreas en las provincias de Tucumán, Santa Fe, Corrientes, Buenos Aires, Mendoza y provincias del sur del país), luego siguen el arándano (mayor cultivo en Entre Ríos) y la frambuesa (principal producción en la Comarca Andina). En menor medida se cultivan otros frutos pequeños como zarzamoras, grosellas rojas, blancas y negras. La demanda local de estos frutos está representada principalmente por la venta de frutas congeladas (90%), que es distribuida entre supermercados, el sector gastronómico (utiliza tanto fruta congelada como fresca) y la industria de alimentos, canal principal de comercialización de berries congelados para transformarlos en dulces, mermeladas, jaleas, conservas, entre otros productos (Bruzzone, 2007).

La superficie cultivada de berries arbustivos en Argentina se concentra principalmente en territorio patagónico (70 % de la superficie cultivada), abarcando las siguientes zonas: Comarca Andina del Paralelo 42° (El Bolsón, El Hoyo, Epuén y Lago Puelo), valle inferior del Río Chubut, alto valle de Río Negro y Neuquén, localidades específicas de la provincia de Neuquén (Plottier, Senillosa y San Martín de los Andes) y Los Antiguos en Santa Cruz.

Entre los berries patagónicos, los frutos silvestres tanto nativos como exóticos, presentan poca relevancia económica a nivel nacional debido a la escasa investigación y difusión en relación a su cultivo y producción, la baja demanda en el mercado y el bajo grado de comercialización (Ochoa y col., 2019). Entre estos, podemos nombrar como especies nativas al maqui (*Aristotelia chilensis*), el calafate (*Berberis mycophylla*) y la murta (*Ugni molinae*), y como exóticas, la murra (*Rubus ulmifolius* v. Schott) y el sauco (*Sambucus nigra* L.). Las condiciones climáticas propias del sur del país, son las responsables de la generación de frutos con alto contenido de compuestos bioactivos, ya que los polifenoles (en particular los flavonoides) son producidos como metabolitos secundarios en respuesta a distintos factores de estrés (Fredes, 2009). Si bien algunas de estas berries ya se comercializan en el país, la falta de información sobre cultivo y producción sostenidos convierte a estas especies en una potencial oportunidad de mejorar y movilizar la economía regional, y aumentar la oferta de frutas finas y de nuevos productos ricos en antioxidantes.

1.1.2. Sauco: características generales

El sauco (“elder o elderberry” en inglés) es una planta correspondiente a la familia *Caprifoliaceae*, del género *Sambucus*. Dentro de las 18 especies actualmente identificadas, las más cultivadas y estudiadas a nivel internacional son: *Sambucus nigra* spp. *canadensis*, nativa del este de Estados Unidos, con frutos negro-azulados, y *Sambucus nigra* L., nativa de Europa y el oeste asiático, con frutos negro-rojizos (Rodrigues y col., 2018). Esta última crece de manera silvestre en nuestro país, al ser introducida por los españoles durante la colonización del Nuevo Mundo (Font Quer, 2016).

La planta de sauco se caracteriza por crecer en forma de arbusto o árbol pequeño entre 4-10 metros de altura, presentando una corteza grisácea con amplias fisuras que permiten vislumbrar la superficie interior blanca. Sus hojas son caducas, pinadas, con 5-7 folíolos dentados y ovalados, mientras que las flores son pequeñas y aromáticas, de color blanco, y se reúnen en corimbos de grandes cimas (**Figura 1.1**). Los frutos son bayas redondas, de 3-8 mm de diámetro, que crecen en forma de clúster. Al alcanzar la madurez toman una coloración oscura casi negra, con tonos rojizos, azulados o púrpuras, dependiendo de la especie (Alonso, 1998).

1.1.2.1. Composición química y actividad antioxidante de frutos de sauco

La composición química de las plantas y los frutos depende de varios factores: aquellos intrínsecos, como la variedad y el metabolismo propio de la planta, y otros extrínsecos, particularmente edafoclimáticos (niveles de radiación y viento recibidos, temperatura, disponibilidad de agua, composición del suelo, entre otros).

Macro y micronutrientes

El sauco no es sólo reconocido por sus frutos comestibles, también sus flores, hojas y en algunos casos la corteza, son estudiados para uso medicinal. Ferreira y col. (2020) realizaron un trabajo de revisión entre las numerosas publicaciones sobre la composición química de frutos y flores de sauco, indicando que los primeros contienen agua como componente mayoritario (71-78%), y presentan una variedad de minerales, entre los que se destacan potasio, fósforo, calcio y magnesio. Las flores contienen un perfil de minerales más acotado, y, en oposición a los frutos, el contenido de calcio es mayor que el de magnesio. Tanto las flores como los frutos son ricos en vitamina C, en particular los frutos contienen entre 6,11 a 116,7 mg ácido ascórbico/100g fruta fresca, un contenido de fibra < 2% (como pectinas y celulosa) y un contenido < 1% de aminoácidos.

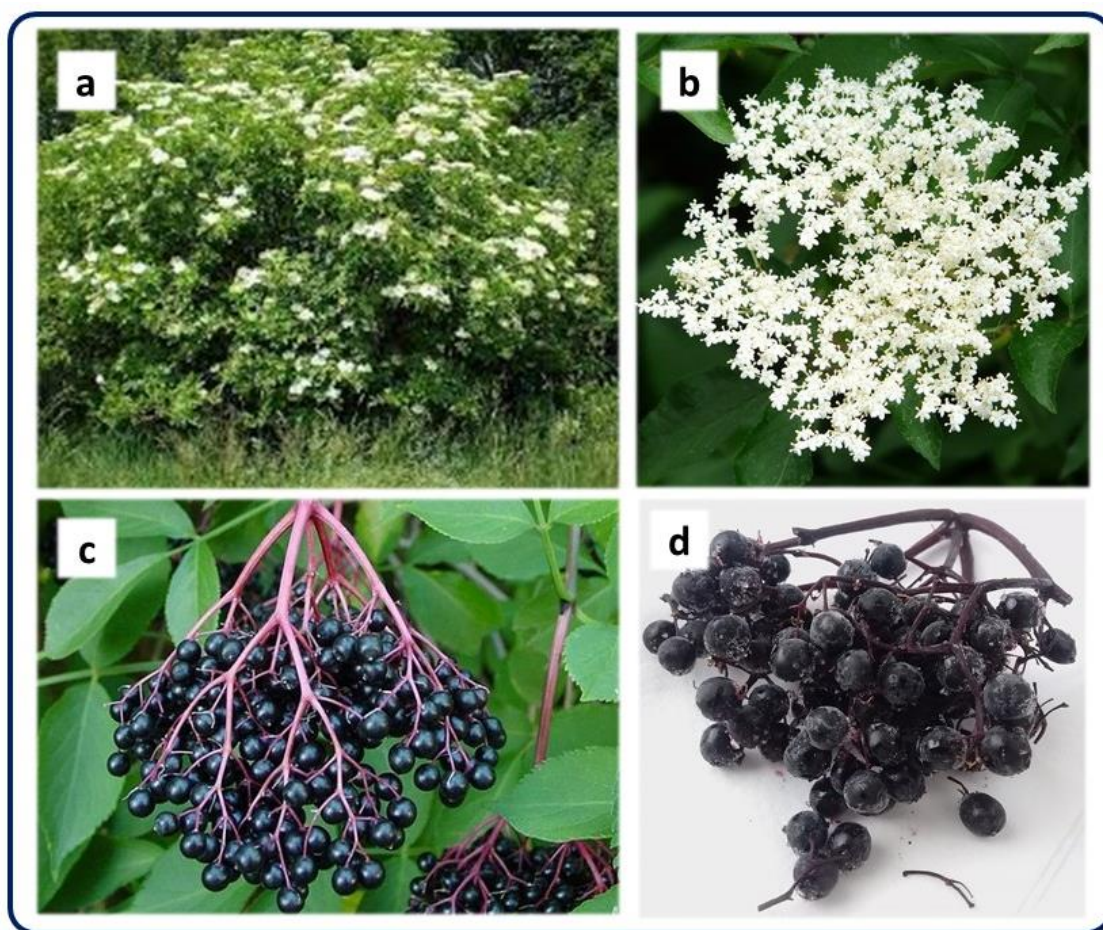


Figura 1.1. Planta arbustiva (a), flores (b), frutos frescos (c) y congelados (d) de sauco (*Sambucus nigra* L.) (Ferreira y col., 2020).

El contenido en azúcares simples y ácidos orgánicos puede variar entre variedades cultivadas y frutos silvestres, sin embargo, existe una clara tendencia en la relación entre glucosa, fructosa y sacarosa en los frutos. Entre los azúcares más abundantes se encuentran la glucosa (4,26 g/100g fruta fresca) y la fructosa (4,4 g/100g fruta fresca) en concentraciones similares, mientras que la sacarosa es casi despreciable (0,104 g/100g fruta fresca). En las flores de sauco, de acuerdo a Mikulic-Petkovsek y col. (2016), el contenido en azúcares es distinto al de los frutos, encontrándose sacarosa y fructosa en concentraciones similares, y glucosa en valores menores.

En relación a los ácidos orgánicos, responsables de las características sensoriales y el particular sabor ácido, los frutos de sauco son ricos en ácido cítrico (0,01 – 0,48 g ác. cítrico/100g fruta fresca), concentración 6 veces mayor que en la manzana y las cerezas, y en menor cantidad contienen ácido málico. También pueden presentar, en cantidades menos relevantes, ácido shikímico, tartárico y fumárico. En contraste, las flores son ricas en ácido málico y contienen ácido quínico, compuesto que no está presente en los frutos. A su vez, en menor proporción contienen ácido cítrico, tartárico, shikímico y fumárico.

El contenido lipídico de los frutos está representado por triterpenoides (ácido ursólico y oleanólico, principalmente) en un 85-94%, seguido de un 4-11% de ácidos grasos libres (como ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico, entre otros), esteroides (0-5%, como campesterol y β -sitosterol) y alcoholes alifáticos de cadena larga (0-0,3%, como octadecanol y hexacosanol). El contenido lipídico en los frutos se caracteriza por aumentar durante el comienzo de la maduración, para luego disminuir al momento de la cosecha. Las semillas en particular, presentan un 75,15 % de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que el contenido de monoinsaturados y saturados es menor (14,21 y 10,64 %, respectivamente) (Młnarczyk y col., 2018). Domínguez y col. (2020), analizaron el perfil lipídico de frutos de sauco y su semilla encontrando una interesante relación ω -6/ ω -3 (1,04), adquiriendo relevancia nutricional al ser estos ácidos grasos esenciales con importante participación en la síntesis de prostaglandinas (Closa, 2007).

Compuestos fenólicos

Como se comentó previamente, las frutas finas son ampliamente reconocidas como antioxidantes naturales. Esto se debe al alto contenido de compuestos bioactivos, como la vitamina C, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y flavonoides (Jimenez-Garcia y col., 2013), que se generan como metabolitos secundarios luego de condiciones de estrés (radiación UV, patógenos, plagas, sequías, etc). Químicamente, estos compuestos fenólicos presentan un esqueleto de anillos aromáticos con grupos hidroxilo que, dependiendo de la posición y el tipo de sustituyente, se pueden clasificar en 5 grandes grupos: ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, taninos y lignanos. A su vez, dentro de los flavonoides presentes en las berries encontramos principalmente antocianinas, flavanoles (como catequina y epicatequina) y flavonoles (quercetina y glucósidos de quercetina) (Szajdek y Borowska, 2008). La **Figura 1.2** muestra la estructura química de los polifenoles más importantes que pueden encontrarse en las frutas finas.

En el sauco, tanto las flores como los frutos presentan una gran variedad de polifenoles, diferenciándose principalmente en la presencia de antocianinas en los frutos. De acuerdo a la bibliografía consultada, la concentración de polifenoles totales en los frutos puede ir desde 515 a 1500 mg ácido gálico/100g fruta fresca y un contenido de antocianinas entre 170 – 953 mg cianidina-3-glucósido/100g fruta fresca (Ferreira y col., 2020). El análisis cromatográfico ha permitido la identificación y cuantificación de los grupos de polifenoles y moléculas específicas que componen estas matrices vegetales. Diferentes autores han determinado un contenido aproximado del 5% de ácidos fenólicos (en particular ácidos cinámicos), 13% de flavonoles y un 80% de antocianinas (Lee y Finn, 2007; Schmitzer y col., 2010; Senica y col., 2016). Dentro de los polifenoles mayoritarios, se identificaron como flavonoles la rutina (quercetina-3-rutinósido) y la quercetina-3-glucósido, mientras que las principales antocianinas se caracterizan por ser glucósidos de cianidina (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-sambubiósido), presentándose en menor cantidad cianidina-3-

rutinosido y dos diglucósidos de cianidina, como cianidina-3-sambubiosil-5-glucósido y cianidina-3,5-diglucósido (Veberic y col., 2009; Mikulik-Petkovsek y col., 2016; Senica y col., 2016; Oniszczuk y col., 2019).

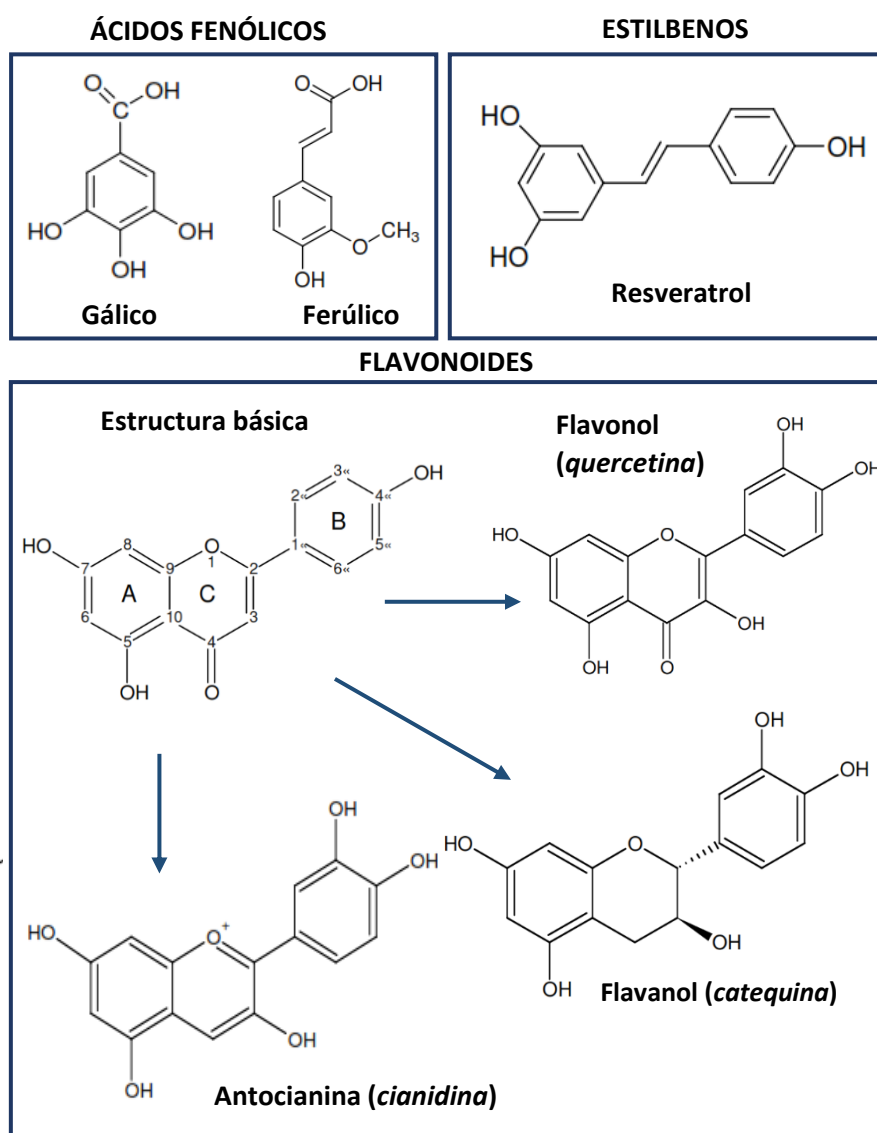


Figura 1.2. Estructura química básica de polifenoles y de flavonoides presentes en frutas finas.

La **Tabla 1.1** presenta el contenido de polifenoles totales y de antocianinas monoméricas totales de diferentes berries. Se pueden apreciar diferencias importantes no sólo entre especies, sino entre datos bibliográficos. De acuerdo a estos valores, el sauco se encuentra entre las frutas de mayor concentración de compuestos fenólicos y antociánicos, lo que lo convierte en una materia prima de gran interés para el desarrollo de nuevos productos ricos en compuestos con potencial bioactivo.

Tabla 1.1. Contenido de polifenoles y antocianinas monoméricas totales en diferentes berries.

Berry	PT*	AMT**	Referencias
<i>Frambuesa</i>	192-359	19-51	Anttonen y Karjalainen (2005)
	236	81.3	Sette y col. (2015)
	174	34	Gagneten y col. (2019)
<i>Arándano</i>	194-306	-	Skupień (2006)
	425-652	101-163	Bunea y col. (2011)
<i>Zarzamora</i>	146	106	Franceschinis y col. (2014)
	140-162	107-124	Van de Velde y col. (2015)
<i>Frutilla</i>	102	20	Zheng y col. (2007)
	239	-	Zujko y Witkowska (2011)
	58.4	-	Barcelo y col. (2015)
<i>Cassis</i>	288	170	Archaina y col. (2017)
	432	242	Gagneten y col. (2019)
<i>Maqui</i>	1110-1620	730-1250	Fredes y col. (2014)
	2584	5095	Rodríguez y col. (2016)
	1286	949	Garrido-Makinistian y col. (2019b)

*PT: polifenoles totales. Resultados expresados en mg ác. gálico/100g (b.h.)

**AMT: antocianinas monoméricas totales. Resultados expresados en mg cyn-3-glu/100g (b.h.)

b.h.: base húmeda

Características y estabilidad de compuestos antociánicos

Las antocianinas, que son los compuestos fenólicos mayoritarios del sauco, además de comportarse como antioxidantes son las responsables de conferir el color característico de las frutas finas. Desde el punto de vista químico, las antocianinas son pigmentos solubles en agua que surgen de un enlace glucosídico entre una aglicona (en este caso una antocianidina) y un glúcido. La aglicona está conformada por dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico (el heterociclo contiene un átomo de oxígeno), y están diferenciadas por la cantidad de grupos oxhidrilos que poseen y el grado de metilación de estos últimos (**Figura 1.3**). En cuanto a los glúcidos, se pueden encontrar glucosa, galactosa, o arabinosa entre los más frecuentes, y el enlace glucosídico se da principalmente en el carbono 3, aunque también pueden desarrollarse en los carbonos 5 o 7. Las antocianinas formadas pueden ser mono-, di- o tri-glucosídicas (Jimenez-Garcia y col., 2013).

La estabilidad de las antocianinas monoméricas es muy variable dependiendo de su estructura y de la composición del alimento que las contiene (Wrolstad y col., 2005; Delgado-Vargas y col., 2000). La degradación de las antocianinas se produce no sólo durante la extracción del tejido vegetal, sino también durante el procesado y almacenamiento de los tejidos alimentarios. Tanto el tono del pigmento como su

estabilidad se ven impactados de manera significativa por los sustituyentes en la aglicona. El aumento de la sustitución glucosídica, y, en particular, la acilación del azúcar con ácido cinámico, aumenta la estabilidad de estos pigmentos (Wrolstad y col., 2005).

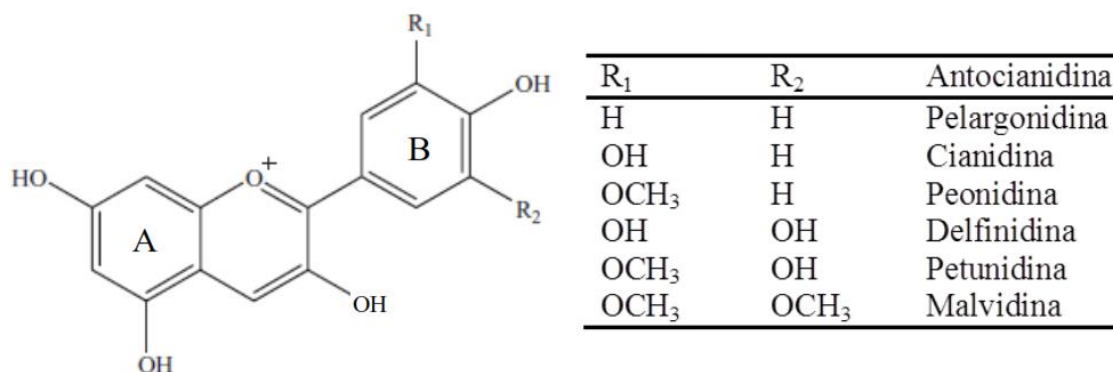


Figura 1.3. Estructura química de la aglicona y antocianinas derivadas según el grupo funcional ubicado en R₁ y R₂.

Uno de los factores que más incide en la estabilidad de las antocianinas es el pH. En soluciones acuosas y en los alimentos, las antocianinas pueden existir en cuatro formas estructurales en equilibrio termodinámico: catión flavilio (AH⁺), base quinoidal (A), pseudo base carbinol (B) y chalcona (C). La proporción de cada una de estas formas estructurales depende fuertemente del pH (Brouillard, 1982; Fennema, 2001). En la **Figura 1.4** se representan las cuatro estructuras mencionadas, indicando el color que pueden adquirir.

Entre los demás factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas se encuentran: la temperatura, la luz, la concentración de oxígeno y la concentración de azúcares (Skrede y col., 2000; Fennema, 2001):

- 1) *Temperatura*: las altas temperaturas pueden desplazar el equilibrio hacia la forma de chalcona, con la consiguiente pérdida de color. Como consecuencia de la exposición a altas temperaturas también puede ocurrir la formación de compuestos poliméricos de color pardo (Sari y col., 2012).
- 2) *Luz*: la exposición a la luz puede provocar la pérdida de color de las antocianinas (Contreras-Lopez y col., 2014) y magnificar el efecto de la temperatura (Jenshi roobha y col., 2011).
- 3) *Concentración de oxígeno*: debido a su estructura insaturada, las antocianinas son susceptibles a la oxidación por oxígeno molecular. Por lo tanto, es posible minimizar el deterioro de las antocianinas disminuyendo o eliminando el oxígeno en contacto con las mismas (Mazza y Miniati, 1993).

- 4) *Concentración de azúcares*: altas concentraciones de azúcares contribuyen a la estabilidad de las antocianinas debido a la disminución de la actividad de agua. En cambio, en bajas concentraciones, los azúcares o sus productos de degradación pueden acelerar las reacciones de deterioro (Fennema, 2001).

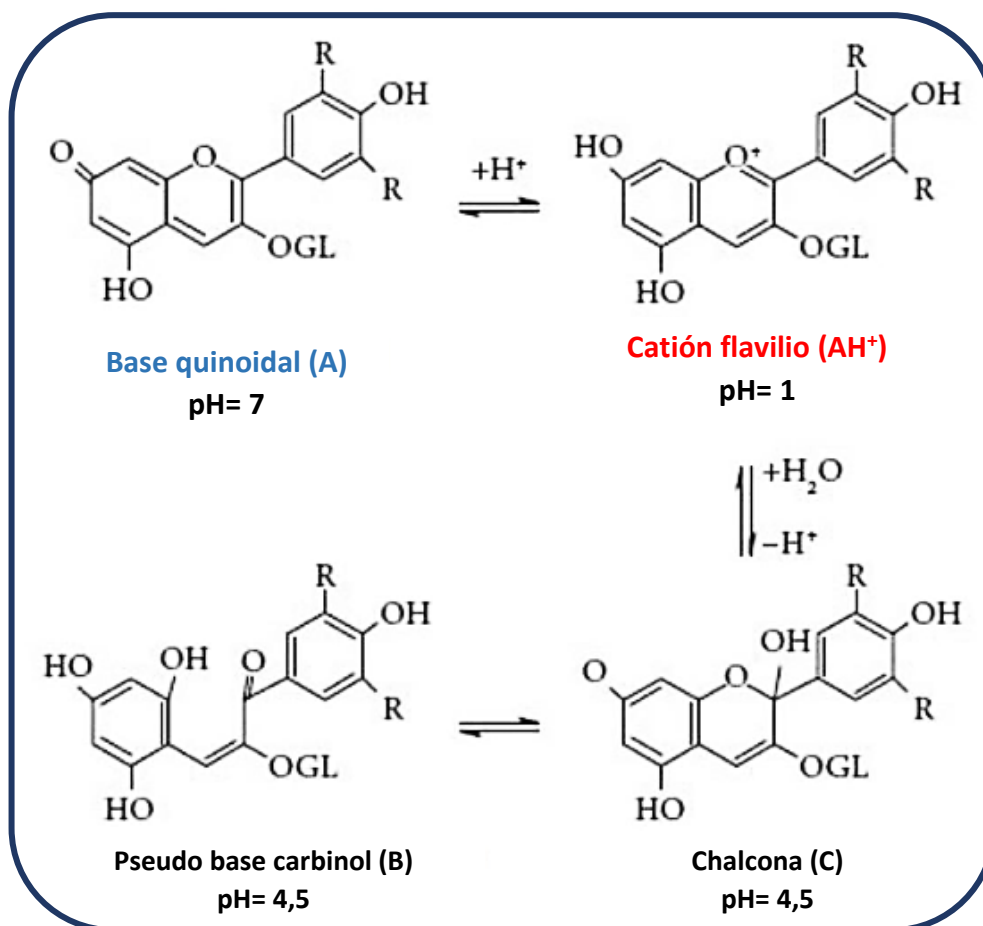


Figura 1.4. Equilibrio entre estructuras de las antocianinas en función del pH (Fennema, 2001).

Investigaciones más recientes demostraron que las antocianinas presentan una mayor estabilidad debido al desarrollo de un mecanismo denominado “copigmentación” (Sari y col., 2012). La copigmentación, fenómeno que incrementa el color de matrices vegetales que contienen antocianinas, se fundamenta en que las antocianinas son planas y pueden formar asociaciones entre ellas o con otras moléculas denominadas copigmentos (Zamora, 2003). La reacción se da por la interacción hidrófoba entre los núcleos aromáticos de las antocianinas agrupadas y consiste en la interacción electrónica planar en los grupos cromóforos de las antocianinas. Por lo tanto, el ión flavilio, por su forma planar, es la única especie capaz de copigmentar. Una de las consecuencias de este estado es un efecto hipercrómico, es decir que provoca la intensificación del color en los tejidos vegetales (Scheffeldt y Hrazdina, 1978). Por tal motivo, el proceso de copigmentación disminuye la luminosidad (L^*) y aumenta la saturación o croma (C^*_{ab}), lo que indica que el color de las

antocianinas copigmentadas es más intenso y saturado que el color de matrices con antocianinas monoméricas (Sari y col., 2012).

Diferentes compuestos pueden actuar como copigmentos, por ejemplo: ácidos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, nucleótidos, polisacáridos, etc. (Mazza y Brouillard, 1990). Algunos autores postulan que la copigmentación es un paso previo a la formación de uniones más estables, ya que facilita la condensación de las antocianinas con los flavonoles (Brouillard y Dangle, 1994; Boulton, 2001). Según Boulton (2001) un alto nivel de copigmentación inhibe la polimerización debido a que muchos de los flavonoides podrían actuar como cofactores. De esta manera las reacciones de formación de compuestos poliméricos pardos serían mucho más lentas en una matriz con alto nivel de copigmentación. La copigmentación reduciría el nivel de antocianinas monoméricas libres y la tasa de oxidación de antocianinas y compuestos que actúan como cofactores. Esto protegería a los compuestos de la oxidación y favorecería la formación de pigmentos rojos en lugar de pigmentos pardos (Santos-Buelga, 2001).

Con respecto al efecto de las altas temperaturas, las antocianinas copigmentadas también son susceptibles a la degradación durante el calentamiento. Este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta que la interacción intermolecular que ocurre en la copigmentación posee fuerzas hidrofóbicas débiles, de modo que el calor puede provocar la degradación de los complejos copigmentados. Los productos derivados de la degradación térmica de las antocianinas copigmentadas tienen menor estabilidad que las antocianinas monoméricas (Sari y col., 2012). Además, Mazza y Brouillard (1990) señalan que la interacción entre el pigmento y el copigmento es exotérmica y el aumento de temperatura provoca la disociación de los complejos copigmentados, dando compuestos incoloros.

Capacidad antioxidante

En cuanto a la actividad antioxidante, si bien varios componentes presentes en frutos de sauco presentan esta propiedad (como ciertas vitaminas), los flavonoides, en particular las antocianinas, se caracterizan por ser el principal grupo responsable de esta actividad. El catión flavilio (AH^+) presente en la estructura de las antocianinas, es responsable de la actividad antioxidante frente al desbalance oxidativo que puede sufrir el cuerpo humano frente a situaciones de estrés, al actuar como dadores de átomos de hidrógeno o participando de la transferencia de electrones. La actividad antioxidante de estos compuestos depende de su concentración, estructura, y condiciones externas, como el pH (Tena y col., 2020).

En relación a los demás tipos de polifenoles presentes en el sauco, aquellos derivados de los ácidos cinámicos (como el clorogénico, ferúlico y cafeico) presentan mayor actividad antioxidante que los derivados de ácidos benzoicos. A su vez, derivados del ácido elágico y ciertos taninos condensados presentan una alta

actividad antirradicalaria en comparación con polifenoles de bajo peso molecular (Szajdek y Borowska, 2008).

Es interesante destacar que la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de frutas finas, es mucho mayor que la que manifiestan los compuestos fenólicos puros, lo que indicaría un efecto sinérgico entre las distintas moléculas presentes (Szajdek y Borowska, 2008). Varios autores han observado un aumento en la capacidad antioxidante luego del procesamiento de berries y otras frutas, atribuyendo este comportamiento a la combinación de estos compuestos fenólicos entre sí o con productos de degradación (generados a partir de los mismos) (Reber y col., 2011; Sette y col., 2020). En particular, Luís y col. (2018) observaron luego del análisis de las posibles mezclas entre 19 polifenoles mayoritarios de diferentes especies de berries, que el 70% de las combinaciones analizadas presentaba efectos sinérgicos y aditivos. Dada la riqueza de estos compuestos, distintos estudios muestran que el sauco presenta una elevada actividad antioxidante, tanto frente a radicales como ABTS^{•+}, DPPH[•] y OH[•], así como también actividad frente a la peroxidación de lípidos (Dawidowicz y col., 2006; Denev y col., 2010; Olejnik y col., 2016; Mikulik-Petkovsek y col., 2016; Młynarczyk y col., 2020). Esta información resulta de gran relevancia para revalorizar la producción de esta especie y su uso tanto en la industria alimenticia y nutracéutica como farmacéutica, aprovechando su potencial como fuente de compuestos antioxidantes.

1.1.2.2. Actividad biológica y toxicidad

Además de sus propiedades antioxidantes, el sauco se conoce por sus efectos benéficos contra enfermedades degenerativas (cardiovasculares e inflamatorias), cáncer y diabetes, como también por su actividad antiinflamatoria, inmunoestimulante, quimiopreventiva y ateroprotectora (Ferreira y col., 2020).

Varios autores han reportado resultados relacionados con la actividad biológica de polifenoles presentes en el sauco. Por ejemplo, Youdim y col. (2000) estudiaron la actividad antioxidante de cianidinas propias del sauco que proveen efecto protector en células del endotelio, previniendo enfermedades vasculares. Krawitz y col. (2011) demostraron la actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus pyogenes* y otras bacterias gram positivas y negativas, responsables de infecciones del tracto respiratorio, en conjunto con la inhibición sobre la propagación de virus responsables de la influenza que enferma humanos (como el virus H1N1). Torabian y col. (2019) encontraron que el jugo de sauco y extractos de cianidina-3-glucósido presentaban acción terapéutica sobre diferentes etapas de la infección generada por el virus de la gripe. Hawkins y col. (2019), si bien reconocieron que el estudio se realizó con bajo número de participantes, fueron los primeros en informar resultados sobre el efecto antigripal en humanos, concluyendo que la suplementación con sauco es una alternativa segura para tratar resfriados y gripes. Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de

extractos de sauco de ejercer actividad antiviral y potenciadora del sistema inmunológico (Frøkiær y col., 2012).

El sauco muestra ser una especie con propiedades terapéuticas muy variadas, sin embargo, su consumo se ha visto limitado debido a la existencia de compuestos tóxicos en su composición. Aunque no es considerada una planta tóxica, sus hojas, tallos, ramas, raíces, flores y frutos inmaduros contienen cantidades importantes de glicósidos cianogénéticos (principalmente sambunigrina), que pueden convertirse en ácido cianhídrico durante la digestión de los mismos (Jensen y Nielsen, 1973). El consumo de partes inmaduras o en grandes cantidades puede causar problemas gastrointestinales manifestándose como náuseas, vómitos y diarrea (Sidor y Gramza-Michałowska, 2015). Sin embargo, el procesamiento de la materia prima permite evitar estos inconvenientes. Tratamientos como pelado, triturado, rallado, remojado, secado y tratamientos térmicos han demostrado ocasionar una disminución en el contenido de estos glicósidos (Sidor y Gramza-Michałowska, 2015; Ferreira y col., 2020). Senica y col. (2016) estudiaron el efecto del procesamiento en el contenido de estos compuestos, preparando diferentes productos a partir de frutos de sauco (jugo, licor, té, y un unttable). Estos autores indicaron que las altas temperaturas de pasteurizado y/o cocción afectaron el contenido de compuestos beneficiosos, pero también provocaron el descenso en la concentración de sambunigrina del 44% para el jugo, 80% para el té, y del 96% para el licor y el unttable. De acuerdo a lo expuesto la toxicidad, tanto de las bayas de partida como de los productos desarrollados a partir de ellas, es un aspecto que debe ser abordado para poder asegurar su inocuidad.

1.1.2.3. Producción, disponibilidad y usos en Argentina

Si bien no hay datos oficiales actualizados sobre la producción de sauco en la Argentina, de acuerdo al diagnóstico productivo para el sector de fruta fina correspondiente a la Comarca Andina del Paralelo 42° (Río Negro-Chubut, Argentina), de un total de 196 hectáreas (ha) dedicadas a la producción de estas frutas, 1,8 ha son dedicadas al sauco (contra 71 ha dedicadas por ejemplo a la frambuesa), ubicadas exclusivamente en la localidad de El Hoyo (Melzner, 2003). Por otro lado, el proyecto “Desarrollo Institucional para la inversión” (FAO UTF ARG, 2015), publicó durante 2015 el informe de diagnóstico de los principales valles y áreas con potencial agrícola de la provincia de Río Negro, en el cual indica que de la producción total de frutas finas producidas en el cluster “Comarca del paralelo 42° - Cuenca del Alto Valle”, sólo el 1% está destinado al sauco. Estos datos indican que la explotación de esta especie en el país es muy baja en comparación con otras frutas finas de mayor difusión, como la frambuesa, la zarzamora y los arándanos. Es decir que los frutos de sauco que son comercializados corresponden mayormente a especies proporcionadas por recolectores experimentados de la zona, a causa del crecimiento silvestre del arbusto.

En cuanto a los usos del sauco, todas las partes de las plantas se han utilizado en la medicina tradicional. Las hojas se usan para tratamientos cutáneos y las frutas frescas o deshidratadas para la constipación, como diurético y para infecciones virales del tracto respiratorio, resfríos, gripe, catarro e influenza. Las infusiones obtenidas de las flores también se utilizan como un remedio tradicional para tratar inflamaciones, dolores articulares, trastornos de la piel, resfrío, fiebre, alteraciones respiratorias y como diurético. Las hojas en los cultivos repelen ratones, topos y algunos reptiles e insectos. Igualmente, quemadas tienen efecto insecticida, mientras que la infusión se usa como repelente de mosquitos y rociada sobre las plantas sirve como protección contra los pulgones y las orugas (Atehortúa y col, 2015). Si bien el sauco presenta cualidades variadas con fines medicinales, en la actualidad estos usos se encuentran circunscriptos a algunas comunidades indígenas, como la comunidad mapuche.

En la industria alimenticia las bayas de sauco se utilizan principalmente como colorantes para mermeladas, gelatinas, tartas, helados, yogures, jugos, jarabes y bebidas alcohólicas. Las flores, debido a sus propiedades aromáticas y flavor particular se utilizan en preparaciones de muffins, waffles, tortas y golosinas, y en la producción de algunas infusiones o bebidas fermentadas (Ferreira y col., 2020). En nuestro país, a pesar de que el sauco es declarado una planta de interés económico, su uso en el área de los alimentos es limitado (Cantero y col., 2019). Si bien en la región patagónica es más conocido que en el resto del país, su aprovechamiento se enfoca principalmente a la producción de mermeladas, pulpas y jugos. En los últimos años han aparecido, sin embargo, algunas bebidas artesanales con sauco incorporado como cerveza, y algunos nutraceuticos. En el mercado europeo y estadounidense, la oferta de productos ha ido en aumento, existiendo actualmente algunos productos nutraceuticos, mezclas herbales, té de flores, jarabes y frutos deshidratados.

Las propiedades bioactivas del sauco, sumadas a la baja difusión y poca oferta de productos, lo convierte en una especie con amplio nicho de estudio y posibilidad de explotación regional con futuro para competir en el mercado internacional, que aún se encuentra en auge.

1.2. Métodos de extracción de compuestos bioactivos

La extracción de compuestos de diferentes tejidos biológicos tiene una larga historia en la producción de diferentes productos como azúcar, jugos, vinos, pigmentos, hierbas, perfumes, aceites y más. Las técnicas tradicionales de extracción aplicadas a matrices vegetales involucran en general extracciones del tipo sólido-líquido. Estas comprenden la remoción de un conjunto de componentes desde la matriz del alimento, utilizando un solvente líquido adecuado para la disolución de los mismos (Garrido-Makinistian, 2020). Sin embargo, este tipo de extracción convencional suele presentar baja selectividad y consume grandes cantidades de solventes, que a su vez pueden presentar toxicidad requiriendo su posterior remoción y

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

En los últimos años se han ido desarrollando métodos de extracción no convencionales como la extracción asistida por enzimas, con fluidos supercríticos, altas presiones, ultrasonido, microondas y campos eléctricos pulsados (Azmir y col., 2013). Se busca aplicar “tecnologías verdes de extracción” (en inglés “green extraction methods”) que requieran poco o ningún uso de solventes orgánicos, junto a un menor consumo de energía, de modo de reducir el impacto ambiental y en la salud, aumentando los rendimientos de extracción. A través del uso de estas nuevas tecnologías, muchas de las cuales se encuentran todavía en estadios de investigación, se han obtenido resultados promisorios en varios campos de aplicación, incluyendo extracción de compuestos naturales bioactivos, aceites esenciales, aromas y pigmentos (Chemat y col., 2017).

Tecnologías verdes para la extracción de polifenoles

En relación a la extracción de polifenoles, Panja (2017) describe algunas de las tecnologías consideradas como amigables con el medio ambiente. Algunas de ellas se basan en la manipulación de las propiedades de los solventes; por ejemplo, la utilización de líquidos a altas presiones y la extracción con fluidos supercríticos (EFSC), se basan en la relación entre la presión y la temperatura de un líquido. En la primera se prioriza el aumento de la presión por sobre el incremento de la temperatura, mientras que en EFSC el solvente se encuentra por encima del punto crítico, donde la fase gaseosa y líquida son indistinguibles, comportándose el fluido como un líquido y un gas al mismo tiempo. Una de las ventajas de estas metodologías radica en la disminución de costos mediante el uso de solventes de fácil disponibilidad, logrando buenos rendimientos en recuperación de polifenoles.

Una técnica emergente es la extracción por aplicación de campos eléctricos pulsados (PEF, por sus siglas en inglés), considerada una técnica no térmica, rápida y energéticamente más eficiente que otras extracciones tradicionales. La extracción ocurre al aplicar un campo eléctrico específico con el fin de destruir o permeabilizar la membrana celular (fenómeno conocido como electroporación). Las principales ventajas se relacionan con el no uso de temperaturas altas y los cortos tiempos de extracción, entre otras.

Otra tecnología usualmente aplicada es la extracción por microondas (EAM), que básicamente se trata de la cocción del material de una forma limpia y rápida, que evita el sobrecalentamiento, pardeamiento o caramelización del producto. En este caso, la elección del solvente es muy importante, ya que el mismo debe tener la capacidad de absorber la radiación proveniente de las microondas (por ejemplo: dimetilsulfóxido,

etanol y metanol, agua y ácido acético). Si bien las ventajas del método radican en los bajos costos del equipo, los bajos requerimientos de solvente y energía, y el rápido calentamiento, para que el proceso sea efectivo deben tenerse en cuenta diferentes variables (tiempo y temperatura de extracción, tipo y concentración del solvente, relación solvente:muestra, potencia de microondas).

En el presente trabajo haremos especial hincapié en las técnicas de extracción asistida por ultrasonido (EAU) y por enzimas (EAE). A diferencia de las microondas, la EAU utiliza ondas de sonido con alta frecuencia (20 kHz a 2 MHz), siendo imperceptibles por el oído humano. Las ondas de sonido tienen un impacto significativo en diferentes medios como solventes líquidos, tejidos blandos o partes de plantas. De esta manera, se produce el fenómeno de cavitación (**Figura 1.5**), que genera muchísimas burbujas microscópicas dentro del medio; estas burbujas al colapsar liberan energía capaz de crear zonas localizadas de alta presión y temperatura, rompiendo los tejidos y facilitando la penetración del solvente que extrae los compuestos de interés. Existen dos metodologías de aplicación de EAU: la indirecta, en la cual se utilizan baños de ultrasonido y las ondas deben atravesar un solvente (generalmente agua) y el recipiente que contiene la muestra hasta llegar a la misma; y la directa, que consiste en un equipo que cuenta con una punta de prueba para transmitir las ondas de sonido, que está en contacto con la muestra y el solvente. Esta segunda opción permite una interacción mucho más provechosa, aumentando el efecto y la intensidad del fenómeno de cavitación, mejorando así el proceso de extracción (Dzah y col., 2020).

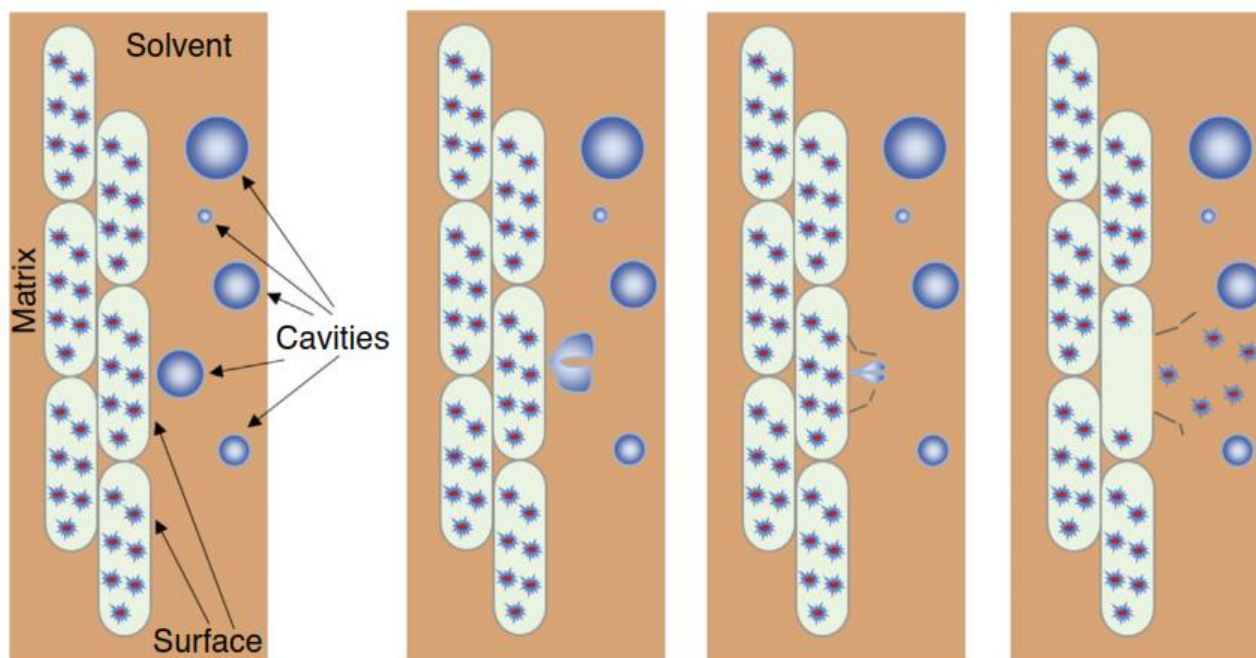


Figura 1.5. Mecanismo de extracción mediante aplicación de ondas de ultrasonido (Panja, 2017).

Diferentes autores han utilizado la técnica de EAU obteniendo una extracción exitosa de polifenoles a partir de distintas frutas finas. Golmohamadi y col. (2013) utilizaron diferentes frecuencias de sonido,

obteniendo resultados positivos en el contenido de antocianinas, polifenoles totales y/o actividad antioxidante de puré de frambuesa. Galvan d'Alessandro y col. (2013) obtuvieron un aumento del 30% en el rendimiento de extracción de polifenoles de aronia (*Aronia melanocarpa*, chokeberry en inglés), al utilizar ultrasonido, 60°C y etanol como solvente, en relación a las mismas condiciones de extracción pero sin sonicación. Vázquez-Espinosa y col. (2019) optimizaron el proceso de extracción de polifenoles y antocianinas de frutos de maqui, obteniendo una mejora (entre 3 y 23%) en el contenido de antocianinas al compararlo con extracciones mediante microondas.

Por último, la extracción asistida por enzimas (EAE) es una metodología utilizada desde hace varios años en la industria juguera, con el objetivo de mejorar el rendimiento de extracción de jugo, independientemente del contenido en bioactivos que éste tenga. En la actualidad, el enfoque de la aplicación de enzimas se dirige a aumentar la recuperación de polifenoles asociados a la matriz celular, principalmente aquellos ubicados en la piel de frutas y vegetales (Macheix, 1990), que no pueden extraerse fácilmente mediante el uso de solventes. Las enzimas del tipo celulasas y pectinasas son las más utilizadas para liberar los polifenoles que interaccionan con carbohidratos o proteínas contenidos en la pared celular (Puri y col, 2012).

Las pectinasas o enzimas pécticas se caracterizan por actuar sobre las pectinas presentes en la piel de frutas y vegetales. Existen tres clases de pectinasas: las pectinmetilesterasas hidrolizan los enlaces metiléster en las pectinas, dando ácido péctico y metanol; las poligalacturonasas actúan sobre el enlace glucosídico α -1,4 presente, rompiéndolo e hidrolizando el ácido péctico, lo cual suele manifestarse como una reducción en la estructura y consistencia del medio donde se encuentran. Por último, las pectato liasas rompen el enlace glicosídico presente en pectinas y el ác. péctico, pero mediante un mecanismo diferente (β -eliminación) al de las poligalacturonasas. Éstas también producen una disminución en la consistencia del material sobre el que actúan (Fennema, 2001). Las celulasas se caracterizan por su acción sobre la celulosa, principal polisacárido presente en la pared de células vegetales, degradándola a monómeros de glucosa. Esto provoca el ablandamiento de la textura vegetal y facilitaría la extracción de compuestos asociados o acomplejados a la pared. De acuerdo a Bejarano y col. (2011) para lograr la degradación de paredes celulares las pectinasas se combinan con celulasas y/o hemicelulasas, que normalmente se consiguen como complejos enzimáticos comerciales.

Los factores más importantes a definir durante la EAE son la concentración de enzima en relación con la cantidad de muestra, la temperatura, el pH y el tiempo. La adición de enzima generalmente se logra generando una solución acuosa o adicionándola en una mezcla de muestra:solvente (el agua es el solvente más utilizado). El aumento de la temperatura (35-50°C), mejora la actividad de la enzima, y dado que no se requieren temperaturas muy elevadas, en general previenen posibles pérdidas por degradación térmica (Gligor y col., 2019). Respecto al pH, estas enzimas suelen requerir medios ácidos, lo cual generalmente, no

implica ningún ajuste del mismo cuando se trabaja con berries. En cuanto al tiempo de extracción, el mismo se encuentra íntimamente relacionado con la concentración de enzima, pudiendo ocasionar inconvenientes si la extracción se extiende por muchas horas (>1 h), ya que se promueve la degradación de compuestos bioactivos por degradación térmica u oxidación (Panja, 2017; Gligor y col., 2019). Estos factores convierten a la EAE en una metodología amigable con el medioambiente.

La tecnología EAE ha sido ampliamente utilizada para la obtención de jugos de berries, con mejoras en su contenido en bioactivos. Por ejemplo, Wang y col. (2009) estudiaron el rendimiento en jugo y antocianinas de jugo de mora, analizando diferentes enzimas, obteniendo mejoras tanto en los rendimientos en jugo como en el contenido en antocianinas y polifenoles. Laaksonen y col. (2012) analizaron la calidad y estabilidad de jugos de grosella negra obtenidos mediante extracción enzimática, variando las condiciones de extracción (temperatura de maceración y de inactivación, tipo de enzima). Estos autores observaron en todos los casos que incluían el agregado de una solución enzimática, que el contenido de compuestos bioactivos aumentaba respecto de la muestra sin tratamiento enzimático. A su vez, Dal Magro y col. (2016) evaluaron 5 preparados de diferentes enzimas para obtener jugos de uva de alta calidad sensorial y capacidad antioxidante. Estos autores observaron una mejor extracción de polifenoles y antocianinas al utilizar una enzima con actividad celulasa. Por último, Toscano Martínez y col. (2020) optimizaron la obtención de jugo de grosella negra mediante extracción enzimática evaluando la concentración, el tiempo y la temperatura de incubación. Los autores informaron que al comparar con un jugo control, las condiciones óptimas de extracción produjeron una mejora del 15% en el rendimiento en jugo, y un aumento de 2,4 veces en el contenido de polifenoles, 2,7 veces en el contenido de antocianinas y 2,8 veces en la capacidad antioxidante.

1.3. Métodos de estabilización y preservación de extractos/jugos con actividad antioxidante

Al ser los vegetales y frutas ricos en compuestos antioxidantes, la necesidad de preservar estas sustancias y sus propiedades se ha vuelto un desafío a lo largo de los últimos años. En particular, el proceso de encapsulación de moléculas de interés como los polifenoles, se ha ido desarrollando durante los últimos 70 años, dando lugar a diferentes metodologías para obtener encapsulados. La encapsulación consiste básicamente en la obtención de sistemas o partículas pequeñas generadas a partir del recubrimiento o atrapamiento de un compuesto o mezcla de interés (encapsulado) en otro material (encapsulante) (Fang y Bhandari, 2010). Dependiendo de la interacción encapsulado-encapsulante, se formarán partículas de diferentes tamaños (micro o nanopartículas) y funcionalidades. En la industria alimentaria esta tecnología se aplica con diversos objetivos: proteger un material de interés de su deterioro por factores ambientales, evitar o reducir la pérdida del encapsulado durante el procesamiento del producto, modificar las

características físicas del material original con el fin de facilitar su posterior manipulación, controlar la liberación en el tiempo del material encapsulado, enmascarar un compuesto indeseado que pueda afectar el flavor, entre otros (Fang y Bhandari, 2010). Para lograr esto, existen diversas metodologías que dependerán del tipo de partícula y la función que cumplirá. Existen métodos químicos, como la inclusión molecular o el entrecruzamiento interfacial, que se fundamentan en la interacción química de grupos funcionales del material de pared con el encapsulado, o la capacidad del encapsulante de generar cápsulas o gotas en un sistema disperso de dos fases (Munin y Edwards-Lévy, 2011).

También existen métodos fisicoquímicos, como la coacervación, encapsulación con liposomas, gelación iónica, entre otros. La encapsulación mediante coacervación involucra la interacción entre polímeros con diferentes cargas en un sistema coloidal. La modificación de alguna de las características del coloide (como un cambio de pH, adición de sales, etc.) puede provocar la disminución de la solubilidad de las macromoléculas presentes produciendo la separación en una nueva fase, formando así las microcápsulas que contienen el material de interés. Por otro lado, la encapsulación con liposomas consiste en la interacción hidrofílica e hidrofóbica entre fosfolípidos y moléculas de agua. Esto otorga a los liposomas la capacidad de contener, transportar y liberar materiales hidro y liposolubles como también sustancias anfífilas (Fang y Bhandari, 2010). Finalmente, dentro de los métodos físicos encontramos técnicas como la co-cristalización, extrusión, generación electroestática de gotas, secado por atomización y liofilización, entre otros.

En general los procesos de encapsulación incluyen la deshidratación final de las partículas o son técnicas de secado propiamente dichas, como ocurre en procesos de secado por atomización y liofilización. En estos métodos, la encapsulación comienza durante la obtención de una formulación líquida, mezclando el material de interés y el agente encapsulante. La disolución y homogenización de los componentes es una de las etapas claves para una encapsulación adecuada (Fang y Bhandari, 2010; Macías-Cortés y col., 2020). Esta solución es la que se utilizará posteriormente como líquido de alimentación de los equipos de secado.

Tanto la liofilización como el secado por atomización son procesos muy utilizados en la industria alimenticia para preservar alimentos. La eliminación de parte del agua contenida en un sistema permite extender su vida útil, inhibiendo o evitando el crecimiento de microorganismos patógenos y/o deteriorativos, la ocurrencia de algunas reacciones químicas y de cambios en el estado físico durante el almacenamiento. A su vez, el secado permite reducir costos de embalaje, manejo, almacenamiento y transporte, dado que se reducen el peso y volumen del producto (Araya-Farías y Ratti, 2009; Jiang y Zhang, 2013). En relación al procesado de frutas y vegetales, la deshidratación permite disponer de productos estacionales (como las frutas finas) durante todo el año (Vega-Gálvez y col., 2011), como también la generación de productos con gran versatilidad (como los polvos) para poder ser incorporados en diferentes elaboraciones como yogures, galletitas, productos de confitería, o ser utilizados para la elaboración de productos cosméticos o nutracéuticos.

Teniendo en cuenta que las metodologías más utilizadas para la producción de polvos a base de frutas y vegetales son el secado por aspersión y la liofilización, y que las mismas serán aplicadas en el presente trabajo, a continuación se describen con mayor profundidad.

Secado por atomización

El secado por atomización (o por aspersión) es un método de deshidratación utilizado para la preservación de los alimentos líquidos (Masters, 2004). Se lleva a cabo mediante una operación continua para convertir una solución líquida en un polvo seco mediante la deshidratación de una nube de gotas minúsculas, por lo general de 10 a 500 μm de diámetro. Mediante este proceso simple y ultrarrápido, se consigue secar los sólidos presentes (solubles e insolubles), logrando obtener productos de alta calidad, preservando las características esenciales de los alimentos de partida, ofreciendo a su vez las ventajas en cuanto a reducción de peso y volumen. Esta particularidad ha convertido el secado por atomización en la tecnología de encapsulación más utilizada a nivel mundial (Macías-Cortés y col., 2020).

En la **Figura 1.6** se presenta el esquema de un equipo de secado por atomización. En el punto A se encuentra el líquido de alimentación el cual se bombea hasta el tanque secador, donde el líquido se atomiza en pequeñas gotas, y en contacto con el aire caliente se produce la vaporización del solvente (generalmente agua) logrando un sólido seco, el cual decanta por un ciclón y finalmente se obtiene el polvo en el punto B.

El proceso puede dividirse en dos etapas: inicialmente, la transferencia de calor se da desde el aire caliente hacia las gotas, provocando la evaporación del solvente y dando comienzo a la disminución del tamaño de las mismas. Luego, comienza la formación de una corteza sólida en la superficie de las gotas, convirtiéndose en partículas cuya morfología final depende de múltiples variables (Garrido-Makinistian, 2020). El tiempo de residencia del producto a secar es muy corto (entre 5 y 100 segundos), y esto sumado a que el intercambio de calor y de masa es muy rápido por la gran superficie creada por la atomización, hace que este proceso sea aplicable al secado de materiales sensibles al calor (Masters, 1991).

En relación a la disposición relativa de las corrientes de alimentación líquida y de aire de secado, existen dos tipos de diseño: secaderos de flujo en contracorriente, co-corriente y de flujo mixto. En los secaderos en contracorriente, el atomizador se encuentra ubicado en la parte superior de la cámara de secado y el aire ingresa por la parte inferior. Este diseño genera una evaporación más rápida y una mayor eficiencia energética que el secadero en co-corriente. Sin embargo, la disposición en contracorriente no es adecuada para productos termosensibles. En el caso del diseño en co-corriente, el atomizador se ubica en la parte superior de la cámara de secado junto al ingreso del aire caliente. Esta disposición se prefiere para productos termolábiles ya que las gotas entran en contacto con el aire de secado con su máximo contenido de humedad (Garrido-Makinistian, 2020). Los secaderos de flujo mixto combinan los diseños anteriormente

explicados: el líquido de alimentación ingresa por el fondo de la cámara de secado en contra del flujo de aire de secado, que ingresa por la parte superior. El líquido atomizado inicialmente experimenta un flujo ascendente, pero al entrar en contacto con el aire caliente se produce una reversión en la dirección del flujo, siendo recolectado finalmente por la parte inferior de la cámara. Este diseño maximiza el tiempo de residencia del producto, siendo preferencial para el secado de gotas gruesas, incluso en cámaras pequeñas. Se utiliza principalmente para la deshidratación de materiales resistentes al calor (Santos y col., 2018).

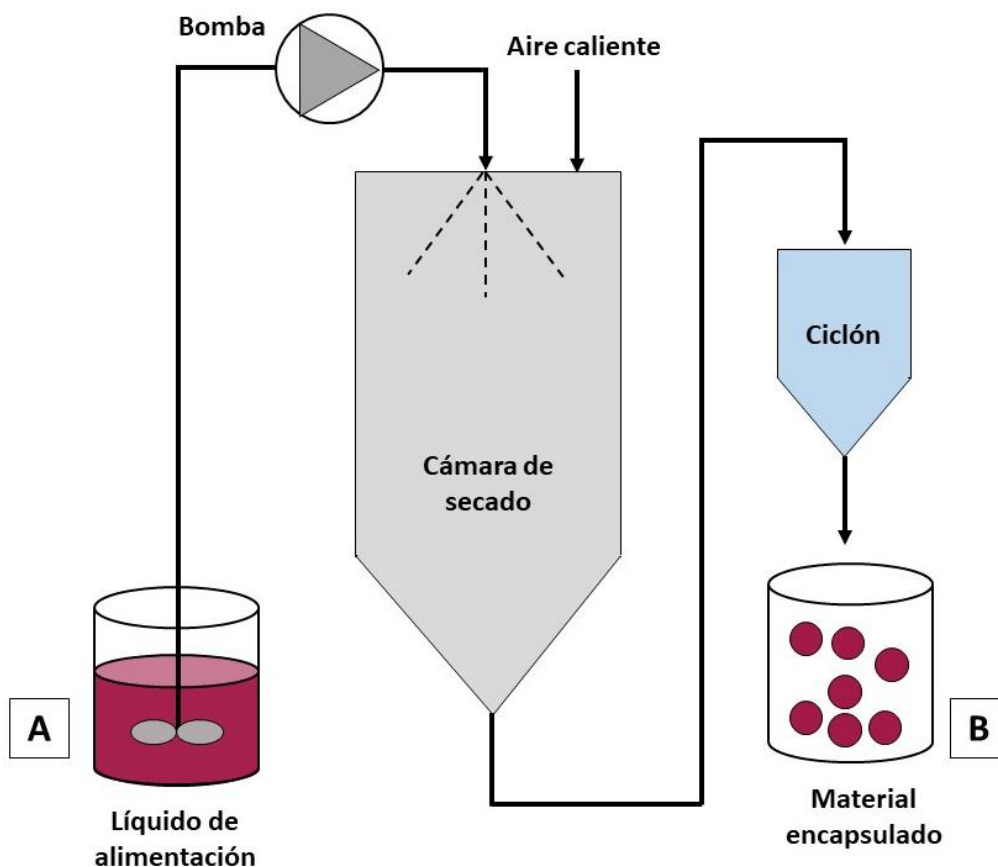


Figura 1.6. Esquema básico de un equipo de secado por aspersión o spray.

La operación de atomización es de gran importancia en esta tecnología de secado, ya que define la distribución de tamaño de gotas y consecuentemente de las partículas finales del polvo. A su vez, el caudal y la naturaleza del líquido de alimentación afectan el tamaño de las partículas generadas: bajos caudales de aire y altas concentraciones de solutos o alta viscosidad del líquido favorecen la producción de partículas relativamente grandes. Es por ello, que la selección del atomizador resulta ser un factor de gran importancia a la hora de desarrollar un polvo secado por atomización. Dentro de los atomizadores disponibles, se encuentran varios tipos, como boquilla a presión, boquilla de dos fluidos, disco giratorio y nebulizador ultrasónico. La boquilla a presión permite la conducción del líquido de alimentación bajo presión, mediante un conducto que disminuye su diámetro gradualmente. Esto permite que el fluido sea expulsado a alta

velocidad por un pequeño orificio (generalmente con un diámetro entre 0,4 - 4 mm), y de esta manera al perder presión comienza a formar pequeñas gotas. Este tipo de atomizador es económico y genera polvos de alta densidad con buenas características de flujo; sin embargo, altas velocidades de alimentación generan mayor heterogeneidad en el tamaño de las gotas (Santos y col., 2018). La boquilla de dos fluidos está diseñada para que el ingreso de la muestra líquida y el aire comprimido al atomizador sea por diferentes canales, saliendo juntos en la punta del mismo. Este diseño permite el aprovechamiento de la energía del gas comprimido para producir la atomización del líquido de alimentación en gotas muy finas (entre 10-100 μm). En el caso de los de disco rotatorio, la rueda giratoria de alta velocidad produce la división de la muestra líquida en gotas ($> 200 \mu\text{m}$). Esto permite que al modificar la velocidad del disco puedan obtenerse diferentes tamaños de partícula. Una desventaja es la producción de grandes cantidades de partículas finas. Por último, los atomizadores ultrasónicos, como su nombre lo indica, utilizan vibraciones ultrasónicas para producir las partículas. El tamaño de las mismas suele estar controlado por la frecuencia de vibración de la boquilla, logrando tamaños de partículas entre 1-10 μm (Garrido-Makinistian, 2020).

Como se mencionó previamente, la morfología de las partículas puede ser diferente dependiendo de las condiciones del proceso de secado y de las características del líquido de alimentación. Modificaciones en la composición y características de la solución de partida (como la viscosidad, el agregado de algún componente diferente del material encapsulante, variaciones en las propiedades de las gotas atomizadas), o en algunos parámetros relacionados con la transferencia de calor y masa (como el tiempo de formación de la “costra”, tiempo de residencia en el secadero, tamaño de la boquilla, entre otros), han generado desde típicas partículas esféricas hasta partículas con diferente rugosidad superficial, porosas o huecas (Nandiyanto y Okuyama, 2011). La forma y tamaño final de las partículas, puede generar cambios notables sobre las propiedades fisicoquímicas del polvo final obtenido, como la solubilidad, el color, y su estabilidad (Esquivel-González y col., 2015).

Secado por liofilización

La deshidratación por liofilización es considerada la metodología ideal para el secado de materiales termosensibles y aromas. Esto se debe a que se utilizan temperaturas y presiones bajas, que permiten la eliminación del agua contenida en el producto a través de su sublimación. Exceptuando los largos periodos de tiempo de secado requeridos, la liofilización es una técnica simple que ha sido utilizada para la encapsulación de aromas, drogas y sustancias hidrosolubles (Fang y Bhandari, 2010).

El proceso consiste en la transferencia simultánea de calor y masa, en el cual el calor se entrega a la materia prima previamente congelada y el vapor de agua se retira continuamente (Koroishi, 2005). En la **Figura 1.7** se presenta un esquema del equipo de liofilización. El mismo es relativamente simple,

consistiendo de una cámara de secado, un equipo de calefacción y refrigeración, una bomba de vacío y un condensador. El proceso en general consiste en 3 etapas: congelado, secado primario y secado secundario. El congelado del producto es importante para garantizar que el agua congelable sublime por completo y se alcance un nivel de humedad bajo en la muestra. Durante el secado primario, el calor se transfiere hacia el frente de hielo promoviendo la sublimación desde la superficie exterior hacia el interior del producto, y el vapor de agua se elimina atravesando el producto seco. De acuerdo a la fuente de calor disponible, la transferencia de calor se puede dar a través de la capa congelada, a través de la capa seca o a través de ambas. La última etapa del proceso o secado secundario, ocurre por desorción. Esta consiste en evaporar parte del agua no congelable, que es aquella que interactúa fuertemente con los sólidos y que no se congeló previamente. El vapor de agua sublimado es recogido en el condensador, donde se produce la formación de hielo evitando la rehidratación de la muestra. De esta forma se logra alcanzar contenidos de agua muy bajos (Ramírez Navas, 2006).

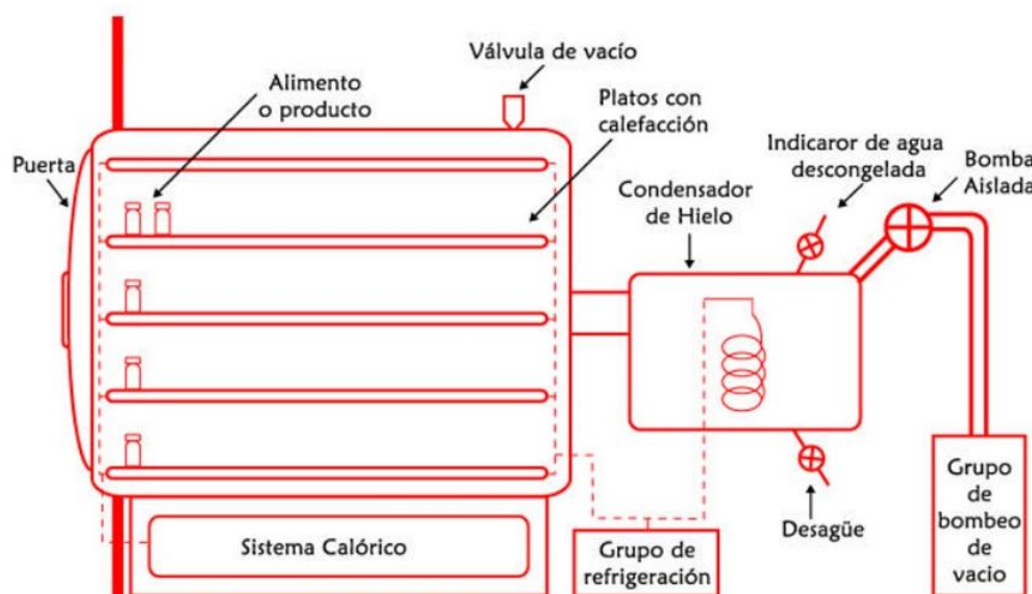


Figura 1.7. Esquema básico de un equipo de liofilización. Adaptado de Ramírez Navas (2006).

Es importante controlar la humedad final del alimento de manera de garantizar su estabilidad física (Parzanese, 2011). En general los alimentos liofilizados presentan una estructura rígida, crujiente (cuando se trata de un tejido u otro producto con estructura), conservan la forma y volumen originales, y preservan sus características nutritivas y organolépticas.

Dado que se trabaja en condiciones de temperatura y presión reducidas, no hay pérdidas significativas de sustancias volátiles o termosensibles, esto presenta una ventaja frente a otras técnicas en cuanto a la obtención de productos con alta retención de aromas, pigmentos, vitaminas, entre otros. Sin embargo, en comparación con el secado por atomización y otras técnicas de encapsulación que permiten la obtención de

un producto final particulado, la encapsulación mediante liofilización se produce sin la formación de partículas, lo cual implica la utilización de una etapa posterior de molienda para obtener finalmente un polvo. El tamaño y forma de las partículas de encapsulado dependerán del tipo de molienda que se realice, obteniendo formas y tamaños variados que repercutirán en las propiedades finales del polvo generado (Jiang y Zhang, 2013).

1.4. Alimentos e ingredientes funcionales

1.4.1. Uso de frutas finas como ingredientes en alimentos

En relación al consumo de frutas y verduras, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda consumir por lo menos 400g diarios para obtener sus beneficios nutricionales y para la salud. En 2017, 3,9 millones de muertes en todo el mundo se atribuyeron a la falta de consumo de frutas y verduras en cantidades suficientes (OMS, 2019). Se estima que la ingesta insuficiente de frutas y verduras es la causa de alrededor del 14% de las muertes por cáncer gastrointestinal en todo el mundo, del 11% de las muertes por cardiopatías isquémicas y del 9% de las muertes por accidentes cerebrovasculares (FAO, 2020).

En este contexto surge la necesidad de generar los llamados “alimentos funcionales” que, si bien su nombre no está reconocido aún en un contexto legal, se los define como aquellos alimentos o componentes que presentan actividad fisiológica o presentan algún beneficio además de su aporte nutricional, ya sea por una mejora en el estado de salud de las personas y/o por la reducción en el riesgo de padecer alguna enfermedad. Existen productos convencionales que naturalmente tienen funcionalidad específica como por ejemplo frutas y vegetales, y productos con funcionalidad enriquecida como por ejemplo alimentos que han sido adicionados con sustancias bioactivas, así como también ingredientes desarrollados para cumplir con tal fin denominados ingredientes funcionales.

Es importante mencionar que para poder considerar a un alimento como funcional se debe verificar su efecto fisiológico, por ejemplo, una disminución en la respuesta glicémica, una disminución en el estatus oxidativo, una mejora en la funcionalidad cardiovascular, una disminución en la proliferación de células cancerosas, entre otros (Alongi y Anese, 2021).

De acuerdo a Henry (2010) las vías de obtención de un producto funcional pueden ser diferentes. Se puede obtener mediante: (1) la eliminación de un componente antinutritivo o perjudicial (ej., proteína alergénica), (2) el aumento de la concentración de un componente naturalmente presente en el alimento con el objeto de mejorar la ingesta diaria, (3) el agregado de un componente ajeno al alimento pero con efectos benéficos (ej., fructanos prebióticos), (4) reemplazando un componente cuyo consumo suele ser excesivo

(ej., grasas reemplazadas por almidones modificados), (5) el aumento de la biodisponibilidad o de la estabilidad de un componente para producir efecto funcional.

De acuerdo a lo expuesto, la incorporación de frutas finas a la dieta, de forma fresca o indirectamente como ingrediente de otro producto, adquiere una relevancia indiscutible. La utilización de berries como ingredientes para formular o enriquecer distintos alimentos se ha estado estudiando a lo largo de los últimos años. Por ejemplo, Paulino y col. (2019) desarrollaron pulpas y mermeladas adicionadas con polvos de grosella negra (cassis) y rosa mosqueta, mejorando el contenido en polifenoles, antocianinas, ácido ascórbico y capacidad antioxidante de los productos finales. Campostrini y col. (2018) desarrollaron un bocadito a base de arándanos secos y nuez, endulzados con una mezcla de miel y maltitol, mientras que Archaina y col., (2019) desarrollaron un bocadito liofilizado a base de yogur y polvo de residuo de grosella negra.

Por otro lado, el uso de los residuos originados por la industria de alimentos se ha convertido en un nicho de estudio a causa de la disponibilidad en compuestos bioactivos y fibra que éstos presentan (Comunian y col., 2021). En el caso particular de residuos originados luego de la obtención de jugos o extractos de frutas finas, varios autores han estudiado la obtención y aplicación de distintos productos a partir de este tipo de matrices. Por ejemplo, Sette y col. (2021) generaron, a partir de residuos de procesos de extracción de frutos de maqui, diferentes sistemas particulados (secos y liofilizados) ricos en fibra dietaria y polifenoles, propuestos para el diseño de alimentos para celíacos o diabéticos. Sozzi y col. (2021) deshidrataron residuos de jugo de zarzamora mediante secado en lecho fluidizado, obteniendo granulados ricos en fibra y compuestos bioactivos, para ser utilizados en alimentos compuestos (ej. cereales de desayuno). Bora y col. (2019) estudiaron la formulación de diferentes productos horneados (muffin y galletita) adicionando residuo en polvo de *goji berry* con el fin de reemplazar parte de la harina de trigo que estos productos requieren. Gagneten y col. (2021) adicionaron residuo liofilizado de grosella negra a la formulación de una galletita libre de gluten, con el fin de enriquecerla en fibra y polifenoles. Inada y col. (2021), obtuvieron polvos de piel de jaboticaba que utilizaron para el desarrollo de barritas de cereal, *noodles* libres de gluten, cereal para el desayuno, galletitas, entre otros.

En cuanto al sauco, existen muy pocos estudios que incluyan la utilización de sus frutos o componentes obtenidos a partir de ellos para la formulación de ingredientes o alimentos. Sun-Waterhouse y col. (2013), da Silva y col. (2019) y Cási-Sokolińska y Walkowiak-Tomczak (2021), adicionaron jugo de sauco de forma directa en la formulación de pastas, *croissants* y yogur, respectivamente. Por otro lado, Busso Casati y col. (2019) y Baeza y col. (2020), desarrollaron polvos liofilizados de sauco a partir de pulpas comerciales, sin embargo, no han explorado la aplicación de los mismos como ingrediente o posibles jugos en polvo.

Por otro lado, el desarrollo tecnológico alcanzado en Chile en lo que respecta a productos a partir de berries, particularmente silvestres, ha permitido generar desde jugos concentrados o mezclas de jugos de

frutas o verduras con berries, bebidas alcohólicas, vinagres, láminas de frutas, salsas, productos deshidratados utilizando secado convencional, productos obtenidos por deshidratación osmótica combinada con impregnación, productos liofilizados, entre otros. Sin embargo, como ya se ha comentado previamente, la situación en Argentina es muy diferente ya que el mercado se centra en la distribución de fruta fresca y congelada, pudiendo encontrar algunos pocos productos deshidratados: polvos liofilizados (ej. liofilizado de maqui) o bien frutas enteras, secadas por convección o liofilizadas, principalmente frutilla y arándano (**Figura 1.8**). A pesar de ello la preferencia por productos alimentarios antioxidantes y de bajas calorías es cada vez mayor y abre un panorama importante en la demanda de berries, particularmente los silvestres por ser una fuente importante de compuestos bioactivos y pigmentos de colores atractivos. En este sentido el desarrollo de nuevos ingredientes y nuevos procesos para el diseño de alimentos potencialmente funcionales a partir de estos frutos constituye un segmento a seguir explorando en nuestro país.



Figura 1.8. Algunos productos deshidratados a base de frutas finas disponibles en Argentina.

1.4.2. Potencial de procesos de “Impregnación de matrices húmedas” para el desarrollo de alimentos funcionales

En los últimos años, la aplicación de la metodología de impregnación a vacío ha sido propuesta como una manera útil de introducir líquidos en la estructura porosa de algunos alimentos (Fito y col., 1996; Chiralt y col., 1999). De esta manera, tanto la composición como las propiedades físicas y químicas del producto pueden ser modificadas para mejorar alguna característica del alimento (Fito y Chiralt, 2000; Fito y col., 2000).

Los procesos de impregnación por inmersión realizados a presión atmosférica (IA), en condiciones de vacío (IV) o a través de una combinación de ambos procesos (período a vacío seguido de largos períodos a presión atmosférica, IVA), pueden ser empleados para introducir un componente fisiológicamente activo en alimentos frescos como por ejemplo las frutas (Alzamora y col., 2005; Fito y col., 2001; Salvatori y col., 2007). Es importante resaltar que estos procesos pueden realizarse a temperatura ambiente o cercanas, lo que

minimiza el deterioro tanto de la estructura como de compuestos lábiles al calor, permitiendo así obtener un alimento potencialmente funcional con características de frescura similares a los materiales de partida.

Basándose en la estructura porosa de muchos alimentos, Salvatori y col. (2007, 2011) han explicado el fenómeno que ocurre durante la operación de impregnación a vacío (IV) a través del denominado mecanismo hidrodinámico (HDM). Este mecanismo ha sido descrito como un fenómeno de transferencia de materia que ocurre en operaciones sólido-líquido y es especialmente importante cuando se trabaja en condiciones de vacío. Según estos autores lo que ocurre en el producto cuando se lo sumerge en un líquido y se lo somete a presiones subatmosféricas es que el gas ocluido en los poros sufre una expansión para equilibrarse con la presión impuesta al sistema, lo que implica por una parte, un nivel de desgasificación de la estructura porosa del alimento, función de la presión aplicada y, por otra, una penetración del líquido por capilaridad una vez alcanzado el equilibrio de presiones del sistema. Posteriormente cuando se instaura la presión atmosférica, se crea un nuevo gradiente de presiones que actúa como fuerza impulsora y hace que los espacios intercelulares o poros se llenen parcialmente de líquido. La cantidad de líquido que impregne el sistema dependerá del nivel de desgasificación y por lo tanto, de la presión de trabajo. Esta penetración de líquido puede ser reversible y está controlada por la compresión o expansión del gas ocluido en los espacios intercelulares. En la **Figura 1.9** se presenta un esquema del proceso, simplificando el poro del alimento y asimilándolo a una geometría cilíndrica.

Dentro de los factores que afectan al proceso de impregnación, la naturaleza del tejido a impregnar juega un papel muy importante. Metodologías como el escaldado, que normalmente es llevado a cabo para prevenir la formación de aromas y sabores desagradables y cambios de color debido a reacciones enzimáticas, ha sido propuesto también como pretratamiento para mejorar el proceso de enriquecimiento de matrices vegetales (Nieto y col., 2001; Giovanelli y col., 2012).

La incorporación de ingredientes o compuestos con potencial funcional a un alimento ha sido aplicada con éxito para producir alimentos enriquecidos, particularmente frutas y vegetales capaces de soportar los cambios de presión durante los tratamientos. Por ejemplo, Ortiz y col. (2003) enriquecieron champiñones con soluciones de calcio, obteniendo resultados satisfactorios tanto en la concentración del compuesto impregnado como la textura final del producto. Salvatori y col. (2007) y González-Fesler y col. (2008) trabajaron con manzanas sometidas a un pretratamiento de escaldado, evaluando diferentes tiempos y condiciones de impregnación (con vacío y presión atmosférica) con soluciones de calcio. En estos trabajos, se estudió el efecto de los tratamientos sobre la estructura del tejido de manzana y la cinética de impregnación y secado del producto final. Por otro lado, Indaco (2005) enriqueció rodajas de papa con soluciones de calcio, utilizando impregnación a presión atmosférica a diferentes temperaturas, y evaluando su efecto sobre las propiedades reológicas y mecánicas.

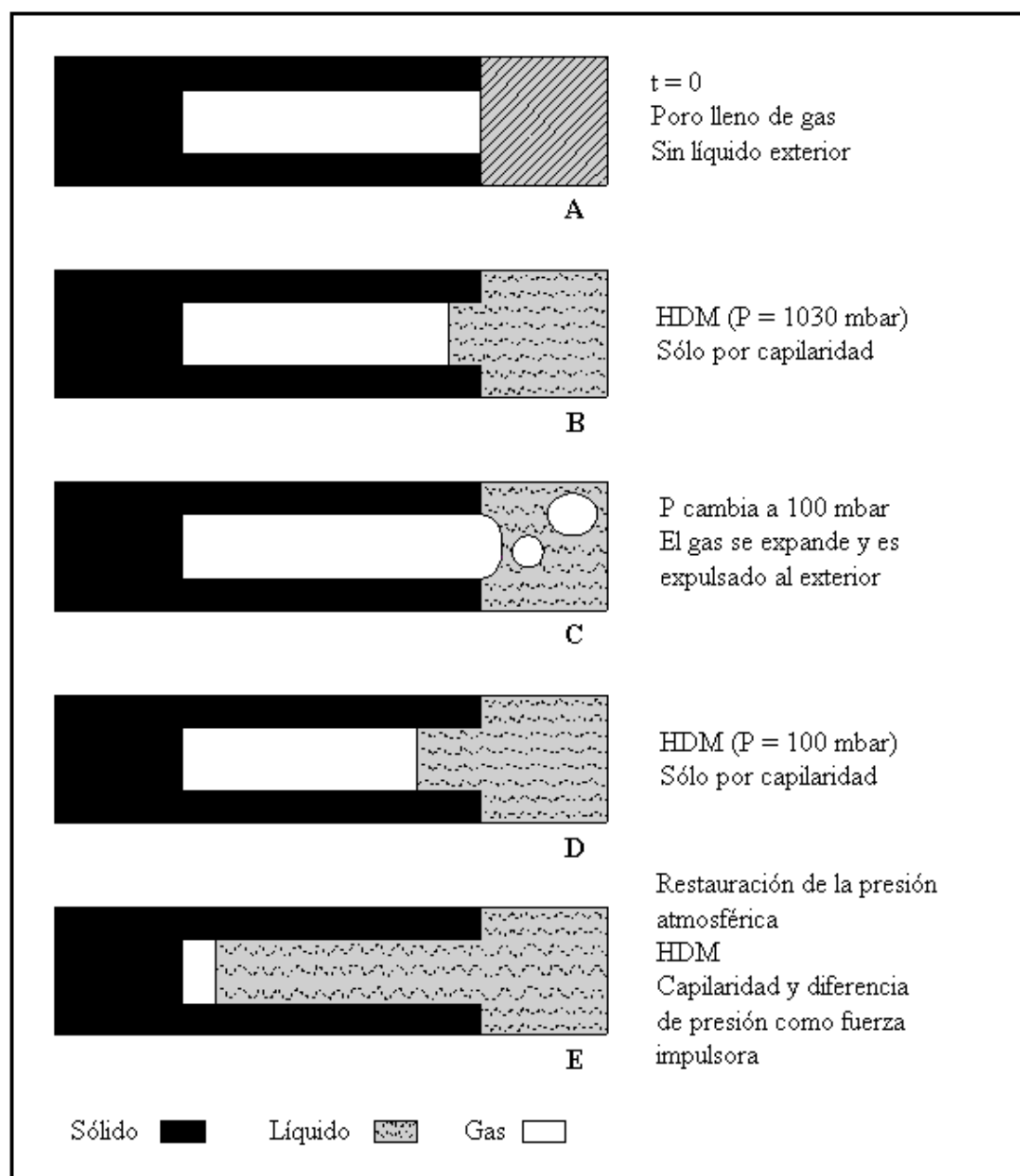


Figura 1.9. Mecanismo de transferencia de materia durante la impregnación a vacío (IV) (Fito, 1994).

En cuanto a la posibilidad de enriquecer con polifenoles u otros compuestos bioactivos, esta técnica combinada o no con otras tecnologías ha sido ampliamente utilizada para enriquecer diferentes matrices, generando productos secos o fritos listos para el consumo (ready-to-eat food). Por ejemplo, Castagnini y col. (2015), obtuvieron mediante IV y secado convectivo, snacks de manzana enriquecidos con jugo de arándanos; Moreira y Almohaimeed (2018) generaron chips de papa impregnadas con polifenoles de remolacha, mientras que Abalos y col. (2020) obtuvieron un snack de batata enriquecido con polifenoles mediante IV. Por último, la obtención de snacks frescos listos para consumo, fue estudiada por Yilmaz y Bilek (2018) que adicionaron calcio y polifenoles de zanahoria morada a manzanas, mediante IV acoplada a

ultrasonido. A su vez, Guerra-Valle y col. (2018) combinaron deshidratación osmótica con pulsos de vacío para enriquecer manzanas con bioactivos de jugo concentrado de granada.

En síntesis, estas tecnologías han demostrado ser efectivas para la introducción de diferentes compuestos de interés en distintas matrices vegetales, ya que la cantidad que puede incorporarse en los tejidos puede ser importante, permitiendo así aumentar la ingesta de un determinado nutriente o fitoquímico.

1.5. Estabilidad de productos deshidratados

Durante el almacenamiento de los productos deshidratados es necesario evitar las condiciones que puedan inducir cambios físicos y/o químicos que alteren sus propiedades. En este sentido, el control de la temperatura y la humedad relativa del ambiente durante el almacenamiento es de suma importancia dado que estas variables influyen en la adsorción de agua por parte del producto deshidratado, las reacciones de deterioro y la estabilidad física. Por otra parte, cuanto menos higroscópicos sean los materiales se espera que sean más estables. Por estas razones, es de vital importancia evaluar la estabilidad de los productos deshidratados obtenidos.

La interacción con el agua del medio ambiente puede incrementar la actividad acuosa (a_w) del producto, y así generar condiciones más desfavorables para su estabilidad. El concepto de actividad acuosa fue introducido para diferenciar la intensidad con la que el agua se asocia a los componentes no acuosos de los productos alimenticios, distinguiendo entre agua fuertemente asociada y agua “libre” (Fennema, 2001). El agua que interacciona fuertemente con la matriz alimenticia no se encuentra disponible para participar en fenómenos de deterioro del producto, tales como crecimiento de microorganismos, reacciones de pardeamiento y químicas de hidrólisis, entre otros. En cambio, el agua débilmente asociada sí participa en dichos procesos. La definición rigurosa del concepto de actividad proviene de la termodinámica y refiere a un cociente de fugacidades. Para el caso del agua y considerando bajas presiones para la fase gas, las fugacidades pueden reemplazarse por presiones de vapor.

Por lo tanto, la actividad acuosa queda definida por la **ecuación 1.1**:

$$a_w = \frac{p}{p_0} \quad (1.1)$$

donde p es la presión de vapor del agua en la muestra y p_0 es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.

Suponiendo que se alcanza el equilibrio respecto a la interacción del agua entre el sistema y el entorno, es posible relacionar la actividad acuosa del sistema con la humedad relativa porcentual del entorno (humedad relativa de equilibrio), tal como lo expresa la **ecuación 1.2**.

$$HR\% = a_w \cdot 100 \quad (1.2)$$

La isoterma de sorción de agua permite analizar la relación entre la humedad relativa del entorno y la humedad adsorbida/desorbida por el sistema, por lo tanto, es una herramienta útil para predecir la estabilidad física y química del material evaluado. El tipo de isoterma está determinado por diversos factores, como por ejemplo la composición y la estructura física de la muestra, los pretratamientos aplicados a la misma y la temperatura a la cual se realiza el ensayo.

En materiales alimenticios las isotermas de sorción de agua presentan habitualmente una forma que está basada en su composición química y generalmente corresponde a una S invertida. Brunauer y col. (1940) clasificaron las isotermas de sorción en 5 tipos basados en la adsorción por las fuerzas de van der Waals de gases no polares adsorbidos en diversos sustratos sólidos no porosos, siendo los tipos I, II y III (**Figura 1.10**) los más observados en los productos alimenticios.

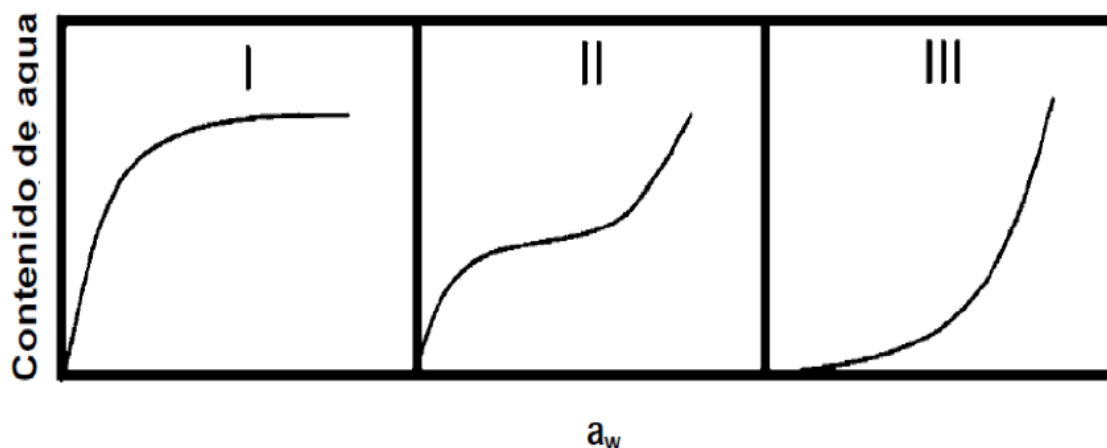


Figura 1.10. Tipos de isotermas de sorción de agua más frecuentes en alimentos (Brunauer y col., 1940).

Los materiales amorfos pueden experimentar una transición de fase desde un estado vítreo hacia un estado líquido sobreenfriado ("gomoso"). Se trata de estados que no están en equilibrio termodinámico, sino que pueden alcanzar estados de equilibrio metaestables. El cambio de estado vítreo a líquido sobreenfriado se conoce como transición vítrea. La temperatura de transición vítrea (T_g), asociada a dicho cambio de estado, es característica de cada material. Desde el punto de vista físico, el incremento de a_w en un producto deshidratado generará una disminución de su T_g . Por lo tanto, resulta relevante el estudio de la

interrelación de T_g con el contenido de agua dado que dicha propiedad está relacionada con posibles transformaciones estructurales del producto a lo largo del almacenamiento, como colapso estructural, aumento de la pegajosidad, cristalización, etc. (Roos, 2010). Por otro lado, a mayor actividad de agua resulta más factible que se produzcan reacciones químicas de deterioro dado que se incrementa la movilidad molecular (es decir la movilidad de los reactivos), fenómeno que puede afectar la velocidad de reacción (Fennema, 2001).

Al igual que la a_w , la temperatura tiene un efecto notable sobre la estabilidad de los productos de base alimenticia. Esta variable incide directamente en la velocidad de las reacciones de deterioro (modificando la constante cinética) y en la estabilidad física. En el caso particular de productos deshidratados elaborados a partir de frutos rojos, cobra especial interés el estudio de la estabilidad de los polifenoles y de los compuestos antociánicos. Esto se debe a que dichos fitoquímicos son los principales responsables de las propiedades antioxidantes y del color característico de dichos frutos. En este sentido, se han llevado adelante trabajos de investigación para analizar los efectos de la temperatura y la actividad acuosa sobre la estabilidad de los polifenoles en productos dehidratados a lo largo de procesos de almacenamiento (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011; Fang y Bhandari, 2011; González y col., 2019).

1.6. Bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes

Los efectos beneficiosos de los nutrientes y/o compuestos bioactivos en la salud de las personas están condicionados a su bioaccesibilidad y biodisponibilidad luego del proceso digestivo. La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un componente alimentario presente en el intestino, como consecuencia de su liberación por acción de enzimas digestivas y la flora intestinal, y por lo tanto se encuentra potencialmente disponible para atravesar la barrera intestinal (Saura-Calixto y col., 2007).

Idealmente, el estudio de la digestibilidad de un alimento debería realizarse *in vivo* en humanos. Sin embargo, los estudios clínicos que involucran personas son un gran desafío al presentar dificultades técnicas y financieras. Debido a esto, metodologías *in vitro* que simulan el proceso de digestión en el tracto gastrointestinal (TGI) han sido ampliamente utilizadas en la última década. En comparación con los estudios clínicos, estas técnicas han sido más efectivas, económicas y no conllevan restricciones éticas (Li y col., 2020).

Varios protocolos que simulan el proceso de digestión han sido propuestos, impidiendo la posibilidad de comparar resultados entre diferentes investigaciones. Esto se debe a la cantidad de factores involucrados durante la digestión, como la variedad de enzimas digestivas y su origen, el pH, la composición de las soluciones que simulan la fuerza iónica y el contenido de minerales de los fluidos digestivos, el tiempo de digestión, entre otros. La técnica descrita por Minekus y col. (2014), que involucra la simulación de las fases

oral, gástrica y del intestino delgado, ha demostrado ser reproducible por varios autores (Bae y col., 2017; Archaina y col., 2019; Thomas-Valdés y col., 2018; Perez-Moral y col., 2018).

Estudios realizados por Saura-Calixto y col. (2007) sobre la ingesta de polifenoles resultantes de la dieta Mediterránea de españoles, han demostrado que el 48% de estos compuestos quedan bioaccesibles en el intestino delgado, mientras que un 42% permanece en el intestino grueso. Teniendo en cuenta esto, es importante también analizar la interacción entre las células del intestino y los alimentos, donde otras técnicas *in vitro* han sido exitosamente desarrolladas. Las células Caco-2 forman parte del modelo más usado para la determinación del traspaso de componentes a través de la barrera intestinal, por lo cual la medición del contenido de compuestos como polifenoles o su actividad antioxidante, luego de atravesar la membrana de estas células, se torna una adecuada estrategia para predecir la biodisponibilidad de polifenoles en humanos (Ding y col., 2021).

1.7. Desarrollo de productos basado en la percepción del consumidor

A causa de la demanda de alimentos con carácter funcional, el desarrollo de nuevos productos se ha vuelto un gran desafío ante la continua innovación y amplia oferta en el mercado. Esto convierte a la aceptación por parte de los consumidores en un factor fundamental y de alta prioridad en la investigación y manufactura de alimentos novedosos (Ares y col., 2008).

Por esta razón, los estudios sensoriales con consumidores han demostrado la capacidad de generar evaluaciones precisas y confiables cuando se requiere una descripción del producto. Incluso, varios estudios han demostrado que la caracterización sensorial basada en el consumidor es capaz de proveer resultados similares a los obtenidos mediante un panel entrenado (Ares y Varela, 2018). Dentro de los estudios con consumidores existen técnicas proyectivas capaces de recoger información relevante para las primeras etapas en el lanzamiento de un nuevo producto. Estas técnicas cualitativas hacen posible obtener información profunda en relación al comportamiento de los consumidores, permitiendo así identificar oportunidades de mercado, generar nuevas ideas, explorar nuevos conceptos, etc., antes de realizar un análisis sensorial cuantitativo (Lawless y Heymann, 2010).

Las metodologías proyectivas se subdividen dependiendo del tipo de respuesta que se requiere, como técnicas de asociación, construcción, terminación, orden de elección y de expresión. Dentro de las primeras, la más utilizada es la denominada “técnica de asociación de palabras” (*Word association task*, en inglés), la cual se basa en la introducción de un estímulo a una persona, el cual activa automáticamente los primeros pensamientos en relación a un producto. En el ámbito de los alimentos, estos pensamientos se consideran los mejores descriptores del comportamiento del consumidor en relación a ese estímulo. El ensayo consiste en pedirle al consumidor que escriba las primeras palabras, sensaciones y pensamientos que le surjan, luego

de mostrarle una frase, palabra o imagen relacionada con el producto en cuestión (Gambaro, 2018). La principal ventaja de esta técnica es la espontaneidad de los resultados en comparación con una entrevista o cuestionario; sin embargo, la misma es criticada por la subjetividad de los grupos de consumidores elegidos y la complejidad del análisis de los datos. Se han reportado varios estudios utilizando la técnica de asociación de palabras para explorar la percepción de numerosos productos como yogur (Ares y col., 2008), alimentos convencionales (Guerrero y col., 2010), chocolates (Gámbaro & Ellis, 2012), mermeladas (Piqueras-Fiszman y col., 2013), ensaladas listas para el consumo (Vidal y col., 2013), quesos (Soares y col., 2017), entre otros.

Sumado al desarrollo e implementación de estas nuevas técnicas, se encuentra la evolución mundial en conectividad. La facilidad de conexión, intercambio y procesado de información que generó la existencia de internet y la explotación de las redes sociales, se ha vuelto una herramienta vital para crear nuevas formas de negocio y de interacción entre empresas y consumidores. Las redes sociales se han vuelto “la voz del consumidor” facilitando el intercambio entre éstos y permitiéndoles expresar y compartir libremente sus opiniones y experiencias. La utilización de encuestas y revisiones online, ha permitido estimar las preferencias de consumidores, siendo útil tanto para el desarrollo como para la mejora de productos (Vidal y col., 2018).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general de la presente Tesis es darle valor agregado a una fruta fina que crece de forma silvestre en Argentina (el sauco). Este fruto, si bien presenta un alto potencial antioxidante, ha sido poco explotado en nuestro país para el desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la materia prima e identificar los aspectos más relevantes desde el punto de vista de las propiedades a aprovechar y los posibles procesos a aplicar.
- Optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos (polifenoles y antocianinas) utilizando tecnologías amigables con el medio ambiente.
- Obtener ingredientes líquidos y en polvo, ricos en compuestos fenólicos preservando su capacidad antioxidante y propiedades físicas mediante diferentes técnicas de secado.
- Estudiar el comportamiento del ingrediente en polvo óptimo a lo largo de su almacenamiento y establecer pautas para una buena conservación del producto.
- Analizar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos del ingrediente en polvo óptimo luego del proceso de digestión *in vitro* y del transporte trans-epitelial.
- Generar un snack de manzana enriquecido con compuestos bioactivos del extracto de sauco. Estudiar sus propiedades físicas, bioactivas y sensoriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Materia prima

Se utilizaron frutos silvestres de sauco (*Sambucus nigra* L.) recolectados en la zona de El Bolsón (Río Negro, Argentina), comercializados por la chacra La Piedad (Plottier, Neuquén, Argentina). Se recolectaron frutos totalmente maduros que fueron inmediatamente congelados por la tecnología IQF (Individual Quick Freezing) en un túnel de convección a -48°C con un flujo de aire de 1,5 m/s. Finalmente los frutos se almacenaron a -22°C hasta su posterior uso.

Para el estudio de aplicación del ingrediente de sauco, se elaboró un snack utilizando manzana verde (variedad Granny Smith), obtenida en un galpón de empaque de la zona del Alto Valle de Río Negro (Tres Ases S.A., Cipolletti, Río Negro).

3.1.2. Aditivos y reactivos

Para el estudio de extracción enzimática se utilizó la enzima Pectinex® Ultracolor (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), con actividad pectin-liasa. Como adyuvante en el proceso de liofilización para la formulación del ingrediente de sauco se utilizó maltodextrina (MD) DE 12 (Givaudan S.A., Argentina).

En las determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC se utilizaron los solventes H₂SO₄, agua Milli-Q y acetonitrilo (ACN), y los estándares D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa, ácidos L-málico y L-ascórbico adquiridos en Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania); la sacarosa y los ácidos succínico y L-(+)-tartárico fueron adquiridos en Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), los ácidos cítrico y acético en Reactivos Cicarelli S.A (Santa Fe, Argentina) y el ácido L-láctico en Megazyme Ltd. (Bray, Irlanda). Para la determinación de compuestos fenólicos, se utilizó metanol y ácido fosfórico (85%) para la fase móvil, y los estándares cloruro de cianidina-3-O-glucósido, delfinidina-3-O-glucósido, (-) epicatequina y resveratrol adquiridos en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, Estados Unidos); el ácido elágico provenía de la empresa LGC Standards (Teddington, Reino Unido) y los ácidos gálico, clorogénico, p-cumárico, ferúlico y cafeico, la catequina, la quercetina y la quercetina-3-rutinósido (rutina) en Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania). Todos los solventes fueron grado HPLC y fueron adquiridos en Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina).

Para el estudio de digestión *in vitro* se utilizaron soluciones de las siguientes enzimas adquiridas en Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania): α -amilasa (A6255, actividad= 1500 U/ml), pepsina (P7000, actividad= 25000 U/ml) y pancreatina (P7545, actividad= 800 U/ml).

3.2. Obtención de ingredientes ricos en compuestos bioactivos

3.2.1. Métodos de extracción de compuestos bioactivos

3.2.1.1. Extracción asistida por ultrasonido

3.2.1.1.1. Equipamiento y metodología de extracción

El proceso de extracción, representado en el esquema correspondiente a la **Figura 3.1**, se llevó a cabo utilizando un equipo de ultrasonido de escala laboratorio, modelo UP100H (Teltow, Alemania). Inicialmente se pesaron 50g de fruta, que fueron descongelados en un baño de agua a 40-45°C y luego escaldados con vapor de agua ($T > 98^\circ\text{C}$) durante 1 min. A continuación, se agregó agua destilada en una relación 2:1 (agua:fruta) y se homogeneizó la mezcla con un triturador durante 60 s. El triturado se dejó macerar en hielo durante 10 min y se dividió en tres fracciones, para luego proceder a la aplicación de ultrasonido. Finalizado el tratamiento, las muestras se centrifugaron a 4°C y 9000 rpm durante 20 min, separando el sobrenadante y pesando el residuo remanente (Ciclo 1). A este último se le agregó agua destilada en una relación 2:1 (agua:residuo), y se aplicó nuevamente el tratamiento correspondiente a cada muestra (Ciclo 2). El procedimiento sobre el residuo se repitió una vez más (Ciclo 3), teniendo un total de tres ciclos de extracción y tres extractos acuosos para cada tipo de muestra.

3.2.1.1.2. Diseño y optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido

Se realizó una optimización del proceso aplicando extracciones sucesivas de una misma muestra con el objeto de maximizar el rendimiento de extracción y el contenido de compuestos bioactivos en los extractos finales. En la **Tabla 3.1** se muestran los tratamientos aplicados, los ciclos de extracción y las distintas muestras obtenidas. Se evaluaron dos tiempos de aplicación de ultrasonido (5 y 10 min) junto a una muestra control (UC), que se sometió al mismo proceso de extracción sin aplicación ultrasónica. El proceso se llevó a cabo a 30 kHz de frecuencia y con una amplitud (A) de 100%, manteniendo las muestras en un baño de hielo durante el tiempo correspondiente de modo de controlar un posible aumento de temperatura por efecto del tratamiento. El proceso completo de extracción se realizó por duplicado.

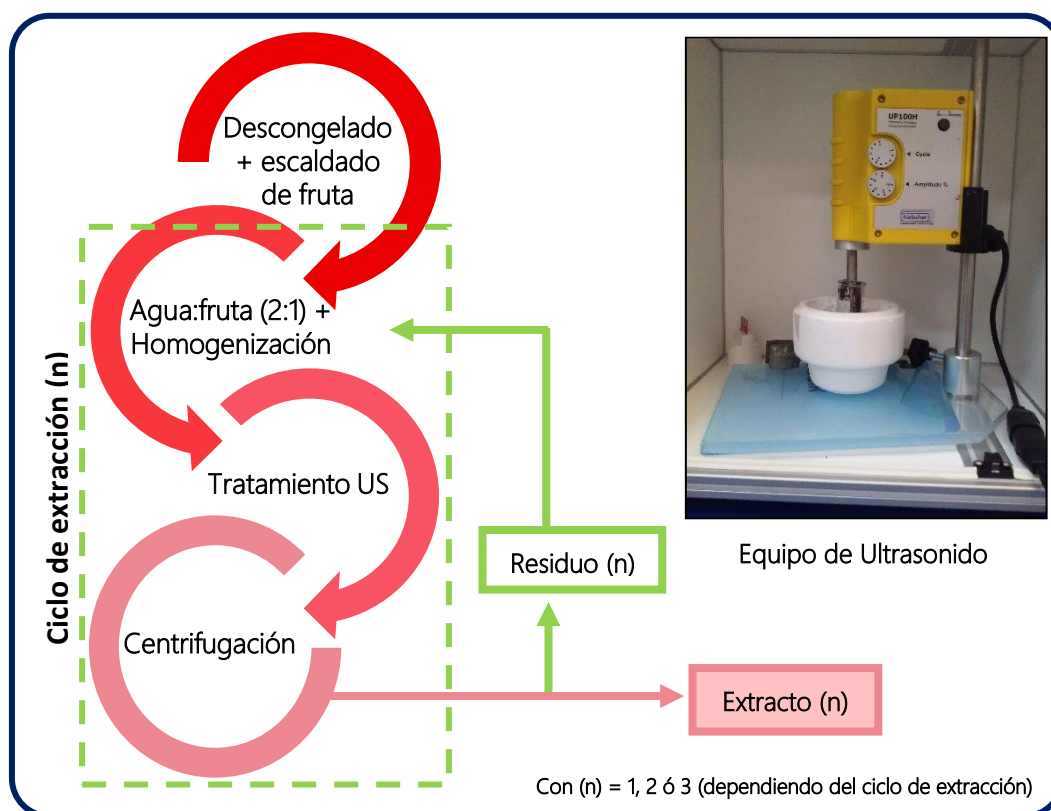


Figura 3.1. Esquema del procedimiento correspondiente a la extracción asistida por ultrasonido (US).

El rendimiento de extracción (RE) se calculó teniendo en cuenta el peso de fruta triturada inicial y la cantidad de extracto obtenido después de cada ciclo de extracción y al final del proceso, de acuerdo a la **ecuación 3.1**. A su vez, se calculó el rendimiento de extracción de polifenoles (RP) y antocianinas (RA) de acuerdo a la **ecuación 3.2**.

$$RE (\%) = \left(\frac{\text{masa de extracto}}{\text{masa de fruta triturada}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

$$RP/RA (\%) = \left(\frac{\text{mg polifenoles/antocianinas en sobrenadante}}{\text{mg polifenoles/antocianinas en fruta triturada}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

La selección de la condición óptima se basó en el análisis de las siguientes variables de respuesta: contenido de polifenoles totales (CPT), contenido de antocianinas monoméricas totales (ACY) y actividad antioxidante (AA). Elegido el tratamiento que maximizó la extracción de compuestos bioactivos, se repitió el procedimiento y se juntaron los sobrenadantes recogidos en cada ciclo de extracción, obteniendo así un único extracto óptimo con ultrasonido (UO).

Tabla 3.1. Diseño utilizado para la extracción de compuestos bioactivos por ultrasonido (30 kHz, 100% A).

Muestra	Ciclo	Tiempo de tratamiento
UC -1	1	0 min
UC- 2	2	
UC- 3	3	
U5-1	1	5 min
U5-2	2	
U5-3	3	
U10-1	1	10 min
U10-2	2	
U10-3	3	

3.2.1.2. Extracción enzimática

3.2.1.2.1. Metodología de extracción

El procedimiento de extracción empleado se presenta en la **Figura 3.2**. Aproximadamente 50g de fruta fueron descongelados a 40°C durante 10 min, y luego triturados con una trituradora durante 60 s a máxima potencia. Se preparó la solución de enzima, que fue adicionada de acuerdo al peso de fruta inicial y las condiciones de estudio, llevando a cabo luego la maceración durante 1 h a la temperatura correspondiente según el diseño experimental (sección 3.2.1.2.2). Finalizado el tiempo, se inactivó la enzima colocando la muestra en un baño a 80°C durante 1 min, y luego se trasladó rápidamente la muestra a un baño de agua fría para evitar el deterioro. Luego de alcanzar una temperatura de 30-35°C, se realizó una centrifugación a 4°C y 9000 rpm durante 20 min. La fracción líquida obtenida se denominó extracto enzimático (EE). De la misma manera, se preparó un jugo control (J) sin someterlo a temperatura ni tratamiento enzimático. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Luego de cada proceso de extracción, se calculó el rendimiento RE de acuerdo a la **ecuación 3.1**.

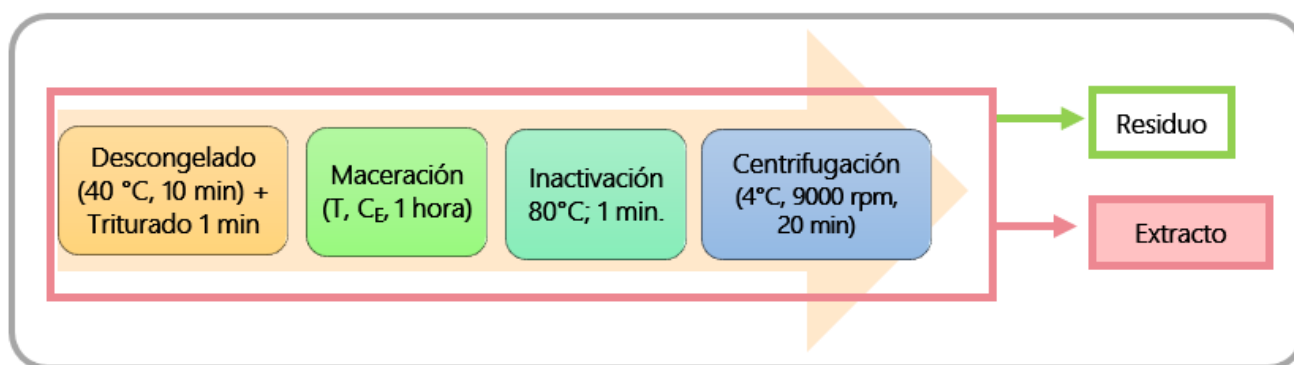


Figura 3.2. Diagrama del proceso de extracción enzimática utilizado para la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos a partir de frutos de sauco. T: temperatura; C_E: concentración de enzima.

3.2.1.2.2. Diseño y optimización del proceso de extracción enzimática

Con el fin de encontrar la combinación óptima de temperatura y concentración enzimática que genere un extracto de sauco (EO) con un alto contenido de polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante, se utilizó un diseño experimental multifactorial 3^2 con interacción. El estudio se analizó mediante la obtención de superficies de respuesta y se optimizó aplicando la función de deseabilidad (D).

La metodología de superficie de respuesta se basa en un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas, que se utiliza con el objetivo de encontrar una ecuación polinómica que ajuste los datos experimentales y facilite la predicción del comportamiento de las variables de respuesta, permitiendo a su vez, obtener los niveles de cada factor que garantizan la optimización de las variables analizadas. Cuando es necesario mejorar un proceso que tenga en cuenta más de una variable, incluso de diferente magnitud, la función de deseabilidad “D” (también conocida como como función de Derringer), es la herramienta más importante y más utilizada al momento de optimizar procedimientos analíticos. La metodología se basa inicialmente en la construcción de funciones de deseabilidad para cada respuesta individual estudiada, obteniendo una escala adimensional para cada una (d_i). Las escalas varían entre $d=0$ para una respuesta completamente indeseada y $d=1$, para una respuesta totalmente deseada, por encima de la cual cualquier mejora en el proceso carece de importancia. La transformación a escalas adimensionales permite entonces combinar los resultados obtenidos para variables de distinta magnitud. Finalmente se ponderan los valores de cada función d_i para maximizar (o minimizar) los valores correspondientes a las variables en estudio, obteniendo la función de deseabilidad D global (Bezerra y col., 2008).

En este estudio, se consideraron dos factores con tres niveles: a) temperatura (T) a 40, 50 y 60°C; b) concentración enzimática (C_E) a 80, 120 y 160 ppm. El diseño incluyó nuevamente tres variables de respuesta (CPT, ACY y AA), realizando el análisis y ajuste de los datos experimentales, mediante un modelo polinomial de segundo orden (**ecuación 3.3**):

$$y = a + b T + c C_E + d T * C_E + e T^2 + f C_E^2 \quad (3.3)$$

donde:

a, b, c, d, e y f son los parámetros del modelo.

Cada extracción se realizó por duplicado y se optimizó el proceso utilizando las herramientas previamente mencionadas. Definidas las condiciones óptimas de T y C_E , se repitió el procedimiento para obtener el extracto enzimático óptimo (EO).

3.2.2. Estudio de citotoxicidad del extracto óptimo

A raíz de la posible existencia de compuestos cianogénicos en frutos de sauco, se estudió la citotoxicidad del extracto óptimo seleccionado a nivel celular según Soria y col. (2008).

Cultivo celular

Se empleó la línea celular VERO de epitelio renal de mono verde africano (Colección Europea de Cultivos Celulares). Las células fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 10 g + NaHCO₃ 3,75 g + HEPES 4,76 g + H₂O Mili-Q csp 1 L) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina G sódica y 40 µg/ml de sulfato de gentamicina. Las células fueron mantenidas en estufa a una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Los subcultivos fueron obtenidos por tratamiento suave con tripsina al 0,25% sembrando 105 células/ml, para tratarlas 48 horas después.

Bioensayos con el modelo in vitro

La citotoxicidad de extractos fue determinada por colorimetría mediante la tinción con cristal violeta de células vivas bajo distintas concentraciones de extracto. Se eligió este método ya que no es interferido por peróxidos.

Para la determinación se sembraron 6000 células por pozo en placas multi-well y fueron cultivadas en estufa por 24 h. Luego, se les removió el medio y se agregó medio fresco junto con la muestra en un rango de concentraciones entre 140 - 7000 µg sólidos/ml de medio, y de manera paralela se usó un control (medio de cultivo), siendo incubados durante 2 horas.

Luego de los tratamientos, las células fueron coloreadas con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol al 50% durante 15 min. Para eliminar el excedente del colorante, cada placa fue lavada tres veces con metanol al 50% y secada. Luego se agregaron 50 µl de una solución de citrato de sodio 0,1 M (pH: 5,4, en metanol al 20%). Dado que las células viables coloreadas se mantienen adheridas a la placa, la viabilidad celular se definió como porcentaje de densidad óptica respecto al control (100%) en cada pozo a 630 nm, con un lector de microplacas ELISA Rayto RT-2100C (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd., China).

3.2.3. Métodos de estabilización del extracto óptimo

En una primera etapa se realizó una comparación entre los procesos de secado por atomización y liofilización aplicados al extracto óptimo obtenido por ultrasonidos (UO), definiendo una concentración de

adyuvante (MD) que condujera a un proceso viable en ambos casos. De acuerdo a estudios preliminares se determinó que una concentración final de 20% (m/m) de sólidos totales en el extracto (MD agregada + sólidos solubles iniciales del extracto) permitía obtener un polvo de buenas propiedades físicas utilizando tanto liofilización como secado por atomización.

En una segunda etapa de la tesis, basada en los resultados obtenidos con distintos tipos de extracción de bioactivos y distintos procesos de secado, se decidió continuar el estudio utilizando EO como extracto óptimo y liofilización como técnica de estabilización de extractos. Se planteó entonces un estudio de optimización del proceso de liofilización de manera de hallar la cantidad mínima de adyuvante que permitiera obtener un polvo con la máxima concentración de compuestos bioactivos, manteniendo al mismo tiempo propiedades físicas adecuadas para su posible comercialización. El estudio de formulación se analizó teniendo en cuenta la humedad del polvo (sección 3.5.1) y la temperatura de transición vítrea (T_g , sección 3.5.5) a distintas concentraciones de MD (0; 5; 10; 15 y 20 % m/m).

Los procesos de secado utilizados en cada etapa de trabajo se describen a continuación.

3.2.3.1. Secado por atomización

El extracto UO fue deshidratado por secado por atomización a una temperatura de aire de entrada de $170 \pm 3^\circ\text{C}$, 8 ml/min de flujo de alimentación, 3,2 bar de presión de aire, y 1,5 mm de diámetro de boquilla. El equipo utilizado fue un secadero Mini Spray Büchi B290 (Flawil, Suiza) escala laboratorio. El polvo obtenido se almacenó en bolsas cerradas herméticamente (barrera a la humedad) y se conservó a -18°C para futuras determinaciones.

3.2.3.2. Secado por liofilización

Los extractos formulados UO y EO que se sometieron al proceso de liofilización, se distribuyeron en viales de 3 ml y se congelaron a -70°C en ultrafreezer. Luego se secaron por 48 horas (temperatura de placa= -48°C ; presión de la cámara= 0,04 mbar) utilizando un equipo Beta 2-8 LD plus (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Finalmente, se almacenaron en sus correspondientes viales cerrados herméticamente a -18°C para futuras determinaciones.

3.3. Estudio de estabilidad del ingrediente en polvo seleccionado

De acuerdo a la evaluación integral de propiedades físicas, contenido de bioactivos y actividad antioxidante, se seleccionó el EO liofilizado como el mejor ingrediente de sauco. Se repitió entonces el proceso de extracción enzimática en las condiciones operativas óptimas, se agregó la concentración de MD

elegida, y se liofilizó la formulación realizando un triturado posterior, para obtener así un ingrediente de sauco liofilizado. Se continuó entonces con estudios de estabilidad de dicho ingrediente, haciendo hincapié en las propiedades bioactivas y de color con el objeto de evaluar su potencial como ingrediente funcional o colorante natural.

Se aplicó un protocolo de vida útil que consistió en evaluar distintas propiedades del material a lo largo del tiempo, almacenado a diferentes temperaturas (6 ± 2 ; 20 ± 1 y $40 \pm 1^\circ\text{C}$). Se colocó 1g de polvo en viales de vidrio con tapa hermética, los cuales se almacenaron durante 126 días a las temperaturas correspondientes. Se retiraron muestras cada 21 días por triplicado, para analizar el color superficial, el color polimérico y el contenido de polifenoles y antocianinas monoméricas (ver secciones 3.5.8 y 3.5.9).

3.4. Desarrollo de un producto tipo snack de fruta potencialmente funcional empleando un ingrediente de sauco

Se desarrolló un snack frutal liofilizado formulado a partir de rodajas de manzana enriquecidas en compuestos de sauco mediante procesos de impregnación. Esta etapa de trabajo se basó en el estudio de distintos procesos de impregnación para la introducción de polifenoles y antocianinas en el tejido de manzana y la posterior caracterización fisicoquímica y de potencial bioactivo de los snacks liofilizados obtenidos para la selección final de un posible prototipo a lanzar al mercado.

3.4.1. Proceso de impregnación de matrices húmedas para la incorporación de compuestos bioactivos

Se estudiaron distintos procesos de impregnación de manzanas utilizando el extracto óptimo EO como solución de impregnación. La **Figura 3.3** representa la secuencia de pasos seguidos para la obtención de muestras impregnadas con sauco.

Se utilizó por un lado el proceso de impregnación a vacío tradicional (IV), en el que prevalece la entrada de líquido circundante (extracto) hacia el tejido mediante el denominado mecanismo hidrodinámico. Por otro lado, se utilizó un proceso combinado que consiste en la utilización de tiempos más largos a presión atmosférica (IVA), lo que implica además la existencia de mecanismos difusivos para la transferencia de compuestos bioactivos. Dado que el extracto de sauco resultó un medio isotónico con respecto a los sólidos solubles de la manzana (11-13°Brix), los mecanismos difusivos de transferencia de agua y de sólidos solubles (azúcares de la fruta) durante tiempos largos de impregnación fueron despreciables, teniendo lugar fundamentalmente la incorporación de polifenoles y antocianinas desde el medio circundante (concentrado en estos compuestos) hacia la fruta. Se analizó además el efecto de un pretratamiento adicional de escaldado (E).

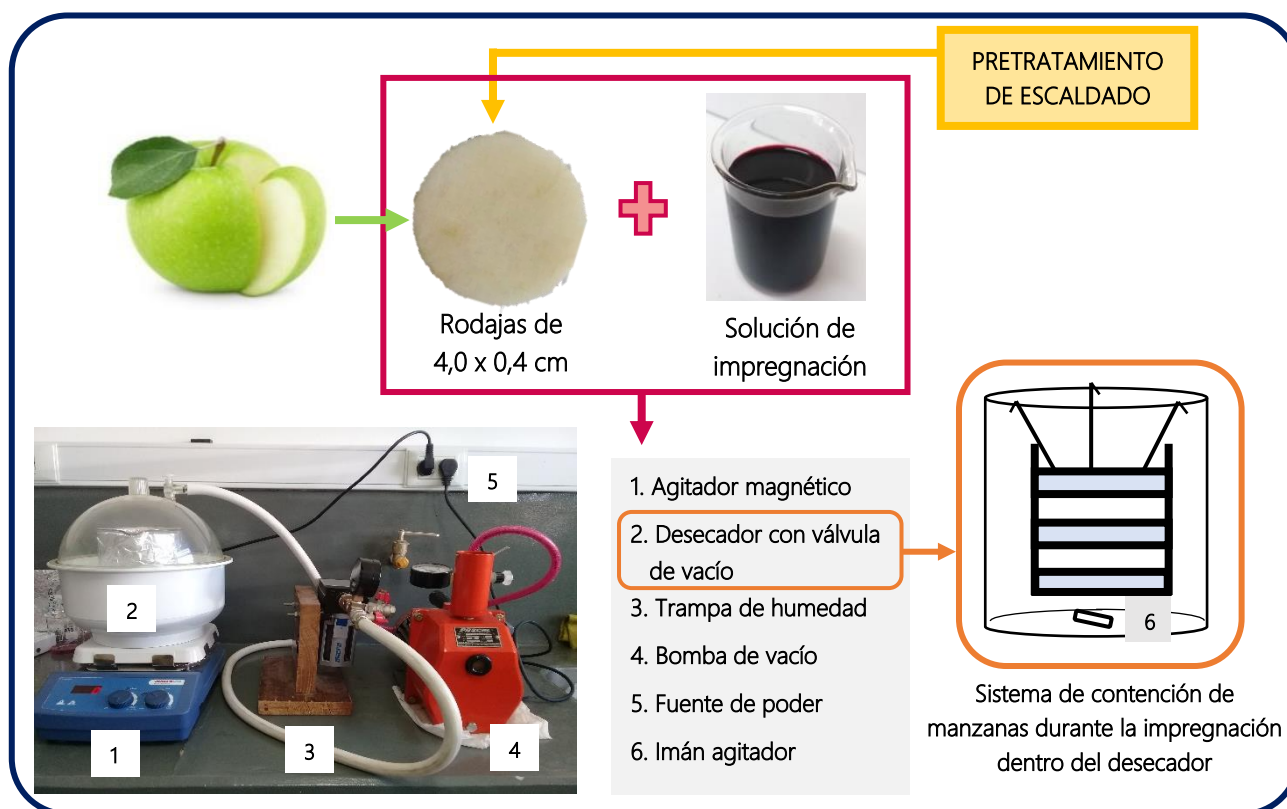


Figura 3.3. Diagrama del proceso de impregnación utilizado para la obtención del snack con potencial bioactivo.

Pretratamiento de escaldado y proceso de impregnación

Se cortaron las manzanas en rodajas de $4,000 \pm 0,005$ cm de diámetro y $0,400 \pm 0,005$ cm de espesor aproximadamente, utilizando una cortadora manual (**Figura 3.4**). El corte se realizó en sentido paralelo al eje axial de la fruta. El tratamiento de escaldado consistió en exponer los discos de manzana a vapor de agua a una temperatura $\geq 98 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 1,5 min, y luego enfriarlos en un baño de agua a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 min. Una vez retiradas las manzanas del baño, se secó el excedente superficial de agua con papel tisú dos veces.

Para el proceso de impregnación, una vez cortados los discos de manzana (escaldados o no) se ubicaron en un sistema de rejillas de acero inoxidable (**Figura 3.5**) que las mantenía sumergidas en el líquido de impregnación contenido en un vaso de precipitados, el cual era ubicado dentro del desecador (ver **Figura 3.3**).



Figura 3.4. Cortadora manual utilizada para obtener las rodajas de manzana para la elaboración de los snacks.

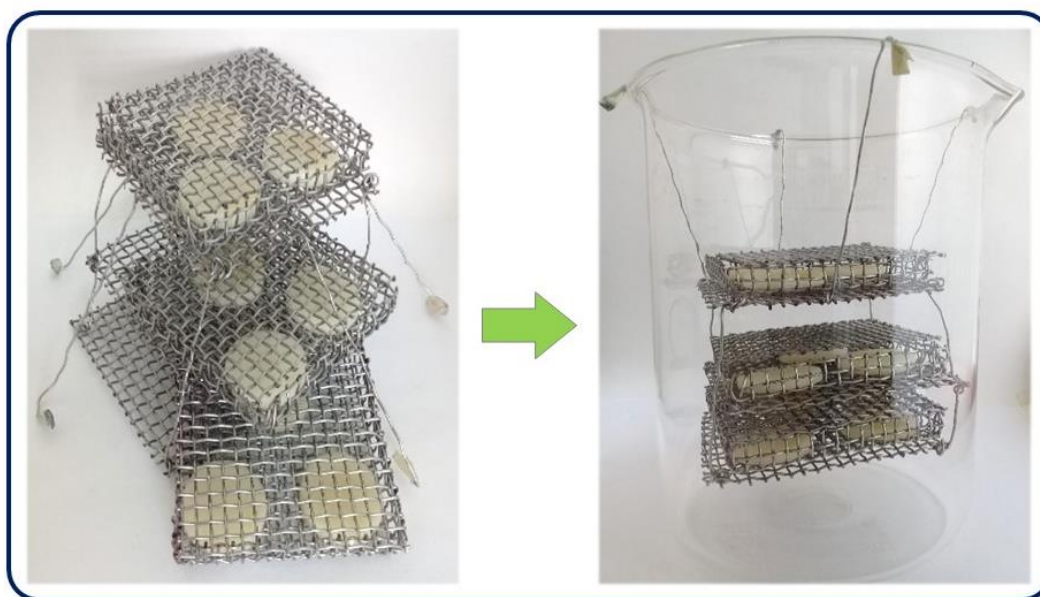


Figura 3.5. Rejillas contenedoras de las rodajas de manzana y disposición de las mismas en el recipiente de impregnación.

El tratamiento IV se llevó a cabo aplicando al sistema una presión de 0,05 bar por 10 min (t_1), para luego restaurar la presión atmosférica y mantenerla durante otros 10 min (t_2). El tratamiento IVA consintió en la utilización de un periodo de tiempo t_2 más prolongado (360 min). Los mismos procesos fueron realizados utilizando manzanas previamente escaldadas (E) y a su vez, se prepararon dos muestras control: manzana sin tratamientos (C) y manzana sólo escaldada (C-E). Una vez finalizada la impregnación, las manzanas se

secaron superficialmente con papel tisú y se congelaron para la posterior liofilización y obtención de los snacks finales. Todos los tratamientos de impregnación se realizaron por duplicado. La **Tabla 3.2** resume los distintos tratamientos de impregnación realizados.

Tabla 3.2. Condiciones experimentales utilizadas en los procesos de impregnación de rodajas de manzana con compuestos bioactivos de sauco

Pretratamiento de escaldado (E)		t ₁ (min)	t ₂ (min)
IV	No	10	10
IV-E	Si	10	10
IVA	No	10	360
IVA-E	Si	10	360
C	No	0	0
C-E	Si	0	0

IV: impregnación a vacío; IVA: impregnación vacío-atmosférica; E: pretratamiento de escaldado. t₁: periodo de tiempo a vacío; t₂: periodo de tiempo a presión atmosférica.

3.4.2. Obtención de snacks por liofilización

Las manzanas impregnadas junto con las muestras control, se mantuvieron en ultrafreezer a -70°C durante 24 h, para luego ser deshidratadas por liofilización utilizando un equipo Beta 2-8 LD plus (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Alemania) en las mismas condiciones descritas en la sección 3.2.3.2. Se obtuvieron así 4 snacks enriquecidos en compuestos de sauco (SIV, SIV-E, SIVA y SIVA-E) y dos controles (SC y SC-E), los cuales fueron caracterizados desde el punto de vista de su potencial bioactivo y de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales.

3.5. Análisis fisicoquímico y potencial bioactivo de materia prima, extractos, ingredientes en polvo y snacks de fruta

3.5.1. Contenido de agua

Se analizó el contenido de agua del fruto de sauco, los ingredientes en polvo y los snacks. La fruta fresca y los snacks se pesaron en placas de Petri previamente taradas y se secaron en una estufa de vacío a $60 \pm 1^\circ\text{C}$, con sílica gel como desecante. Para los ingredientes en polvo se realizó la determinación mediante el método de Karl Fisher empleando un titulador automático TIM 980 (Villemurbanne Cedex, Francia). Se utilizó

metanol como solvente y se aplicó la técnica de un solo componente con el reactivo Hidranal Titrant Composite 5 Riedel-de Haën (Seelze, Alemania) como reactivo de valoración.

El contenido de agua en la fruta fresca se informó como g agua cada 100 g de fruta fresca (FF), mientras que en el resto de los casos, los resultados se expresaron como g agua cada 100g de masa seca (b.s.).

3.5.2. Actividad acuosa y sólidos solubles

La actividad acuosa se midió en un higrómetro de punto de rocío Aqualab Series 3TE (Decagon Devices, Pullman, WA, USA), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. El equipo se calibró con dos soluciones saturadas de NaCl ($a_w = 0,750 \pm 0,003$) y de LiCl ($a_w = 0,250 \pm 0,003$).

El contenido de sólidos solubles de la fruta, el extracto óptimo (EO) y el jugo prensado (J) se determinó por refractometría, de acuerdo a la metodología oficial 932.12 (AOAC, 2006), expresando los resultados como g de sólidos solubles cada 100g de muestra ($^\circ\text{Brix}$).

3.5.3. pH y Acidez total

Se siguió el protocolo oficial 945.26 y 945.27 (AOAC, 2006) para la determinación de acidez y pH, respectivamente. La acidez se midió por volumetría de neutralización directa, colocando aproximadamente 2-3 g de fruta triturada, EO y J en distintos recipientes. Se diluyó cada muestra con 25 ml de agua destilada previamente hervida, midiendo el pH con un pH-metro modelo EA 940 (ORION, Beverly, USA). Luego se llevó a cabo la titulación con NaOH 0,1 N tomando como punto final el valor de pH de 8,1. Los resultados se expresaron como mg ácido cítrico/100 g de muestra.

3.5.4. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC-DAD/RAD

En los frutos de sauco se determinó el contenido de sacarosa, fructosa y glucosa, así como también de distintos ácidos (málico, cítrico, succínico, tartárico, acético, láctico y ascórbico) mediante HPLC.

Preparación de extractos

Se adicionaron 15 ml de agua destilada a 2-3 g de fruta triturada, agitando el sistema constantemente durante 5 minutos. Las muestras se filtraron con vacío y el residuo remanente se sometió nuevamente a la extracción con 10 ml de agua destilada. Se juntaron ambos filtrados y se llevó el extracto acuoso a un volumen final de 25 ml. Se determinó la concentración de sólidos solubles y la muestra fue diluida hasta un

valor final de 2 °Brix. Los extractos se filtraron en viales para HPLC con filtros de nylon de 0,2 µm (Genbiotech SRL, Bueno Aires, Argentina).

Análisis cromatográfico

Para la determinación de fructosa, glucosa y ácidos orgánicos, se inyectaron 20 µl de extracto acuoso diluido en un equipo Agilent 1260 HPLC (Agilent Technologies, E.E.U.U.) provisto de un inyector automático (ALS) y dos detectores: un detector de arreglo de diodos (DAD) para detección de ácidos orgánicos y un detector de índice de refracción (RID) para detección de azúcares. La separación se logró mediante una columna Hiplax H (300 x 7,7 mm, 8 mm de tamaño de partícula, Agilent Technologies, E.E.U.U.) a 75°C, con una fase móvil de 0,001 M H₂SO₄ y una velocidad de flujo de 0,4 ml/min (flujo isocrático). Para la cuantificación de sacarosa, se utilizó una columna para hidratos de carbono ZORBAX (150 x 4,66 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Agilent Technologies, E.E.U.U.) y una fase móvil compuesta por 75% de acetonitrilo (ACN) y 25% agua Milli-Q. El análisis se llevó a cabo a 30°C con una velocidad de flujo de 1,4 ml/min.

La detección de las sustancias se realizó mediante la evaluación de la absorbancia a 214 nm y las curvas de calibración para los estándares mostraron una correlación lineal alta ($r^2 > 0,999$).

3.5.5. Temperatura de transición vítrea (T_g) e isoterma de sorción de agua

Se evaluó la temperatura de transición vítrea (T_g) de los distintos productos obtenidos (ingrediente en polvo y snacks liofilizados) mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), usando un calorímetro 822e Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza). Previo al análisis de las muestras, el equipo se calibró con indio (156,6°C), plomo (327,5°C) y zinc (419,6°C). Se colocaron aproximadamente 10-20 mg de muestra en cápsulas de 40 µl herméticamente cerradas (se utilizó una cápsula vacía como control) y las corridas se realizaron con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Los termogramas se analizaron con el software Mettler Star^e, informando como T_g los valores onset de la discontinuidad detectada en las curvas de flujo de calor versus temperatura, que se observan en los termogramas como corrimientos endotérmicos en la línea de base.

Por otro lado, se estudió el comportamiento de sorción de agua a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ del ingrediente en polvo seleccionado, así como también de los snacks obtenidos en este trabajo, de acuerdo a la metodología descrita por Franceschinis y col. (2014). Se colocaron entre 0,2 a 0,4 g de polvo y entre 0,1 a 0,3 g de snack trozado en viales, previamente tarados, y se almacenaron en desecadores con soluciones salinas saturadas de modo de mantener una humedad relativa (HR) constante dentro de cada recipiente. Las HR ensayadas fueron 11% (LiCl), 22% (CH₃COOK), 33% (MgCl₂), 43% (KCO₃), 52% (Mg(NO₃)₂) y 75% (NaCl) (Greenspan,

1977). El almacenamiento se mantuvo hasta alcanzar el equilibrio (15-21 días aproximadamente), para luego determinar el contenido acuoso y la temperatura de transición vítrea (T_g) para cada HR.

3.5.6. Solubilidad

Se determinó la solubilidad (S) del polvo liofilizado de sauco (obtenido a partir del extracto EO) de acuerdo a la metodología usada por Gagneten y col. (2019). Se pesaron 0,5 g de polvo y se disolvieron en 50 ml de agua destilada para luego centrifugarse a 3000 g por 5 minutos. Se transfirieron 10 ml del sobrenadante a una cápsula de Petri previamente tarada, y se secó en una estufa de convección a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta peso constante. La solubilidad se calculó por diferencia de peso de acuerdo a la **ecuación 3.4**:

$$S (\%) = \frac{\text{masa seca final}}{\text{masa inicial de polvo}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.5.7. Color superficial

Se determinó el color superficial en los productos obtenidos en las distintas etapas de procesamiento (fruta, jugo, extractos, polvos y snacks). Para ello se midieron los parámetros triestímulo del espacio de color CIELAB usando un fotocolorímetro Minolta modelo CR 400 (Konica Minolta Sensing INC, Osaka, Japón), con iluminante C y 2° de ángulo de observador. El instrumento se calibró con una placa cerámica blanca ($L=95,55$; $a^*=-0,10$; $b^*=+2,69$).

La fruta, las muestras líquidas (EO y J) y en polvo se colocaron en viales hasta completar 1 cm de altura, mientras que los snacks se midieron de forma directa tomando 4-5 lecturas en la zona ecuatorial. Todas las muestras se analizaron sobre un fondo blanco, para estandarizar las mediciones. Se tomaron 10 lecturas para todas las muestras, cubriendo ambas caras en el caso de los snacks. En todos los casos se registraron los parámetros L, a^* y b^* , donde L representa la luminosidad variando en un rango de 0 a 100 (negro a blanco, respectivamente). El parámetro a^* indica cromaticidad en un eje que va desde el verde ($a^* < 0$) al rojo ($a^* > 0$), mientras que b^* indica cromaticidad en un eje que va del azul ($b^* < 0$) al amarillo ($b^* > 0$). A partir de éstos, se calcularon las funciones de color croma (C^*_{ab}), ángulo de tono (h_{ab}) para todas las muestras, y el cambio de color global (ΔE^*_{ab}) para el estudio de estabilidad, mediante las **ecuaciones 3.5-7**:

$$C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3.5)$$

$$h_{ab} = \arctan (b^* / a^*) \quad (3.6)$$

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^{*2}) + (\Delta a^{*2}) + (\Delta b^{*2})} \quad (3.7)$$

donde:

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

$$\Delta a^* = (a_0^* - a^*)$$

$$\Delta b^* = (b_0^* - b^*)$$

L_0^* , a_0^* y b_0^* , y L^* , a^* y b^* corresponden a los valores inicial y finales del estudio, respectivamente.

3.5.8. Análisis de compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos se analizaron por espectrofotometría y por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Todas las determinaciones espectrofotométricas se realizaron por triplicado, utilizando un espectrofotómetro T60 UV-Visible (PG instruments, Leicestershire, Reino Unido).

3.5.8.1. Obtención de extractos

A. Fruta, UO, EO, J y polvos de sauco

Para determinar el contenido de bioactivos y la actividad antioxidante se utilizaron dos solventes de extracción: 1) Metanol puro para polifenoles totales (CPT) y actividad antioxidante (AA) y 2) Etanol acidificado (etanol 95% y HCl 1,5 N, relación 85:15 v/v) para antocianinas monoméricas totales (ACY) y color polimérico (CP). En ambos casos, se agregaron 15ml de solvente a 1g de muestra, homogeneizando con agitación constante durante 5 min. Luego se filtró la mezcla utilizando un embudo Büchner mediante vacío, repitiendo el procedimiento anterior sobre el residuo sólido remanente y 10 ml de solvente. Se juntaron las soluciones filtradas y se llevó a un volumen final de 25 ml. En el caso de la fruta fresca se pesaron de 2-3 g de muestra y los polvos fueron reconstituidos con agua destilada en una relación 1:4.

B. Snacks de manzana impregnados

Para los snacks impregnados con extracto de sauco el procedimiento fue similar al utilizado con la fruta, los extractos y los polvos, pero con leves modificaciones. Se cortó en pequeños trozos el snack agregándole 15 ml de solvente (metanol o etanol acidificado, según corresponda) y homogeneizando con agitación constante durante 30 min. Se filtró en condiciones de vacío y al residuo remanente se lo volvió a tratar

durante el mismo tiempo con 10 ml de solvente. Finalizado el tiempo, se unieron los filtrados y se llevó a un volumen final de 25 ml.

3.5.8.2. Contenido de antocianinas monoméricas totales (ACY)

Se utilizó el método de pH diferencial descrito por Giusti y Wrolstad (2001). El mismo consiste en determinar la absorbancia de dos muestras a pH 1,0 y pH 4,5. Para ello se prepararon dos soluciones tamponadas, una de cloruro de potasio 0,025 M (pH 1,0) y otra de acetato de sodio 0,4 M (pH 4,5). Se tomó 1 ml de muestra a analizar y se diluyó en 4 ml de cada buffer, dejando las muestras en reposo durante 15 min en oscuridad. Luego se determinó la absorbancia a 510 y 700 nm, donde la primera corresponde al máximo de absorbancia de las antocianinas monoméricas presentes en la muestra, y la segunda corrige las mediciones por turbidez. En los casos donde la absorbancia a 510 nm de la muestra no cumpliera con la ley de Lambert-Beer, se procedió a diluir la misma con el solvente de extracción, teniendo en cuenta el factor de dilución. El contenido de ACY se expresó como mg de cianidina-3-glucósido cada 100 g de muestra, que fue calculado mediante las **ecuaciones 3.8 y 3.9**. La expresión en base húmeda o seca, se decidió en función del tipo de comparación realizada en los resultados.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4,5} \quad (3.8)$$

$$\text{ACY} = \frac{A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (3.9)$$

donde:

PM= Peso molecular de cianidina- 3- glucósido (449,2 g/mol)

FD= factor de dilución

ϵ = Coeficiente de absorptividad molar de la cianidina-3-glucósido (26900 L cm⁻¹ mol⁻¹)

l= paso óptico (1 cm)

3.5.8.3. Color polimérico (CP)

El color polimérico se determinó mediante el método del metabisulfito de sodio (Giusti y Wrolstad, 2001). Los extractos etanólicos de las muestras se diluyeron con agua destilada de modo que la absorbancia a 510 nm fuera menor a 1,0. Una vez diluidas las muestras, se tomaron 2 alícuotas de 2,8 ml y se le adicionaron por separado 0,2 ml de una solución de metabisulfito de sodio al 20% (muestra blanqueada) y 0,2 ml de agua destilada (muestra control). Se dejaron en reposo durante 15 min en oscuridad y luego se

midió la absorbancia (A) a tres longitudes de onda diferentes: 420 nm (detección de compuestos pardos), 510 nm (absorbancia máx. de antocianinas monoméricas) y 700 nm (corrección por turbidez).

El color polimérico (CP) es un indicador de la presencia de pigmentos polimerizados, incluyendo los complejos taninos-antocianinas y los compuestos pardos producto de reacciones de pardeamiento enzimático, reacciones de Maillard o degradación de antocianinas. El fundamento del método consiste en que sólo las antocianinas monoméricas se vuelven incoloras por la adición de bisulfito en la posición C₄, mientras que aquellas antocianinas polimerizadas no cuentan con esta posición disponible, por lo que no pueden blanquearse ante la presencia de bisulfito. Por otro lado, la densidad de color total (DC) representa la suma de todo aquello que proporcione color en las muestras, es decir antocianinas monoméricas, poliméricas y los compuestos pardos. Teniendo en cuenta las muestras control y blanqueadas, el porcentaje (%) de CP se calculó de acuerdo a las **ecuaciones 3.10-12**:

$$CP = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})]_{\text{blanqueadas}} \times FD \quad (3.10)$$

$$DC = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})]_{\text{control}} \times FD \quad (3.11)$$

$$\%CP = \frac{CP}{DC} \times 100 \quad (3.12)$$

3.5.8.4. Contenido de polifenoles totales

A. Determinación de compuestos fenólicos totales (CPT)

Para determinar el contenido de polifenoles totales se utilizó la técnica del reactivo de Folin-Ciocalteu descrita por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. El reactivo de Folin consiste en una mezcla de ácido fosfotungístico y ácido fosfomolibdico que en medio alcalino se reduce en presencia de compuestos fenólicos. En esta condición el reactivo presenta una absorbancia máxima a una longitud de onda de 765 nm, pudiendo determinarse de manera proporcional a esta medida el contenido de compuestos fenólicos en las muestras. Para ello, se tomaron 100 µl de extracto metanólico para adicionarle 900 µl de agua destilada y 100 µl de reactivo de Folin. Se dejaron las muestras en reposo durante 3-8 min para luego agregar 600 µl de una solución de Na₂CO₃ al 20%. Se mezclaron adecuadamente todos los reactivos y se dejaron reposar en un baño de agua a 40 ± 1°C durante 30 min en oscuridad. Se determinó la absorbancia de las muestras junto a una curva de calibración de ácido gálico, utilizado como estándar. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico cada 100g de muestra. La expresión en base húmeda o seca se decidió en función del tipo de comparación realizada en los resultados.

B. Polifenoles asociados a la pared celular del fruto (PPC)

De acuerdo a Bunzel y col. (2000), los ácidos fenólicos como el ferúlico, p-cumárico, entre otros, son componentes que forman parte de la pared celular de varios tejidos vegetales. Se cree que estos fenoles (ferúlicos y no ferúlicos) juegan un rol importante modificando las propiedades mecánicas de la pared celular, al encontrarse formando enlaces covalentes entre polisacáridos y lignina, evitando así la degradación de los mismos por acción de enzimas exógenas. La técnica, descrita por el mismo autor, consiste en una hidrólisis alcalina de la fracción de fibra para liberar los grupos fenólicos asociados, que luego se determinan mediante el método del reactivo de Folin-Ciocalteu descrito anteriormente.

Para la hidrólisis alcalina, se pesó aproximadamente 0,1833 g de fruta triturada, a la cual se le adicionaron 10 ml de NaOH 2M, incubando la mezcla a temperatura ambiente (25°C) y en oscuridad durante 18-24 h. Finalizado el tiempo, se agregaron 1,9 ml de HCl concentrado (pH < 2) y se centrifugó, reservando el sobrenadante para su posterior análisis de CPT.

3.5.8.5. Compuestos fenólicos individuales por HPLC-DAD

Purificación de extractos metanólicos

Para el análisis cromatográfico las extracciones se llevaron a cabo con metanol de acuerdo a lo descrito en la **sección 3.5.8.1.A**. A continuación, para mejorar la resolución cromatográfica, se purificaron las muestras realizando una extracción en fase sólida (SPE) con un cartucho HyperSep C18 (40 - 60 µm tamaño de partícula, 3 ml volumen de columna, Thermo Scientific TM, USA). El procedimiento consistió en hidratar el cartucho con 3 ml de metanol, seguido de 3 ml de muestra. Se recolectaron las muestras eluidas y se filtraron con filtros de Nylon 0.2 µm (Genbiotech SRL, Buenos Aires, Argentina) en un vial que se almacenó a -18°C hasta su análisis.

Identificación y cuantificación

La separación, identificación y cuantificación de polifenoles presentes en las muestras de sauco se llevó a cabo utilizando un equipo Agilent 1260 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con un detector de arreglo de diodos (DAD), controlado mediante el software OpenLAB Chem Station de Agilent. La separación se realizó por medio de una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 X 100 mm, 3.5 µ; Agilent Technologies) a 25°C, con un flujo de 0.5 ml/min y un volumen de inyección de 5 µl. La fase móvil estaba compuesta por agua Milli-Q (solvente A), ácido fosfórico 85% (solvente B) y metanol grado HPLC (solvente C), adquiridos en

Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina). El gradiente de elución comenzó con 99% del solvente A y 1% del solvente B, llegando a una mezcla con 19,8% de A y 0,2% de B luego de 40 min. Se utilizaron 4 longitudes de onda de trabajo: 280 nm (señal A), 323 nm (señal B), 365 nm (señal C) y 520 nm (señal D). La identificación de los compuestos consistió en comparar los tiempos de retención y los espectros UV-vis (registrados entre 210 – 610 nm) de los estándares (**Tabla 3.3**) con los obtenidos a partir de la muestra. La cuantificación se realizó con el método del estándar externo, preparando curvas de calibración en un rango de concentraciones de 0,05 a 200 mg/l.

Tabla 3.3. Descripción de los estándares de polifenoles utilizados para la identificación y cuantificación por HPLC.

Polifenol	Grupo	Subgrupo	Marca
Cianidina-3-glucósido	Flavonoide	Antocianina	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Delfinidina-3-glucósido	Flavonoide	Antocianina	Santa Cruz Biotechnology Inc.
(-) Epicatequina	Flavonoide	Flavan-3-ol	Santa Cruz Biotechnology Inc.
(+) Catequina	Flavonoide	Flavan-3-ol	Sigma–Aldrich
Rutina	Flavonoide	Flavonol	Sigma–Aldrich
Quercetina	Flavonoide	Flavonol	Sigma–Aldrich
Ácido gálico	Ácido fenólico	Ácido hidroxibenzoico	Sigma–Aldrich
Ácido elágico	Ácido fenólico	Ácido hidroxibenzoico	LGC Standards
Ácido clorogénico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Sigma–Aldrich
Ácido p-cumárico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Sigma–Aldrich
Ácido cafeico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Sigma–Aldrich
Ácido ferúlico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Sigma–Aldrich
Resveratrol	Estilbeno	-	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Para el caso de procianidinas y diglucósidos de cianidina, al no contar con el estándar correspondiente, la identificación individual de cada compuesto requiere de la combinación de técnicas cromatográficas con otras más específicas, como espectrometría de masa. Sin embargo, la cuantificación en términos de equivalentes de monómero es una práctica extendida en el análisis de muestras de manzana, vino, mostos, etc. (García Ramírez, 2005), por lo cual, para ambos tipos de compuestos, la identificación se realizó comparando el espectro UV-vis de los picos correspondientes con bibliografía. La cuantificación se llevó a cabo utilizando la curva de calibración de cianidina-3-glucósido y catequina para los diglucósidos y para las procianidinas, respectivamente.

3.5.8.6. Actividad antioxidante (AA)

La actividad antioxidante de las muestras se determinó mediante la técnica de decoloración del radical catión del ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS^{•+}) y mediante el estudio del poder reductor del Fe²⁺ (FRAP), las cuales se describen a continuación.

Decoloración del radical ABTS^{•+}

Se utilizó la técnica descrita por Re y col. (1999), con algunas modificaciones. Para generar el radical ABTS^{•+}, se preparó una solución de ABTS 7 mM y se mezcló con una solución de persulfato de potasio 2,45 mM, en una proporción 1:1. La mezcla se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 h. Pasado el tiempo de activación, se diluyó la misma con una solución buffer fosfato 0,01 M (pH 7,4) hasta obtener una absorbancia a 734 nm, entre 0,7 – 1,0. Obtenida la solución de trabajo de ABTS, se tomó 0,1 ml de extracto metanólico y se mezcló con 1,9 ml de solución de trabajo. Se incubaron las muestras a 25 °C durante 30 min en oscuridad, para luego medir la caída de absorbancia. A su vez se midieron 2 muestras control, una a tiempo 0 (cero) y otra luego de 30 min. Se repitió este procedimiento con una curva de calibración empleando ácido gálico como estándar, expresando los resultados de actividad antioxidante como mg ácido gálico cada 100g de muestra de acuerdo a las **ecuaciones 3.13 y 3.14**. La expresión en base húmeda o seca, se decidió en función del tipo de comparación realizada en los resultados.

$$\% \text{ Disminución} = \left[100 - \left(\frac{A}{A_{B,t=0}} \right) \times 100 \right] - \% \text{ DB} \quad (3.13)$$

$$\% \text{ DB} = 100 - \left(\frac{A_{B,t=30}}{A_{B,t=0}} \times 100 \right) \quad (3.14)$$

donde:

A= Absorbancia de la muestra 734 nm.

A_{B,t=0} = Absorbancia del blanco a tiempo 0 (cero).

A_{B,t=30} = Absorbancia del blanco a los 30 min.

DB= % disminución del blanco a los 30 min.

Poder reductor del Fe^{2+} (FRAP)

Se llevó a cabo el estudio del poder reductor mediante el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). El ensayo describe la capacidad reductora del catión férrico (Fe^{+3}). A bajo pH se produce la reducción del Fe^{+3} contenido en el complejo 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina férrico (Fe^{+3} TPTZ) a 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina ferroso (Fe^{+2} TPTZ), desarrollando un color azul profundo que tiene un máximo de absorbancia a 593 nm (Benzie y Strain, 1996). La capacidad de reducir el hierro se considera un índice del potencial antioxidante de la muestra.

La determinación se llevó a cabo según lo descrito por Sette y col. (2017). Se preparó el reactivo de FRAP mezclando solución de TPTZ 10 mmol/l con una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mmol/l, y buffer acetato 0,3M (pH= 3,6), en una relación 1:1:10, respectivamente. Luego se tomaron 900 μl del reactivo FRAP y se mezclaron con 90 μl de agua destilada y 30 μl de extracto metanólico. De forma análoga se preparó un blanco de reactivo. Se incubaron las muestras a 37°C durante 30 min y se determinó la absorbancia a 595 nm, junto a una curva de calibración construida con soluciones de ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg ác. gálico/100g muestra.

3.5.9. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros IR de la fruta y el polvo liofilizado de sauco (obtenido luego de la extracción enzimática) se obtuvieron utilizando un equipo FT-IR modelo Spectrum 400 (Perkin Elmer, INC., Shelton CT, USA) con un detector DTGS, acoplado a accesorio de reflectancia total atenuada (ATR, PIKE Technologies Inc., Madison WI, USA). Se realizaron 32 scans de cada muestra en un rango entre 4000 a 400 cm^{-1} , informando los espectros correspondientes a la media del total de scans.

3.5.10. Estudio de digestión *in vitro* y bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes

Se realizó el estudio sobre el polvo liofilizado de sauco seleccionado. Para ello se reconstituyó la cantidad de polvo necesaria para generar 5 g de materia líquida, en una relación de 1:4 (polvo:agua).

3.5.10.1. Simulación de tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*

El estudio de digestibilidad *in vitro* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Minekus y col. (2014) desarrollado en el marco del proyecto COST Action FA1005 INFOGEST. La metodología consiste en simular la digestión de un alimento en 3 etapas consecutivas: una fase oral, una gástrica y la fase intestinal. Cada etapa

(Figura 3.6) consistió en el tratamiento de 5 g de polvo reconstituido con soluciones modelo de fluidos digestivos, enzimas específicas, minerales y pH determinados de acuerdo a las condiciones normales del TGI.

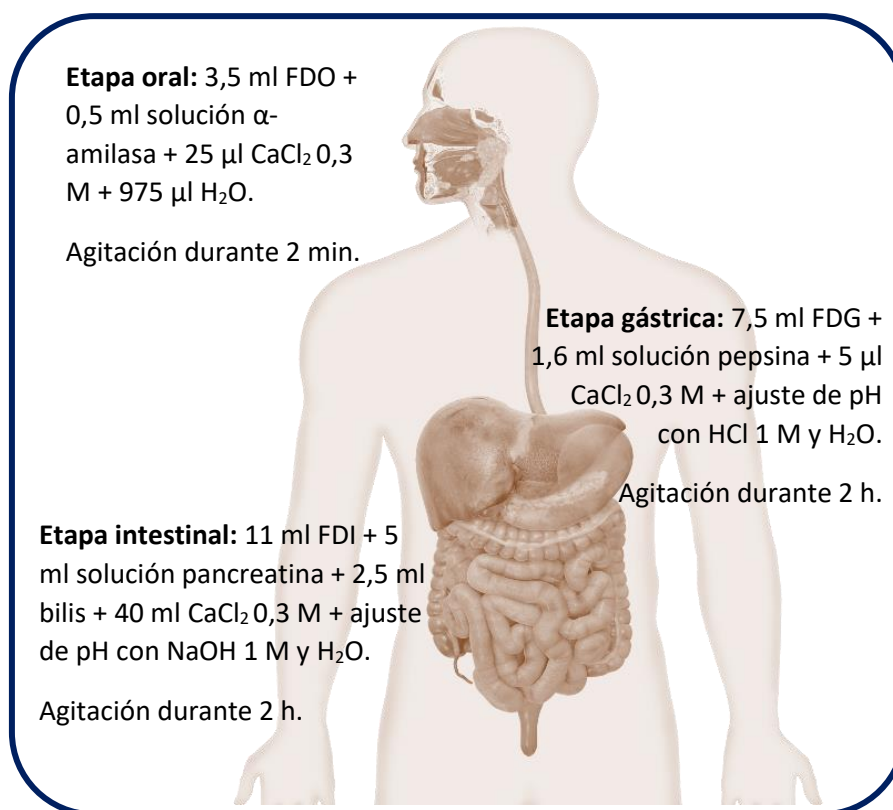


Figura 3.6. Etapas y cantidad de soluciones utilizadas para el modelo de digestión in vitro.

La temperatura de incubación fue de 37°C desde el inicio, mientras que los tiempos de incubación fueron de 2 min para la primera fase (oral) y de 120 min para las últimas dos (gástrica e intestinal). Se utilizó una estufa Function Line 7000 (Heraeus, Alemania) para mantener la temperatura constante y un agitador orbital Vicking M-23 (Vicking SRL, Argentina) a 100 rpm. Finalizada la digestión, se centrifugaron las muestras a 6000 rpm durante 10 min, separando el sobrenadante del residuo. Al ser el residuo sólido menor al 1%, se determinaron ACY, CPT y AA en el sobrenadante de acuerdo a la metodología descrita en las secciones 3.5.8.2, 3.5.8.4 y 3.5.8.6.

Para el cálculo de bioaccesibilidad (B) se tuvo en cuenta el volumen de sobrenadante (V_s), la masa de polvo reconstituido (m_p) empleada en la digestión y las concentraciones de bioactivos (C_B) en las muestras, de acuerdo a la **ecuación 3.15**:

$$B (\%) = \frac{\text{mg bioactivo sobrenadante}}{\text{mg bioactivo en polvo reconstituido}} \times 100 = \frac{V_s \times C_{B \text{ sobrenadante}}}{m_p C_{B \text{ inicial}}} \quad (3.15)$$

3.5.10.2. Actividad antioxidante luego del transporte epitelial

El intestino grueso es el órgano inmunológico más grande del cuerpo humano. Las uniones estrechas, la mucosa intestinal junto a células inmunológicas constituyen el sistema inmune interno que nos protege contra antígenos, bacterias y virus que pueden ingresar mediante la ingesta de alimentos. Además, es hospedador de una variada microbiota responsable de funciones vitales para nuestra salud y bienestar. Esto convierte al estudio de la interacción a nivel intestinal entre las células y los compuestos provenientes de los alimentos en un tópico de gran interés a la hora de formular alimentos funcionales. Mientras las técnicas *in vivo* con animales consumen recursos caros y grandes tiempos, las líneas celulares como las Caco-2 han sido ampliamente utilizadas y estudiadas como modelos *in vitro* del epitelio intestinal (Ding y col., 2020; Iftikhar y col., 2020).

De acuerdo a esto, se evaluó la actividad antioxidante del sobrenadante obtenido de la digestión *in vitro*, después de ser transportado por la monocapa de línea celular Caco-2 (ATCC) (Zheng y col., 2017). Se sembraron 1×10^6 /well células Caco-2 en un soporte transwell Corning Inc. (Lowell, MA, USA) (diámetro de membrana de policarbonato de 12 mm, tamaño de poro $0,4 \mu\text{m}$ y pared de crecimiento de $1,13 \text{ cm}^2$). Se colocaron 1000 μl de medio Dulbecco Modificado (DMEM) en el lado apical (externo) de la monocapa y 1200 μl en el lado basolateral (interno) (Figura 3.7).

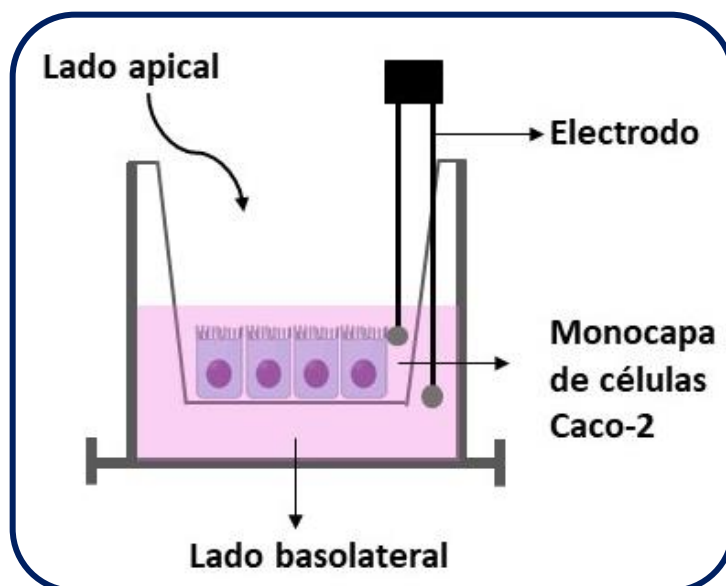


Figura 3.7. Representación de un soporte (well) y medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) durante el ensayo con células Caco-2.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , recambiando el medio cada 48-72 horas. La integridad de la monocapa de células diferenciadas fue monitoreada mediante la determinación

de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, en inglés). El desarrollo y diferenciación de las células Caco-2 fue considerado cuando el valor TEER alcanzó un equilibrio con valores mayores a $300 \Omega \times \text{cm}^2$ (Shima y col., 2005). Para el ensayo, se diluyeron 500 μl del sobrenadante digerido con buffer HBSS en una relación 1:1 y se colocaron del lado apical del sistema de células Caco-2, mientras que en el lado basolateral se agregaron 1500 μl del mismo buffer (sin muestra). Luego de 1 h de incubación a 37°C , la solución del lado basolateral fue recogida y la actividad antioxidante fue determinada mediante el método del radical ABTS^{•+} (sección 3.5.8.6). Durante todo el ensayo se controló el valor de la resistencia transepitelial para asegurar la integridad de la monocapa de células.

3.5.11. Análisis microestructural

Se caracterizó la microestructura de los discos de manzana mediante diferentes técnicas. Las manzanas frescas y escaldadas fueron observadas al microscopio óptico (MO) mientras que la ultraestructura de los snacks deshidratados se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Microscopía Óptica (MO)

Inmediatamente después de ser procesadas las muestras fueron fijadas y preparadas para la observación con microscopio óptico (MO) de acuerdo con la técnica descrita por González-Fésler y col. (2008). Las muestras se cortaron con bisturí en cuadrados de 2 mm de lado (**Figura 3.5**) y se fijaron en una solución de glutaraldehído (3 g/100g) durante dos horas en refrigeración ($5 - 7^\circ\text{C}$). Luego se lavaron con solución buffer 0,1 M de fosfato de potasio ($\text{pH} = 7,4$) durante una noche a temperatura ambiente, para luego postfijarlas con una solución de OsO_4 (1,5 g/100g) durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron deshidratadas con una serie sucesiva de soluciones de acetona (concentraciones ascendentes) y embebidas en resina Spurr de baja viscosidad. Se cortaron luego secciones (paralelas a la superficie del snack) de 1-2 μm de espesor utilizando un micrótopo Sorval MT2-B Ultracut (E.E.U.U.), coloreando las secciones con azul de toluidina (1 g/100g) y fucsina básica (1 g/100g), que finalmente fueron examinadas en un microscopio Nikon Eclipse 80i (Tokio, Japón).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se realizaron observaciones ultraestructurales mediante MEB en la zona superficial de los snacks de manzana liofilizados. Las piezas de tejido se cortaron en forma transversal y longitudinal con un bisturí en cubos de 2 mm de lado (**Figura 3.5**). Se tomaron los cubos y se ubicaron en un soporte de aluminio fijándolos

con cinta adhesiva de carbono doble faz, para luego ser cubiertos con una capa de nanopartículas de oro utilizando un pulverizador catódico modelo 108 (Cressington Scientific Instruments, Watford, Reino Unido). Las muestras cubiertas fueron observadas directamente en un microscopio Zeiss modelo Supra 40 (Carls Zeiss, Oberkochen, Alemania) a un potencial de aceleración de 20 KV, una distancia de trabajo de 12 mm y un rango de aumento entre 40 – 1000x.

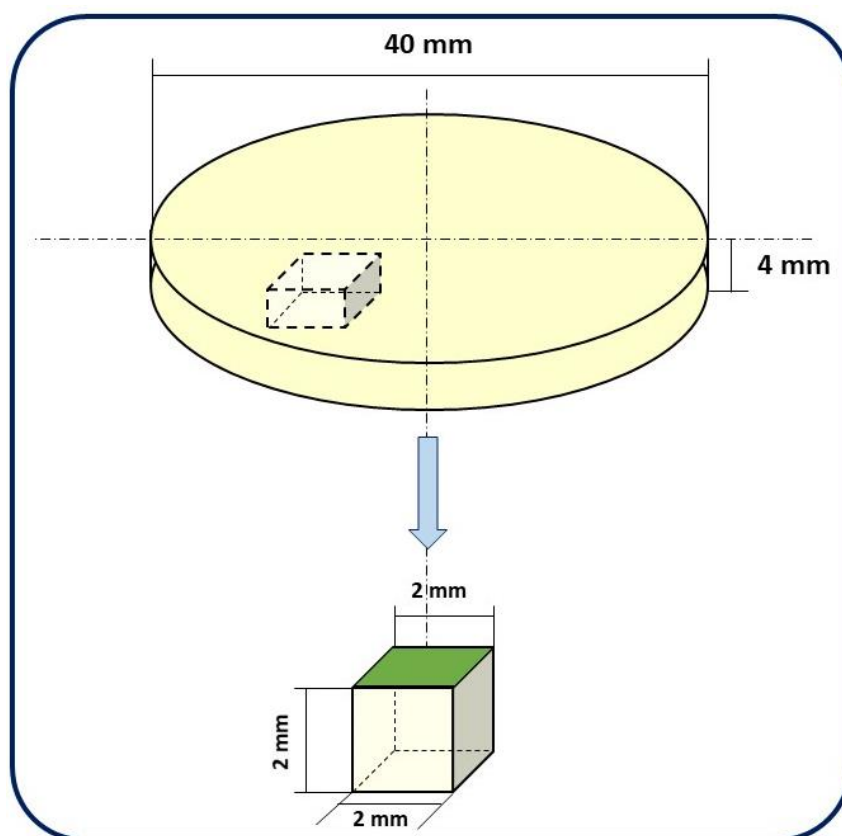


Figura 3.5. Corte realizado en las muestras para el análisis de la microestructura por MO y MEB. La zona verde indica el plano observado.

3.5.12. Determinación de propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los snacks fueron evaluadas mediante un ensayo de punción o penetración, utilizando una máquina de ensayos universales modelo 3344 (INSTRON Corporation, Canton, MA, USA). La misma se encontraba acoplada a una computadora de modo de analizar las respuestas a la punción mediante el software INSTRON Bluehill Material Testing Software. Los snacks se colocaron en un dispositivo con un orificio central y un sistema a rosca que permitía sostener la muestra durante la penetración de la punta (3 mm de diámetro), dando por finalizado el ensayo una vez que la muestra era completamente atravesada. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron: velocidad de cabezal 20 mm/min,

captura de datos cada 100 ms y rango de carga 50 N. Se obtuvieron como resultado curvas de fuerza (F) versus distancia (d) a partir de las cuales se obtuvieron los siguientes parámetros (**Figura 3.8**):

- Fuerza máxima ($F_{\text{máx}}$)
- Trabajo de fractura, como el área bajo la curva (W)
- Módulo de deformabilidad (E_d), o pendiente inicial de la curva
- Número de picos

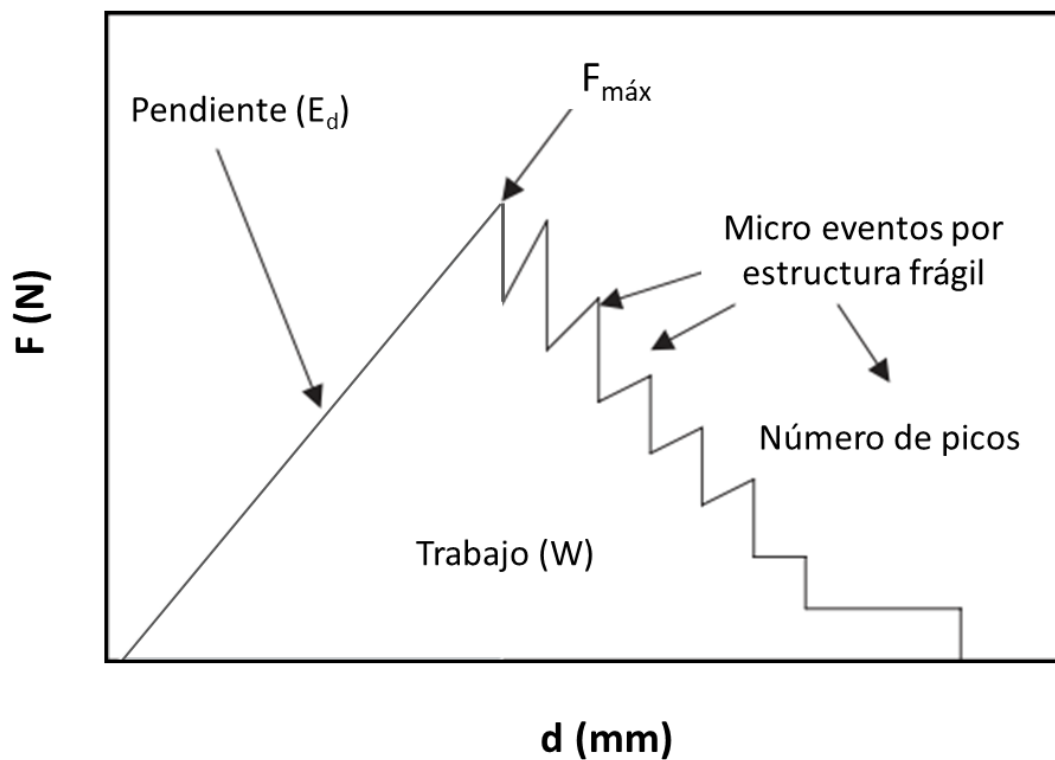


Figura 3.8. Curva representativa de un ensayo de punción (F vs distancia o desplazamiento), mostrando los parámetros evaluados para la caracterización de las propiedades mecánicas de una muestra (adaptado de Miranda y Aguilera, 2006).

3.5.13. Análisis de percepción del consumidor

Para analizar la potencial aceptación en el mercado del snack de manzana enriquecido en sauco, se realizó un estudio de aceptabilidad del consumidor mediante la metodología de asociación libre de palabras (Archaina y col., 2019). Se tomaron fotos del snack para diseñar una encuesta electrónica (**Figura 3.9**) que fue enviada a diferentes universidades y comunidades científicas mediante correo electrónico, así como

también a un público más heterogéneo a través de redes sociales (facebook y whatsapp). La encuesta consistió en una breve descripción del producto y dos preguntas relacionadas con la opinión del consumidor.

Se desea conocer la opinión de posibles consumidores de un snack funcional formulado a partir de manzana verde y jugo de sauco, sin agregado de azúcar. El sauco es una fruta fina con gran contenido de compuestos antioxidantes que presentan beneficios para la salud.



¿Qué opina de este producto? (complete con las primeras opiniones, ideas o sensaciones que se le presenten)

¿Lo compraría?

☐ Sí

☐ No

☐ Tal vez

Figura 3.9. Formato de la encuesta utilizada para el estudio sensorial de aceptabilidad del consumidor mediante la asociación libre de palabras.

Para el análisis, se tuvieron en cuenta todas las palabras, descripciones y asociaciones encontradas en las respuestas para calcular la frecuencia de repetición de cada una. Luego, se definieron diferentes categorías,

mediante el consenso de tres investigadores independientes de modo de agrupar las palabras y determinar aquellas categorías que representaran adecuadamente las respuestas de los encuestados, incluyendo los aspectos negativos y positivos para cada categoría. Se calculó el porcentaje de asociaciones correspondientes a cada categoría.

3.6. Análisis estadístico

Para las propiedades físicoquímicas, se informaron los resultados como la media \pm desvío estándar. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para detectar diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) y el test de Tukey para comparar medias de distintos tratamientos, mediante el software Infostat© version 2016.11.17 (UNC, Argentina).

Para el análisis de superficies de respuesta y el estudio de optimización mediante la función deseabilidad se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI.I (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de frutos de sauco

4.1.1 Propiedades fisicoquímicas del fruto

Para estudiar el efecto de las diferentes tecnologías de extracción de compuestos fenólicos provenientes del sauco fue necesario caracterizar previamente el fruto tanto en propiedades físicas como químicas. En la **Tabla 4.1** se presentan los valores obtenidos de humedad, actividad de agua (a_w), sólidos solubles, acidez y pH, así como también el contenido de azúcares y ácidos orgánicos. Los frutos de sauco estudiados presentaron un contenido de agua elevado ($> 80\%$), una actividad acuosa característica de productos frescos ($0,95 - 1$) y mayoritariamente azúcares reductores. Los ácidos orgánicos detectados en los frutos fueron cítrico y málico, siendo éstos los ácidos alifáticos más abundantes y distribuidos en los tejidos vegetales (Fennema, 2001).

Teniendo en cuenta que las características fisicoquímicas y el contenido en compuestos potencialmente bioactivos de frutas como las berries varía notablemente entre especies, variedades, etapa de maduración, condiciones de cultivo y de extracción, entre otros factores, los valores obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro de los rangos informados por diferentes autores para la especie *Sambucus nigra* L. Por ejemplo, Vulic y col. (2008) reportaron un contenido de agua cercano al 80%, mientras que Akbulut y col. (2009), al estudiar cuatro genotipos silvestres de *S. nigra* recolectado en Turquía, informaron un contenido de sólidos solubles de $11,74 - 12,62$ °Brix, con un pH que variaba en el rango $3,94 - 4,12$ y una acidez total con valores desde $1,05$ a $1,24$ mg ác. cítrico/100g de fruta. Por otro lado, Domínguez y col. (2020) estudiaron la composición de frutos de sauco recolectados de árboles silvestres de Ourense (España), determinando un contenido de agua de $78,9\%$ y un contenido de sólidos solubles ($14,14$ °Brix) aportado en un 95% por azúcares reductores (principalmente glucosa y fructosa) y en menor proporción, por sacarosa. Estos resultados se condicen con los del presente trabajo, que muestra mediante análisis cromatográfico proporciones similares de glucosa y fructosa (**Tabla 4.1**), mientras que la concentración de sacarosa se encuentra por debajo del límite de detección ($0,05$ g/100g). A su vez, Veberic y col. (2009) observaron en frutos de diferentes cultivares oriundos de Austria un contenido mayor en monosacáridos ($4,3 \pm 1,2$ g/100g y $4,4 \pm 1,3$ g/100g de glucosa y fructosa, respectivamente) y $0,1 \pm 0,1$ g/100g de sacarosa. Si bien la concentración de azúcares en los frutos de sauco se ve afectada por varios factores, se verifica en todos los casos la presencia de glucosa y fructosa como azúcares mayoritarios, seguidos de sacarosa en menor concentración.

Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas de frutos de sauco.

Propiedades fisicoquímicas	Media \pm DS
Humedad (g agua/100 g, b.h.)	82,7 \pm 0,9
a_w	0,979 \pm 0,03
Sólidos solubles totales (g solidos/100 g, b.h.)	10,4 \pm 0,2
Acidez (mg ácido cítrico/100 g, b.h.)	1,02 \pm 0,04
pH	4,20 \pm 0,02
Azúcares (HPLC-RAD)	
Glucosa (g/100 g, b.h.)	1,8 \pm 0,1
Fructosa (g/100 g, b.h.)	1,6 \pm 0,3
Sacarosa (g/100 g, b.h.)	<LDC
Ácidos orgánicos (HPLC-DAD)	
Ácido cítrico (g/100 g, b.h.)	0,54 \pm 0,02
Ácido málico (g/100 g, b.h.)	0,08 \pm 0,01

b.h.: base húmeda

LDC: límite de cuantificación (0,05 g/100g)

HPLC-RAD/DAD: Cromatografía líquida de alta performance acoplada a detector de índice de refracción (RAD) o arreglo de diodos (DAD)

Los ácidos orgánicos son importantes componentes del fruto de sauco, al otorgarle el sabor ácido característico. Aunque en el presente trabajo se detectaron y cuantificaron únicamente ácido cítrico y málico (**Tabla 4.1**), existen reportes que muestran la presencia de ácidos fumárico, tartárico y shikímico, representando estos aproximadamente el 1% respecto al contenido de ácido cítrico (Ferreira y col., 2020). En particular, Młynarczyk y col. (2018), informan un contenido elevado de ácido cítrico (0,31 – 0,48 g/100g fruta) comparado con otras frutas, seguido de ácido málico (0,1 - 0,13 g/100g fruta) y ácidos shikímico y fumárico, en menor concentración.

4.1.2 Compuestos bioactivos

El contenido de compuesto bioactivos en vegetales y frutos como las berries, está estrechamente relacionado con la adaptación y mecanismos de defensa de las mismas, al producir metabolitos secundarios (ácidos fenólicos, ácidos orgánicos, taninos, flavonoides y antocianinas) como respuesta a la radiación UV, sequedad, patógenos y plagas. En el caso de los compuestos fenólicos, factores como el cultivar, la manipulación agrícola, el clima, el estado de maduración, el tiempo de cultivo, el manejo postcosecha y las condiciones de almacenamiento, influyen notablemente en el contenido presente en estos frutos. Se ha

demostrado que aquellas plantas que crecen en zonas de climas fríos, sin el uso de fertilizantes y pesticidas, presentan un mayor contenido de polifenoles que aquellos frutos desarrollados en condiciones más templadas (Jimenez-García y col., 2013).

Caracterización espectrofotométrica

La **Tabla 4.2** presenta el contenido de polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales y la capacidad antioxidante de frutos de sauco, determinados espectrofotométricamente. Los polifenoles en las frutas se encuentran principalmente disueltos en el interior de la vacuola citoplasmática, sin embargo, algunos compuestos pueden estar acumulados en la pared celular. Al asociarse a ligninas o moléculas más simples, especialmente en la piel de las berries, la extracción alcohólica convencional puede llevar finalmente a una cuantificación parcial de los polifenoles presentes en el fruto (Macheix y col., 1990). De acuerdo a esto, el contenido de polifenoles totales se determinó luego de aplicar dos metodologías de extracción diferentes: se realizó una extracción tradicional con metanol y otra mediante hidrólisis alcalina, la cual permite separar aquellos polifenoles asociados a la pared celular.

Tabla 4.2. Contenido de bioactivos y capacidad antioxidante de frutos de sauco.

	Media \pm DS
Polifenoles (mg ácido gálico/100 g, b.h.)	
Extracción metanólica (CPT)	483 \pm 70
Hidrólisis alcalina (PPC)	556 \pm 74
ACY (mg cyn-3-glu/100 g, b.h.)	262 \pm 53
AA (mg ácido gálico/100 g, b.h.)	234 \pm 25

b.h.: base húmeda.

Puede apreciarse que luego de esta hidrólisis, el contenido de polifenoles aumentó en un 15% (**Tabla 4.2**) en comparación con la concentración obtenida luego de la extracción metanólica, lo cual evidencia la existencia de complejos insolubles polifenol-polímero presentes en la pared celular. Este hecho presenta vital relevancia para el desarrollo de productos potencialmente funcionales, a la hora de seleccionar los métodos de extracción de compuestos bioactivos y las condiciones del proceso, de modo de facilitar la ruptura de la membrana celular y la posterior liberación de estos compuestos de interés.

En frutos intensamente coloreados como los frutos rojos, los flavonoides prevalecen por sobre otras familias de compuestos fenólicos, siendo los pigmentos antociánicos el subtipo predominante, que además de conferir el color característico del fruto, aportan actividad antioxidante de interés. Si bien, tanto los

factores intrínsecos de la planta de sauco como aquellos extrínsecos (relacionados con la zona y las prácticas de cultivo) afectan el contenido de compuestos bioactivos, las concentraciones publicadas por diferentes autores mantienen una concordancia con las determinadas en el presente trabajo. Por ejemplo, Lee y Finn (2007) estudiaron el contenido de polifenoles de dos genotipos diferentes de *S. nigra* silvestre, recolectados durante dos años consecutivos (2004 y 2005) en el oeste de Estados Unidos, reportando una concentración de 364-387 mg ác. gálico/100g de fruta en el 2004 y un contenido mayor (510-582 mg ác. gálico/100g fruta) en el año siguiente. En cuanto al contenido de antocianinas monoméricas, los lotes de cada año presentaron la misma tendencia, siendo de 170-176 mg cyn-3-glu/100g fruta en el 2004 y 268-343 mg cyn-3-glu/100g de fruta en el 2005. En sauco silvestre de Turquía, Akbulut y col. (2009) determinaron en 4 genotipos en estudio, un contenido de polifenoles totales de 371-432 mg ác. gálico/100g fruta y una concentración de antocianinas de 242-283 mg cyn-3-glu/100g fruta. Por otro lado, Perkins-Veazie y col. (2015) reportaron un rango de CPT de 439-719 mg ácido gálico/100g de fruta y un contenido entre 85 – 385 mg cyn-3-glu/100g de ACY, en 12 genotipos diferentes de la especie *Sambucus canadensis*.

Además del contenido de bioactivos, se evaluó el color polimérico (CP) como indicador de la presencia de compuestos poliméricos en los frutos de sauco, tanto aquellos originados por copigmentación de antocianinas monoméricas como los productos de degradación por reacciones de pardeamiento. El CP arrojó un valor de $9,6 \pm 0,2$, siendo este resultado coincidente con lo observado por Poiana y col. (2010) en frutos congelados por IQF de arándanos, moras y frambuesas, que presentaron valores de 8,9, 9,45 y 10,9%, respectivamente. Si bien se espera que en la fruta fresca o congelada el valor de CP sea bajo o despreciable, existe la posibilidad de que durante el proceso de extracción alcohólica se hayan degradado algunos pigmentos a causa de la incorporación de oxígeno durante la molienda de la fruta. Esto ocasionaría la aceleración de la degradación de antocianinas por mecanismos oxidativos directos y/o por acción de enzimas oxidativas como, por ejemplo, la polifenoloxidasas, dando lugar a la generación de compuestos poliméricos pardos, lo que explicaría en parte el valor obtenido en los frutos de sauco. Franceschinis y col. (2015) observaron que el color polimérico en cerezas frescas representaba el 14.7% de la densidad de color total, atribuyendo esto no sólo a la formación de compuestos pardos producidos por vía enzimática debido a la pérdida de compartimentalización de la estructura durante el triturado de la fruta, sino también a la formación de complejos entre antocianinas y otros polifenoles. La presencia de pigmentos degradados en frutas frescas también fue observada por Pirone y col. (2014) en cerezas, Sette y col. (2017) en frambuesas y por Michalczyk y col. (2009) en frutillas, frambuesas y arándanos.

Caracterización por análisis cromatográfico y espectroscopía ATR-FTIR

La espectroscopía infrarroja (IR) por transformada de Fourier se ha convertido en una herramienta alternativa de análisis rápido en la industria alimentaria, ya que no requiere de una preparación especial de muestra, y el uso de solventes peligrosos se ve disminuido. Los espectros son generados al detectar los cambios de absorción infrarroja producidos en las moléculas irradiadas, que modifican sus estados vibracionales y rotacionales. Esto se debe a los grupos funcionales que conforman las moléculas, que son capaces de absorber radiación IR en rangos de frecuencia estrechos y específicos, independientemente de la relación de éstos con el resto de la molécula (Rodríguez-Saona y Allendorf, 2011). Sin embargo, por lo general esta técnica está asociada a la caracterización cualitativa de una muestra, por lo cual debe ser complementada con otras metodologías para un análisis más preciso.

La **Figura 4.1** presenta el espectro ATR-FTIR de los frutos de sauco, en el cual se observaron señales correspondientes a vibraciones de tensión alrededor de 3250 cm^{-1} y 2928 cm^{-1} , asociadas a grupos O-H y enlaces C-H, respectivamente. De acuerdo a Wu y col. (2021), las vibraciones entre $2960\text{--}2910\text{ cm}^{-1}$ se originan por los enlaces C-H presentes en los grupos metoxi aromáticos y los grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) de las cadenas laterales de las moléculas. Vibraciones cercanas a 1700 cm^{-1} se asocian a la presencia de grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), perteneciente posiblemente a ácidos fenólicos y a la forma quinoidal que pueden tomar distintos polifenoles (David y col., 2014).

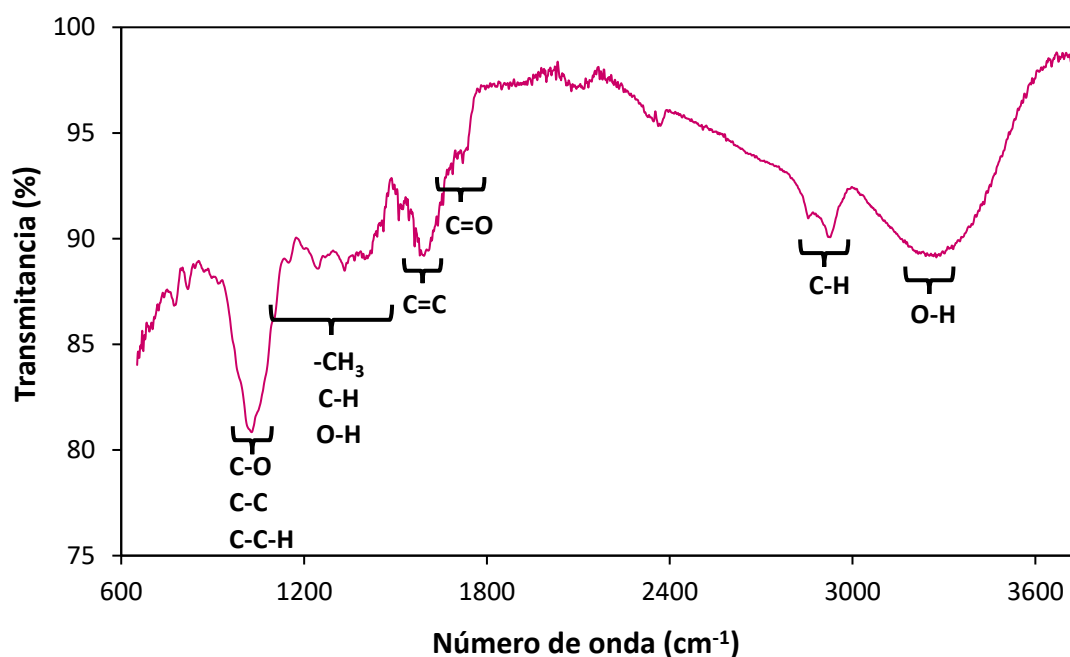


Figura 4.1. Espectro de absorción IR de los frutos de sauco liofilizados. Se encuentran indicadas las vibraciones de flexión y tensión de distintos enlaces presentes en los compuestos fenólicos.

Por otro lado, en la zona entre $1500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ se observaron señales asociadas a vibraciones de flexión, correspondientes a grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y enlaces C-H, O-H y C-O. Tarantilis y col. (2008) al estudiar espectros de diferentes vinos, describen una zona comprendida entre $1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, donde absorben grupos característicos de compuestos fenólicos y azúcares, denominada “huella digital” ya que es propia de cada tipo de muestra, lo que ayuda a la identificación. Se observa en la **Figura 4.1** que en esta zona, seguido del estiramiento C=O, encontramos estiramientos de enlaces C=C pertenecientes a los anillos aromáticos de las estructuras. A su vez, entre $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, se observa un pico intenso asociado a la flexión y estiramiento de enlaces C-O, C-C, C-C-H posiblemente correspondientes a la presencia de azúcares, como glucosa y fructosa (Mondragón Cortes, 2020).

Otros autores han detectado estas bandas en espectros de distintas berries. Por ejemplo, Garrido Makinistian (2020), halló picos similares en espectros de maqui (*Aristotelia chilensis*) entre $3250\text{-}1605\text{ cm}^{-1}$ y entre $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a vibraciones de tensión y flexión, respectivamente, atribuidos a la presencia de polifenoles. Westfall y col. (2020), estudiaron el pasaje hacia la piel de antocianinas de sauco y rábano rojo presentes en lápices labiales. De forma coincidente a lo observado en los frutos de sauco del presente trabajo, estos autores seleccionaron la región espectral entre $900\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$ como la correspondiente a moléculas de antocianinas, encontrando vibraciones de tensión del enlace C-O asociado a la unión glicosídica de antocianinas como cianidina-3-glucósido y cianidina-3-sambubiósido del sauco. También observaron una banda a 1445 cm^{-1} , que fue asignada a las vibraciones generadas por los enlaces presentes en los anillos aromáticos. Si bien en el caso de frutos de sauco de la **Figura 4.1**, este pico se encontró a números de onda levemente mayores, esto pudo deberse a que en el estudio de Westfall y col. (2020), los compuestos del sauco se encuentran probablemente interactuando con otros componentes presentes en el producto cosmético, así como también en la piel en la que se estudió la aplicación.

Por otro lado, se estudió el perfil de polifenoles, tanto antociánicos como no antociánicos por HPLC. La **Figura 4.2** muestra los cromatogramas obtenidos que permitieron la identificación de los polifenoles del fruto, que fueron a su vez cuantificados mediante la utilización de estándares (**Tabla 4.3**). Como se mencionó previamente, en frutos coloreados como el sauco la presencia de compuestos de la familia de los flavonoides predomina por sobre otros compuestos fenólicos.

Puede observarse en la **Tabla 4.3** que el grupo de polifenoles que predomina es el de las antocianinas (casi un 70%), identificadas como mono y diglucósidos de cianidina, seguidas de los flavonoles en un 14%, entre los que prevalece el compuesto rutina (quercetina-3-rutinósido), y finalmente de catequina entre los flavanoles analizados (12%). En menor concentración se detectaron ácidos fenólicos, principalmente ácido gálico y clorogénico. Algunos autores, como Veberic y col. (2009), han determinado la presencia de otro derivado de quercetina (quercetina-3-glucósido) además de quercetina como aglicona y rutina, siendo también mayoritaria la rutina entre los flavonoles detectados. Por otro lado, reportan que el contenido de la

aglicona quercetina, se encontró en una relación 1/10 respecto a la concentración de rutina, siendo estos resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

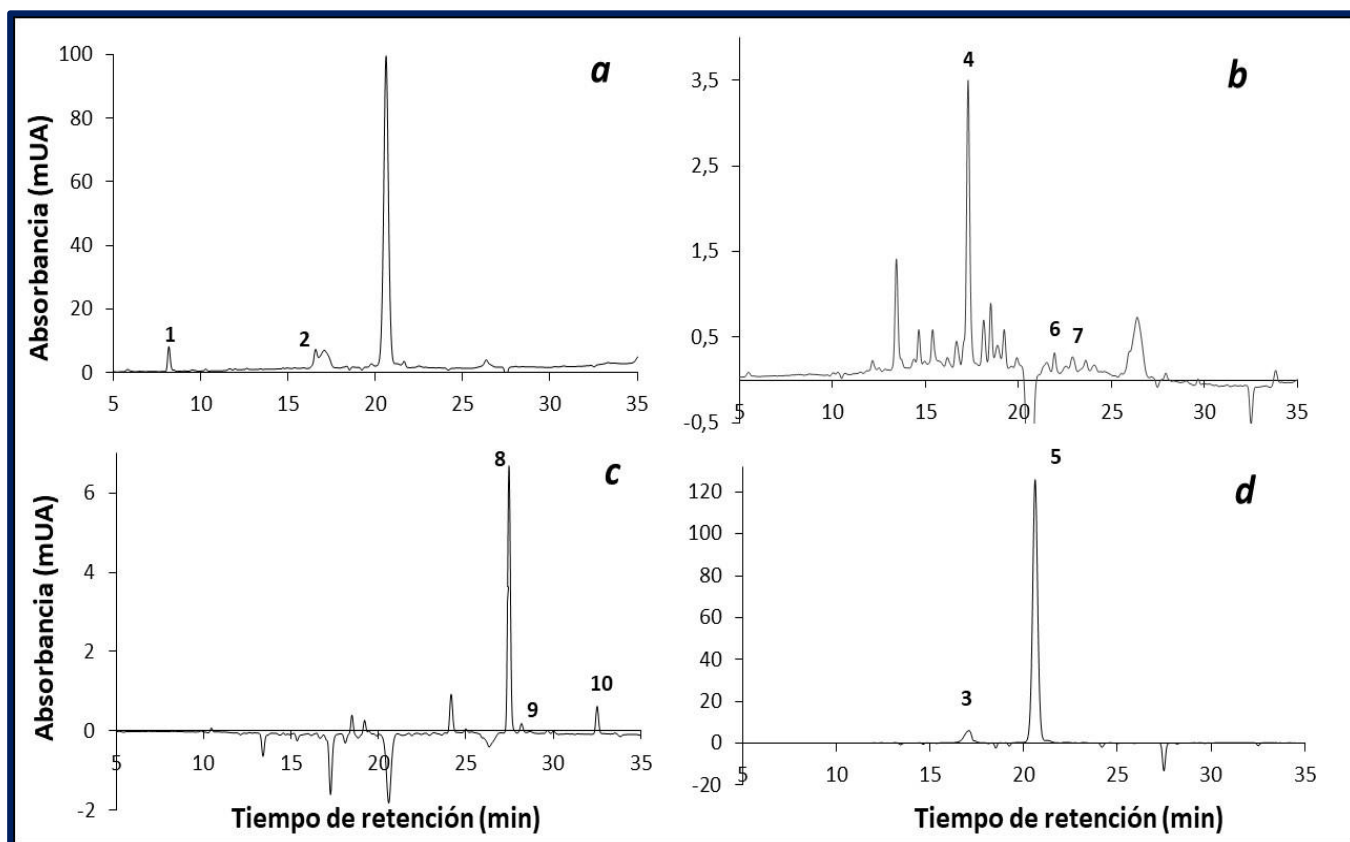


Figura 4.2. Cromatogramas de fruto de sauco obtenidos a partir del análisis por HPLC-DAD a las distintas señales: 220 nm (**a**), 323 nm (**b**), 365 nm (**c**) y 520 nm (**d**). Los picos corresponden a: 1. Ácido gálico, 2. Catequina, 3. Diglucósido de cianidina (identificación tentativa), 4. Ácido clorogénico, 5. Monoglucósido de cianidina, 6. Ácido p-cumárico, 7. Ácido ferúlico, 8. Quercetina-3-rutinósido (rutina), 9. Ácido elágico, 10. Quercetina.

En cuanto a las antocianinas presentes en el sauco, la bibliografía analizada indica que las especies corresponden a derivados de cianidina, mayoritariamente cianidina-3-sambubiósido y cianidina-3-glucósido. Sin embargo, la separación e identificación del pico correspondiente a cada una no siempre puede lograrse, a causa de sus tiempos de retención similares que se ven influenciados por las condiciones cromatográficas de la metodología utilizada. Por ejemplo, Veberic y col. (2009) y Duymus y col. (2014) lograron identificar ambos monoglucósidos de cianidina acoplando el equipo de HPLC a un espectrofotómetro de masa (HPLC-MS), lo cual permite mediante los patrones de fragmentación, diferenciar la estructura de los compuestos que coeluyen en la columna cromatográfica. De acuerdo a esta información, el pico 5 que eluye a 20,2 min (**Figura 4.2d**) podría considerarse tentativamente como una mezcla de estas dos antocianinas.

Tabla 4.3. Concentración de compuestos fenólicos detectados por HPLC en frutos de sauco (mg/g fruta).

Grupo/tipo de polifenol		Media \pm DE
Ácidos Fenólicos		0,11 \pm 0,07
Ácidos Hidroxibenzoicos	Gálico	0,057 \pm 0,004
	Elágico	0,006 \pm 0,002
	Clorogénico	0,045 \pm 0,003
Ácidos Hidroxicinámicos	Ferúlico	0,0010 \pm 0,0002
	p-Cumárico	0,0010 \pm 0,0007
	Cafeico	nd.
Flavan-3-oles		0,28 \pm 0,02
	(+)-Catequina	0,28 \pm 0,02
	(-)-Epicatequina	nd.
Flavonoles		0,32 \pm 0,06
	Quercetina	0,014 \pm 0,06
	Rutina	0,31 \pm 0,05
Antocianinas		1,6 \pm 0,2
	Cyn-3-glu/Cyn-3-samb	1,5 \pm 0,1
	Cyn-3,5-diglu/ Cyn-3-samb-5-glu	0,09 \pm 0,02
	Delf-3-glu	nd.
Estilbenos	Resveratrol	nd.
Total		2,3 \pm 0,3

Cyn-3-glu: Cianidina-3-O-glucósido. Cyn-3-samb: Cianidina-3-O-sambubiósido. Cyn-3,5-diglu: Cianidina-3,5-diglucósido. Cyn-3-samb-5-glu: Cianidina-3-sambubiosil-5-glucósido. Delf-3-glu: Delfinidina-3-glucósido.
nd.: no detectado

Por otro lado, de acuerdo a los reportado por distintos autores como Senica y col. (2016), Młynarczyk y col. (2018) y Neves y col. (2019), el pico 3 que por mayor polaridad eluye antes (17,1 min) que las antocianinas previamente descritas, podría corresponder a cianidinas poliglicosiladas (como cianidina-3,5-diglucósido o una mezcla con cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido), dado que estos compuestos están presentes en cantidades considerables en sauco y presentan un comportamiento similar durante la separación cromatográfica. De acuerdo a los espectros UV-vis obtenidos para los picos 3 y 5 (**Figura 4.3**), no sólo es posible confirmar que ambos picos corresponden a derivados de cianidina ($\lambda_{\text{máx}}$ a 280 y 518 nm), sino que se puede observar que los espectros correspondientes al pico 3 no presentaron el “hombro” a 420-455 nm característico de antocianinas glicosiladas en la posición 3 (presente en las antocianinas del pico 5). Esto permite suponer la existencia de sustituciones en la posición 3 y 5 (Santos-Buelga y col., 2003), por lo que los

compuestos desconocidos asociados al pico 3, fueron cuantificados como una mezcla de diglucósidos de cianidina (Tabla 4.3).

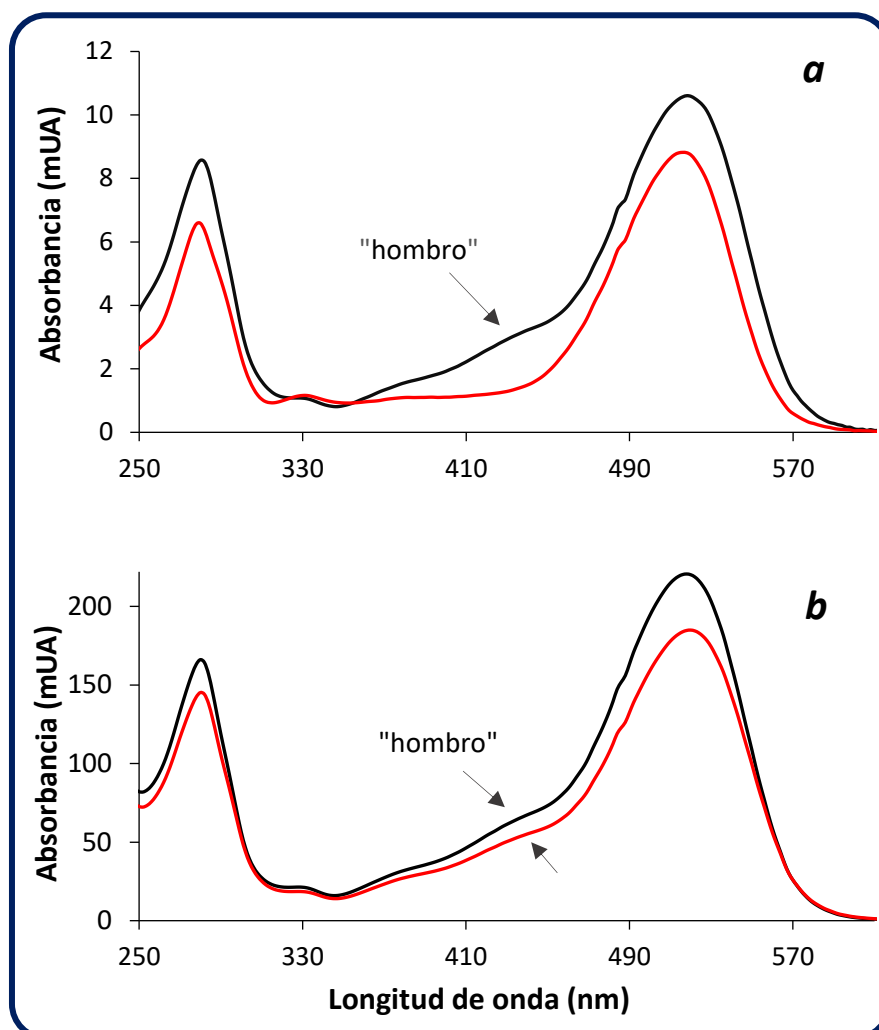


Figura 4.3. Espectros de absorción UV de los picos 3 y 5 correspondientes a la presencia de cianidina-3,5-O-diglucósido (**a**) y cianidina-3-O-glucósidos (**b**) en frutos de sauco (línea roja), comparados con el estándar de cianidina-3-O-glucósido (línea negra). La flecha indica el “hombro” cerca de los 440 nm característico de antocianinas 3-glicosiladas.

4.2 Procesos de extracción y estabilización de compuestos bioactivos de sauco

En este trabajo se abordaron dos tecnologías para asistir la extracción de compuestos bioactivos del sauco: extracción asistida por ultrasonido (EAU, sección 4.2.1) y extracción asistida por enzimas (EAE, sección 4.2.2). En una primera etapa se optimizó el proceso de EAU en frutos de sauco, realizando un análisis comparativo con otras berries y otras tecnologías verdes de extracción. Posteriormente se evaluó el uso de procesos de liofilización y secado por atomización con el objetivo de estabilizar el extracto óptimo obtenido

por EAU. Finalmente, en base al análisis de todos los resultados, se abordó el uso de EAE propuesta como metodología de menor costo y de más fácil implementación a nivel industrial, combinada con el proceso de estabilización de mejor performance.

4.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

4.2.1.1 Optimización del proceso de extracción

Obtención del extracto óptimo (UO)

Con el fin de obtener extractos de sauco ricos en compuestos bioactivos se asistió la extracción mediante la aplicación de ultrasonido y se realizaron extracciones sucesivas para un aprovechamiento mayor de los compuestos de interés. Los tratamientos a diferentes tiempos (0, 5 y 10 min) se aplicaron en la muestra triturada y el residuo obtenido hasta en 3 ciclos de extracción. El rendimiento de extracción en jugo (RE), la concentración de bioactivos y la actividad antioxidante (**Tabla 4.4**) se determinaron en cada ciclo con el fin de evaluar el desempeño de los diferentes tratamientos, teniendo en cuenta ambos factores (tiempo de aplicación de ultrasonido y número de ciclo de extracción) y su interacción.

Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) indicaron que no existió efecto significativo ($p < 0,05$) para la interacción entre los factores estudiados (tiempo de EAU y número de ciclo). Respecto al rendimiento de extracción en jugo (RE), si bien no hubo efecto significativo de ninguno de los factores estudiados, los mayores porcentajes de extracción se obtuvieron luego del primer ciclo de extracción y la aplicación de ultrasonido (81-82%). Por otro lado, como era de esperar, se observaron diferencias importantes en el contenido de bioactivos entre ciclos de extracción para los tres tratamientos estudiados. La mayor extracción de bioactivos se produjo durante el primer ciclo, continuando con el agotamiento del residuo remanente durante las siguientes extracciones.

La duración del tiempo de aplicación de ultrasonido no afectó el contenido de polifenoles y antocianinas durante el segundo y tercer ciclo de extracción, como tampoco modificó notablemente la actividad antioxidante. El efecto sólo se observó en ACY durante el primer ciclo de extracción, obteniéndose una mejora a partir de los 5 min de EAU (63 ± 1 mg cyn-3-glu/100g). Sin embargo, se produjo posteriormente una disminución luego de 10 min de aplicación de ultrasonido, manteniéndose CPT y AA sin variaciones significativas. Ello denota el deterioro que estarían sufriendo las antocianinas monoméricas como consecuencia de un mayor tiempo de exposición del tejido vegetal al ultrasonido.

Teniendo en cuenta que todos los compuestos fenólicos solubles, incluidas las antocianinas, se acumulan en la vacuola celular (Macheix y col., 1990), si bien se espera que las ondas de ultrasonido provoquen la

disrupción en la estructura celular liberando estos compuestos, el aumento en el tiempo de aplicación de EAU podría estar favoreciendo la hidrólisis de las antocianinas monoméricas, sin afectar al mismo tiempo otros compuestos fenólicos.

Tabla 4.4. Concentración de polifenoles totales (CPT), antocianinas monoméricas (ACY), actividad antioxidante (AA), y rendimiento de extracción (RE) de los extractos de sauco obtenidos mediante EAU.

Ciclo	Tiempo EAU (min)	CPT (mg ác. gálico/100g)	ACY (mg cyn-3-glu/100g)	AA (mg ác. gálico/100g)	RE (%)
1	0	150 ± 8 ^{a,A}	52 ± 4 ^{a,A}	108 ± 6 ^{a,A}	75 ± 3 ^{a,A}
	5	149 ± 8 ^{a,A}	63 ± 1 ^{b,A}	113 ± 6 ^{a,A}	82,0 ± 0,8 ^{a,A}
	10	151 ± 7 ^{a,A}	58 ± 2 ^{a,A}	119 ± 9 ^{a,A}	81 ± 6 ^{a,A}
2	0	81 ± 5 ^{b,B}	32 ± 4 ^{b,B}	66 ± 6 ^{b,B}	73 ± 2 ^{a,A}
	5	77 ± 6 ^{b,B}	34 ± 3 ^{b,B}	72 ± 8 ^{b,B}	68 ± 7 ^{a,A}
	10	81 ± 6 ^{b,B}	36 ± 3 ^{b,B}	75 ± 5 ^{b,B}	80 ± 5 ^{a,A}
3	0	43 ± 2 ^{c,C}	21 ± 3 ^{c,C}	49 ± 5 ^{c,C}	71 ± 1 ^{a,A}
	5	45 ± 4 ^{c,C}	21 ± 2 ^{c,C}	45 ± 4 ^{c,C}	72 ± 4 ^{a,A}
	10	47 ± 3 ^{c,C}	25 ± 1 ^{c,C}	47 ± 2 ^{c,C}	69 ± 5 ^{a,A}

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos de EAU en cada ciclo de extracción.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ciclos de extracción.

El efecto de la aplicación de ultrasonido sobre los polifenoles ha sido previamente estudiado en muestras modelo. Sun y col. (2016) estudiaron cómo la potencia de ultrasonido y el tiempo de tratamiento afectaban soluciones alcohólicas modelo de pelargonidina-3-glucósido (una de las antocianinas mayoritarias en la frutilla), reportando que el aumento de ambos factores provocaba una disminución de la absorción en el espectro UV-vis del compuesto en estudio. Estos autores atribuyen la degradación de antocianinas a la cavitación generada por la aplicación de ultrasonido, que inicialmente facilita la disolución de estos compuestos en el medio, pero luego con el aumento de la intensidad y el tiempo de sonicación se degradan. Wang y col. (2020) profundizaron el estudio del mecanismo de degradación por aplicación de ultrasonido en tres polifenoles de diferentes grupos: ácido cafeico (como no-flavonoide), rutina y cianidina-3-glucósido. Observaron que el ácido cafeico presenta un umbral de respuesta ante la aplicación de ultrasonido mucho mayor (resiste más el deterioro) que el de los flavonoides estudiados, y que el aumento en el tiempo de tratamiento favorece la degradación de todos los compuestos, siendo mayor la velocidad de deterioro de la cianidina. De acuerdo a estos autores, la EAU produce dos efectos en la muestra: mecánicos (deterioro del tejido por producción de ondas de choque, micro-jets y transmisión acústica) y químicos por sonicación (el efecto de cavitación produce reacciones de hidrólisis y polimerización).

En EAU de baja frecuencia, inicialmente predominan los efectos mecánicos, que favorecen la liberación de los compuestos de interés, siendo acompañados en menor medida por los efectos químicos por sonicación. Cuando el tratamiento se da en medio acuoso y el tiempo de extracción se extiende, las burbujas generadas por cavitación producen la hidrólisis del agua generando radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que al ser liberados oxidan los compuestos fenólicos, disminuyendo su concentración. En conjunto con el estudio de estos efectos, los autores encontraron una fuerte correlación negativa entre la concentración de $\cdot\text{OH}$ y los polifenoles en estudio, especialmente al analizar el aumento del tiempo de sonicación y la concentración de rutina y cianidina. Sun y col. (2016) y Yao y col. (2016), también hallaron una correlación negativa en la concentración de los glucósidos de pelargonidina y cianidina cuando aumentaba la potencia y el tiempo de ultrasonido aplicados. A su vez, en ambos trabajos, se estudió la actividad antioxidante de las antocianinas, afirmando que el uso de EAU puede generar como productos de degradación a partir antocianinas y otros flavonoides, nuevos compuestos con diferente actividad antioxidante (como ácidos hidroxibenzoicos, agliconas, chalconas, glucósidos de cumarina, entre otros). De este modo la capacidad antirradicalaria no se ve disminuida, o incluso a veces aumenta respecto de la proporcionada por los compuestos precursores. De acuerdo a esto, el deterioro en las antocianinas monoméricas observadas en el presente trabajo durante el tratamiento U10, podría estar generando nuevos compuestos fenólicos que son cuantificados por el método de Folin, y a la vez aportan actividad antioxidante, lo que explicaría que CPT y AA se mantengan constantes a pesar de la degradación observada de pigmentos.

Con el fin de analizar en profundidad la aplicación de extracciones sucesivas con o sin ultrasonido, y considerando que el objetivo de este estudio es mejorar la extracción de compuestos bioactivos presentes en frutos de sauco, se calculó el rendimiento en polifenoles (RP) y en antocianinas (RA) para una, dos y tres extracciones sucesivas. Es decir, que en los casos en los que se aplicaron dos y tres extracciones sucesivas, se juntaron los sobrenadantes obtenidos luego de cada ciclo, generando un pool de extractos (extractos “1+2” y “1+2+3”) a los cuales se les determinó el contenido de bioactivos. En la **Tabla 4.5** puede observarse que RP sólo se vio afectado por el número de extracciones sucesivas aplicadas, siendo mayor el rendimiento luego de dos y tres extracciones sucesivas. Si bien no hubo diferencias significativas entre esta cantidad de extracciones, cabe destacar que, con 3 ciclos de extracción, se logra obtener casi el 95% de polifenoles presentes en la fruta. En cuanto a RA, los resultados se vieron afectados por el número de extracciones y por el tiempo de EAU. Los tratamientos con ultrasonido se diferenciaron del tratamiento control, mejorando el rendimiento con tres extracciones hasta casi un 65% del total de antocianinas monoméricas.

Como se discutió previamente, el hecho de no extraer la totalidad de antocianinas presentes en la fruta podría no sólo deberse a la degradación de estos pigmentos o a una mayor asociación de las mismas a la fase sólida, sino también podría deberse a la generación de compuestos polimerizados por efecto del ultrasonido, cuyas estructuras no permiten su determinación mediante el método del pH diferencial, pero contribuyen al

color de la muestra. Como se ha comentado en la sección 1.2 de la introducción, la polimerización de antocianinas puede darse mediante diferentes reacciones de copigmentación, o de asociación entre ellas.

Tabla 4.5. Rendimiento en polifenoles (RP) y antocianinas (RA) para cada ciclo de extracción y tratamiento EAU aplicado.

Pool de extracto	N° de ciclos de extracción	Tiempo EAU (min)	RP (%)	RA (%)
1	1	0	65 ± 5 ^B	36 ± 3 ^{b,B}
		5	66 ± 2 ^B	45 ± 1 ^{b,A}
		10	67 ± 4 ^B	42 ± 9 ^{b,A}
1+2	2	0	85 ± 3 ^A	49 ± 2 ^{a,b}
		5	85 ± 4 ^A	58 ± 2 ^{a,A}
		10	87 ± 3 ^A	55 ± 3 ^{a,A}
1+2+3	3	0	92 ± 4 ^A	54 ± 2 ^{a,B}
		5	93 ± 4 ^A	64 ± 5 ^{a,A}
		10	94 ± 5 ^A	62 ± 1 ^{a,A}

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el factor “tiempo de EAU”. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el factor “número de ciclo de extracción”.

Las estructuras generadas al formar el complejo antocianina-copigmento, protegen al grupo flavilio de manera que el cambio de color del cromóforo se vuelve independiente del pH (Garrido Makinistian, 2020), por lo cual no se estarían cuantificando en los extractos de sauco obtenidos mediante EAU. En relación al posible efecto del ultrasonido, Wang y col. (2016) observaron un aumento en la presencia de antocianinas poliméricas con el aumento del tiempo de ultrasonido (de 20 a 40 min), en extractos de piel de pera roja en comparación con extractos de arándanos y cerezas, atribuyendo este efecto a la modificación producida en la estructura de la piel de pera. Los autores reportan que el ultrasonido no sólo favoreció la penetración del solvente a la pared celular firme de la piel de pera, sino que además permitió la extracción de las antocianinas polimerizadas sin romper la asociación existente en las mismas.

De acuerdo a los resultados presentados, se seleccionó el tratamiento de EAU durante 5 minutos considerando 3 ciclos de extracción como el mejor procedimiento para obtener un extracto de mayor contenido en compuestos bioactivos, logrando al mismo tiempo un mayor volumen de extracto. La caracterización del extracto obtenido en estas condiciones (UO) se presenta a continuación.

Caracterización del extracto UO

Se repitió la EAU en las condiciones óptimas definidas anteriormente (5 min US y 3 ciclos), y las propiedades fisicoquímicas del extracto obtenido (UO) se presentan en la **Tabla 4.6**. Puede observarse que este extracto presentó características similares a la fruta original en cuanto a pH y acidez, mientras que el

contenido de sólidos disminuyó por efecto de la adición de agua como solvente de extracción. El contenido de bioactivos se mantuvo en un rango intermedio entre los primeros dos ciclos de extracción estudiados debido a la mezcla de los sobrenadantes generados en cada ciclo de extracción.

La aplicación de ultrasonido en sauco con el fin de obtener extractos o jugos ricos en compuestos bioactivos no ha sido tan estudiada en frutos como sí se ha hecho en sus flores (Gadjalova y Mihaylova, 2019; Vujanović y col., 2019; Kaltsa y col., 2020). Si bien éstas presentan una mayor concentración de compuestos bioactivos en relación a los frutos, principalmente de polifenoles no antocianicos, en todos los trabajos mencionados se observó una mejora en la extracción de los mismos con la aplicación de ultrasonido.

Tabla 4.6. Caracterización fisicoquímica del extracto óptimo (UO).

Propiedades fisicoquímicas	Media \pm DS
Sólidos solubles totales (g sólidos/100g UO)	2,2 \pm 0,1
Acidez (mg ácido cítrico/100 g UO)	0,148 \pm 0,04
pH	4,51 \pm 0,02
CPT (mg ácido gálico/100 g UO)	113 \pm 7
ACY (mg cyn-3-glu/100 g UO)	54 \pm 2
AA (mg ácido gálico/100 g UO)	88 \pm 8

Con respecto a la aplicación de ultrasonido en frutos de sauco, se puede citar el trabajo de Mota y col. (2020b) quienes obtuvieron extractos utilizando el proceso a temperatura ambiente durante 1 h, y variando el tipo de solvente. Además, realizaron una comparación con el uso de microondas como tecnología de extracción. Estos autores observaron que el uso de agua como solvente generó la mayor AA en los extractos.

La aplicación del proceso de EAU utilizada en este trabajo se estudió previamente en otras berries cultivadas y silvestres (Gomez Mattson y col., 2016; Gagneten y col., 2019; Gomez Mattson y col., 2021), en particular frambuesa, murra, grosella negra y maqui. En estos trabajos se observó que, dependiendo de la fruta analizada, el tiempo de aplicación de ultrasonido afectó la extracción de bioactivos en forma positiva o negativa, mientras que la aplicación de extracciones sucesivas benefició para todas las frutas la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos. En la mayoría de las berries analizadas la aplicación de ultrasonido resultó positiva, mientras que en el caso particular del maqui no se produjo una mejora en la extracción de polifenoles, lo cual se relacionó con el bajo contenido de agua en el fruto y a que la mayoría de los polifenoles probablemente estén asociados a la fase sólida de la matriz (Gomez Mattson y col., 2021). La información hasta aquí analizada indicaría que la aplicación de ultrasonido continúa siendo un área a

explorar con potencialidad para obtener extractos ricos en bioactivos a partir de frutos de sauco, así como también de otras berries.

A continuación, se presenta un análisis de la bibliografía existente en relación al uso de otras tecnologías verdes de extracción para la recuperación de bioactivos de sauco.

4.2.2. Comparación de distintas tecnologías verdes de extracción en frutos de sauco

Distintas tecnologías verdes se han aplicado para la obtención de extractos enriquecidos en polifenoles y antocianinas de sauco, como extracción enzimática, extracción por fluidos supercríticos, utilización de solventes amigables con el medio ambiente, entre otros. Por ejemplo, Szalóki-Dorkó y col. (2016) estudiaron la obtención de concentrados de dos variedades de *S. nigra* mediante extracción enzimática, seguida de un proceso de clarificación y evaporación del jugo. Los autores sometieron la fruta triturada a una maceración a 50-55°C con la adición de enzima durante 1 h. Esto generó extractos con una concentración de antocianinas entre 250-420 mg cyn-3-glu/100g muestra, valores notablemente más altos que el extracto obtenido en este trabajo mediante ultrasonido. Otro estudio de extracción enzimática fue realizado por Landbo y Mayer (2004), en el que analizaron diferentes tipos de pectinasas para la mejora de rendimiento en jugo, el aumento de antocianinas, polifenoles y turbidez de los jugos obtenidos a partir de frutos de diferentes cultivares de sauco. El estudio consistió en variar el tiempo entre 10-50 min de maceración, a una temperatura entre 32-60°C, con diferentes concentraciones de enzima. Los resultados finales fueron también mejores que los obtenidos mediante EAU en este trabajo, dado que los jugos obtenidos presentaron una concentración de CPT de 553-575 mg ác. gálico/100g y ACY de 224-245 mg cyn-3-glu/100g.

En cuanto al uso de extracción tradicional con solventes, Kowalska y col. (2021) estudiaron la extracción de antocianinas de frutos de sauco deshidratados, utilizando agua y diferentes mezclas de glicerol:agua y etanol:agua. La fruta se maceró a 20, 50 y 80°C por 10 min, con agitación constante. En general, los extractos presentaron un contenido en antocianinas entre 12-36 mg cyn-3-glu por litro de extracto, valor cercano al obtenido mediante la EAU estudiada en este trabajo (≈52 mg cyn-3-glu/L extracto). Por último, la aplicación de CO₂ como fluido supercrítico en conjunto con etanol como co-solvente, fue analizada por Mota y col. (2020a) en frutos frescos y deshidratados de sauco. El proceso de extracción duró 2 h, a una temperatura de 40°C, obteniéndose extractos con bajo rendimiento de extracción y actividad antioxidante. Cabe destacar que en la mayoría de los trabajos reportados en bibliografía el estudio se limita a comparar distintos métodos de extracción y condiciones operativas para la selección del extracto de mejores propiedades bioactivas, pero no informan la mejora real en términos de contenido de compuestos bioactivos con respecto a una muestra control.

4.2.3. Estabilización del extracto óptimo UO mediante secado por atomización y liofilización

Se formuló el extracto UO con maltodextrina como adyuvante para los procesos de secado en una concentración del 20% (m/m). La concentración se eligió teniendo en cuenta que el extracto presentaba bajo contenido en sólidos (2,3 °Brix), y que el objetivo principal fue proteger los compuestos bioactivos, obteniendo un polvo de buenas características físicas (Shishir y Chen, 2017; Jiang y Zhang, 2013). Una vez formulado el extracto, se procedió a deshidratarlo mediante liofilización y secado por aspersión, para evaluar las propiedades físicas y el contenido de bioactivos de ambos productos.

Propiedades físicas de los polvos UO

La **Tabla 4.8** presenta las propiedades físicas determinadas en los polvos obtenidos (PS: polvo secado por aspersión; PL: polvo liofilizado). Ambos polvos presentaron valores de humedad y a_w bajos, y una temperatura de transición vítrea (T_g) muy superior a 25°C, lo cual sugiere que ambos polvos podrían almacenarse a temperatura ambiente conservando su estado vítreo, sin riesgo de sufrir un colapso estructural y/o deterioro físico, en un envase adecuado. La temperatura de transición vítrea es un parámetro íntimamente relacionado con el contenido de agua y el tipo y concentración de sólidos presentes en un alimento (Roos, 2010). El polvo PS resultó con un contenido de agua mucho mayor al observado para PL, y esto se reflejó en una importante diferencia en los valores de temperatura de transición vítrea de ambos polvos.

Tabla 4.8. Propiedades físicas de los polvos obtenidos luego del proceso de EAU y formulación del extracto UO.

Propiedad	PS	PL
Humedad (% b.s.)	$6,6 \pm 0,2^b$	$0,9 \pm 0,2^a$
a_w	$0,31 \pm 0,02^b$	$< 0,059^a$
T_g (°C)	43 ± 1^b	123 ± 1^a
Higroscopicidad (g agua/g polvo)	$0,065 \pm 0,006^b$	$0,0754 \pm 0,0008^a$

Diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

En cuanto a la higroscopicidad, la masa de agua adsorbida a 20°C y 75% HR luego de 30 días fue mayor para PL, característica frecuente en productos deshidratados por esta metodología (Ratti, 2013). A su vez, al observar las curvas de ganancia de agua en función del tiempo (**Figura 4.4**), PL adsorbió 10% más de agua que PS durante el primer día, demostrando su mayor higroscopicidad. Si bien los resultados sugieren que ambos polvos requerirían de un envase de un material con buena barrera al vapor de agua de modo de no

comprometer la estabilidad física, funcional y microbiológica del producto, esta característica es por otro lado favorable para una rehidratación rápida y completa al momento de ser utilizados como ingredientes.

Otros autores informaron resultados similares al comparar las propiedades físicas de polvos obtenidos mediante liofilización y secado por aspersión. Por ejemplo, Ramírez y col. (2015) estudiaron el secado de un jugo modelo formulado con ácido gálico y diferentes concentraciones de maltodextrina (10, 20 y 30 %). Si bien la actividad acuosa fue mayor que la obtenida en este trabajo, obtuvieron polvos liofilizados de menor humedad que aquellos secados por aspersión, para todas las concentraciones de maltodextrina estudiadas.

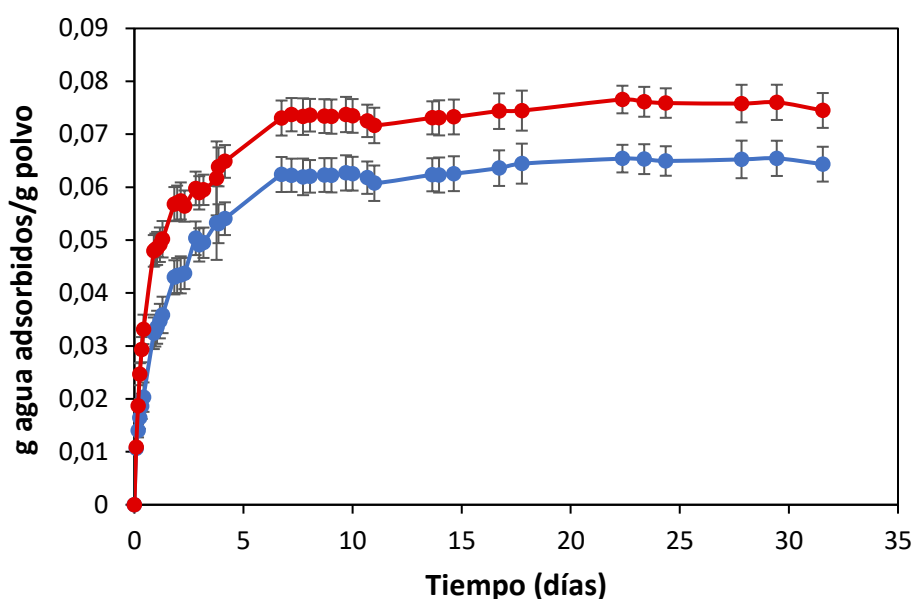


Figura 4.4. Curvas de adsorción de agua en función del tiempo obtenidas durante el ensayo de higroscopicidad (HR= 75%, 20°C), para los polvos PS (línea azul) y PL (línea roja) obtenidos a partir del extracto óptimo UO.

Respecto al color, la **Figura 4.5** presenta fotografías de los polvos obtenidos junto con los parámetros cromáticos correspondientes (L^* , a^* y b^*), además de la saturación (C^*_{ab}) y el ángulo de tono (h_{ab}) calculados para cada polvo de sauco. En ambos casos los valores de a^* y b^* se ubicaron en el cuarto cuadrante del círculo cromático, siendo similares los valores de C^*_{ab} y h_{ab} , correspondiéndose con tonalidades rojo-púrpura. La principal diferencia del color se debe a la luminosidad (L^*) obtenida, siendo PS el polvo que presentó un valor significativamente mayor ($p < 0,05$). Coincidentemente, Oberoi y Sogi (2015) también obtuvieron valores de L^* más bajos en polvos liofilizados de sandía en comparación con aquellos secados por aspersión, conteniendo entre 3-10% de maltodextrina.

Teniendo en cuenta que ambos polvos de sauco presentaron concentraciones similares de pigmentos (como se puede apreciar más adelante en la **Figura 4.6**), los distintos valores de L^* obtenidos podrían

deberse a las diferencias en el tamaño y la forma de las partículas generadas en cada polvo. Si bien en este trabajo este aspecto no fue estudiado, de acuerdo a la literatura analizada, se espera que PL presente partículas no uniformes y de mayor tamaño que aquellas presentes en PS. Autores como Franceschinis y col. (2014), obtuvieron polvos por secado por atomización y liofilización a partir de la formulación de jugos de zarzamora con maltodextrina (20 - 40%), y al analizar la morfología de partícula mediante microscopía electrónica de barrido observaron que los primeros presentaban partículas esféricas y más pequeñas que los liofilizados (de partículas más grandes e irregulares). Teniendo en cuenta que L^* , C^*_{ab} y h_{ab} son parámetros que dependen de la reflexión y absorción de la luz incidente, cuanto más pequeñas y homogéneas sean las partículas del polvo coloreado, mayor será la luz reflejada que la cantidad de luz absorbida (Gueli y col., 2016), dando como resultado una mayor luminosidad independientemente de un posible cambio en la saturación o ángulo de tono.

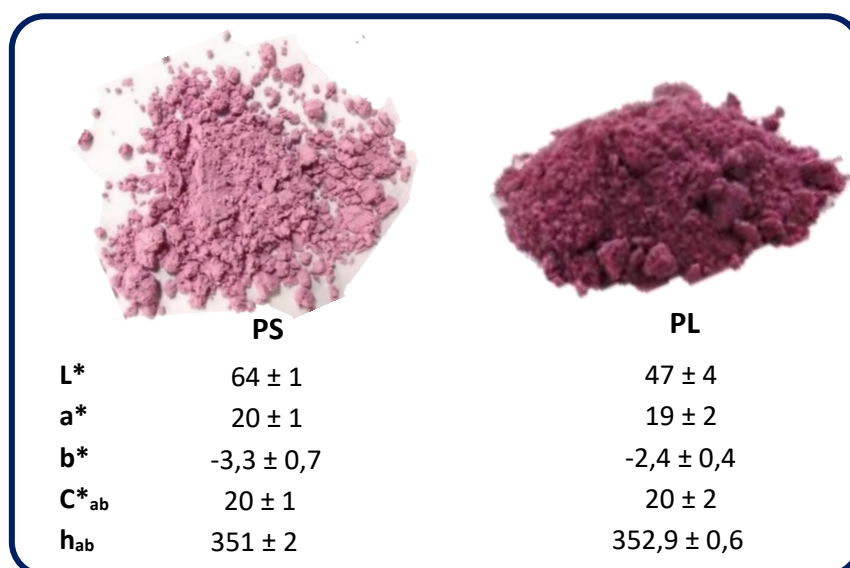


Figura 4.5. Aspecto y parámetros de color determinados en los polvos obtenidos a partir del extracto óptimo UO de sauco.

Otros autores han relacionado también variaciones de luminosidad con tamaño de partículas de polvos. Por ejemplo, Garrido-Makinistián (2020) analizó el proceso de secado por atomización para la obtención de polvos a partir de extractos de maqui. Si bien utilizó diferente tipo y concentración de adyuvante de secado, observó que el ángulo de tono no se vio afectado por las condiciones operativas, mientras que las principales diferencias se debían a la luminosidad y saturación. En este trabajo, el autor explica que los colores más oscuros ($< L^*$) se obtuvieron con bajos caudales de aire de atomización, que producen diámetros de gota más grandes, y consecuentemente tamaños de partícula mayores. Por otro lado, Haas y col. (2019), analizaron polvos atomizados de concentrados de zanahoria, atribuyendo el color más claro (mayor L^*) en polvos con partículas pequeñas a una mayor dispersión de la luz. Por otro lado, Taskin y col. (2021)

deshidrataron por liofilización frutos de arándano rojo (cranberry) que luego se molieron y tamizaron, obteniendo polvos de diferentes tamaños de partícula. Al evaluar el color de los mismos observaron un descenso de L^* a medida que las partículas aumentaban de tamaño a partir de los 200 μm .

Por otro lado, las diferencias de color podrían estar relacionadas con la forma en que los pigmentos se encapsulan a través de cada método. En el caso particular de secado por atomización, las partículas esféricas que se generan podrían exponer en su superficie una mayor proporción de moléculas de maltodextrina, que son blancas. En cambio, durante el proceso de liofilización se produciría una distribución más homogénea de carrier y pigmentos, mostrando una coloración intermedia de los compuestos presentes.

Evaluación del contenido de compuestos bioactivos en polvos PL y PS

El contenido de compuestos bioactivos en los polvos obtenidos se presenta en la **Figura 4.6**. Puede apreciarse que ambos polvos poseen cantidades similares de polifenoles, sin diferencias significativas en la AA final obtenida (**Figura 4.6a**). En cuanto al contenido en antocianinas (**Figura 4.6b**), los polvos retuvieron también adecuadamente los pigmentos presentes en el extracto formulado, observándose un aumento en PL y una leve pérdida en PS. La mayor preservación de pigmentos en los polvos liofilizados se debería a la menor temperatura del proceso de liofilización.

Además de ACY, se estudió el color polimérico (CP) de los polvos obteniendo valores similares al del extracto óptimo de partida ($\approx 3\%$) (**Figura 4.6b**). Estos resultados estarían indicando que no habría variación en el contenido de compuestos poliméricos correspondientes tanto a la presencia de antocianinas polimerizadas, como a productos pardos originados en reacciones de pardeamiento o degradación de antocianinas. Esto denota una alta protección de antocianinas monoméricas tanto durante el secado por aspersión como durante la liofilización.

En cuanto a los trabajos publicados sobre polvos atomizados o liofilizados obtenidos a partir de sauco, la bibliografía es escasa. Por ejemplo, Murugesan y Orsat (2011), formularon jugo de sauco con MD en una concentración entre 2-10% (m/m), obteniendo polvos por secado por atomización con un contenido de polifenoles mucho mayor (≈ 4200 mg ác. gálico/100g polvo) que el polvo PS del presente trabajo, lo que puede por un lado atribuirse a la concentración de bioactivos inicial en la fruta de partida, como al proceso de obtención del jugo mediante un extractor convencional. En relación al proceso de liofilización, Busso Casati y col. (2019) partieron de pulpas de sauco formuladas con 20% de MD (m/m) obteniendo también una concentración de polifenoles mayor que PL (1242 mg ác. gálico/100g), pero una concentración de antocianinas 43% menor (172 mg cyn-2-glu/100g). Estas diferencias pueden deberse no solo a la variabilidad asociada a la materia prima, sino también al diferente procesado inicial de los frutos de sauco, pudiendo el

tratamiento combinado de ultrasonido y extracciones sucesivas del presente trabajo, favorecer la preservación de los pigmentos antocíánicos en comparación con la pulpa utilizada por estos autores.

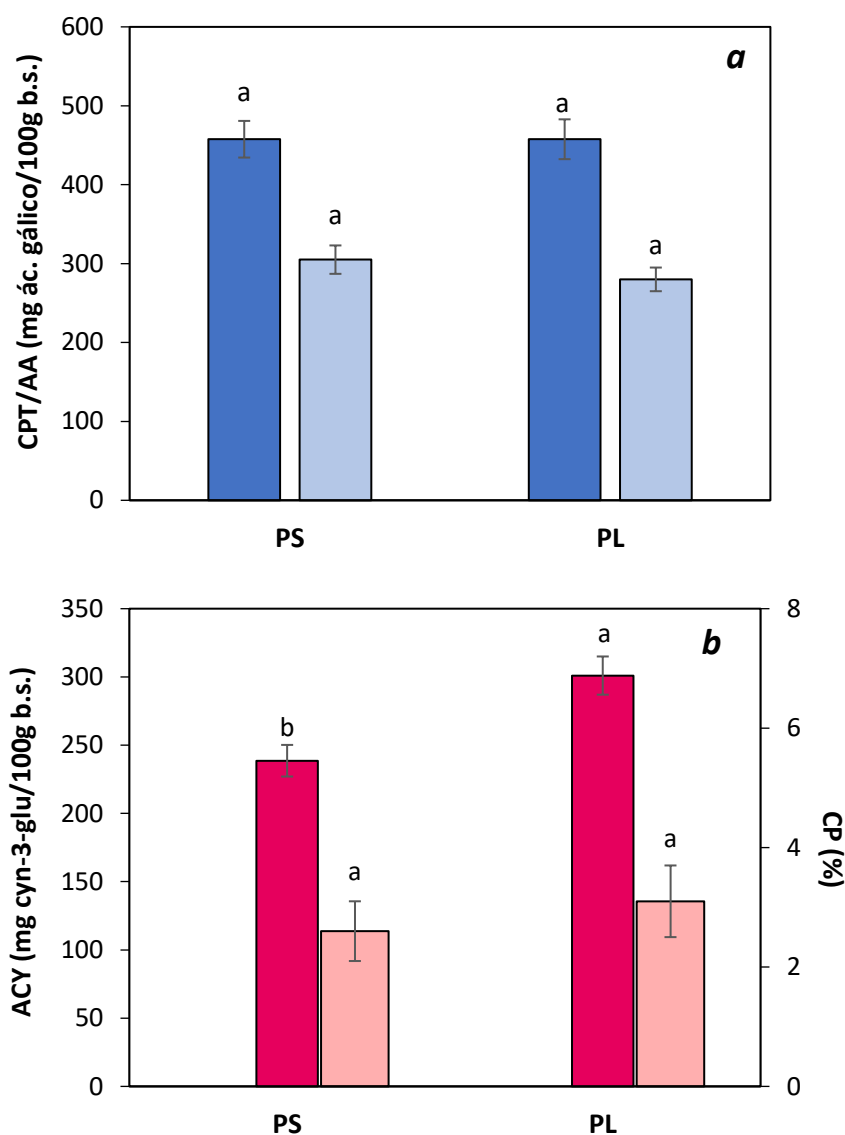


Figura 4.6. Contenido en: *a)* polifenoles (barras azules) y actividad antioxidante (barras celestes), *b)* antocianinas monoméricas (barras bordó) y color polimérico (barras rosas), para los polvos obtenidos por secado por atomización (PS) y liofilización (PL). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Son escasos los trabajos que incluyan una comparación en términos de potencial bioactivo, de polvos de berries obtenidos por secado por atomización y liofilización. Por ejemplo, Wilkowska y col. (2016) estudiaron jugos de arándanos adicionados con 15% de maltodextrina o ciclodextrinas analizando el efecto sobre el contenido de bioactivos y la actividad antioxidante. Los autores indican que la retención de bioactivos fue

1,5 veces mayor para los polvos liofilizados, principalmente en cuanto a antocianinas. Franceschinis y col. (2014) compararon polvos de zarzamora deshidratados por ambos métodos, obteniendo una mejor performance en polvos liofilizados debido a la posibilidad de utilizar una menor concentración de carrier (maltodextrina 20%), con un impacto en la concentración final de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

4.2.4. Consideraciones sobre extracción EAU y estabilización de extractos líquidos mediante distintos métodos de deshidratación

Los procesos de extracción analizados que consisten en el uso de ultrasonido y extracciones sucesivas en conjunto con la aplicación de distintos métodos de secado, dieron lugar a polvos que, si bien podrían ser utilizados como colorantes naturales o ingredientes funcionales, no presentaron una elevada concentración de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante (en comparación con otros estudios desarrollados a partir de sauco), lo que indicaría que no se ha explotado suficientemente el potencial bioactivo de estos frutos para el desarrollo de ingredientes funcionales. Es posible que para alcanzar un mayor nivel de extracción se requiera de un equipamiento de ultrasonido de una potencia mayor, lo cual significaría un costo de procesamiento elevado a escala industrial.

Por otro lado, se puede destacar que los dos métodos de secado estudiados permitieron obtener productos deshidratados en estado amorfo, con buenas propiedades de rehidratación y alta calidad. Sin embargo, el polvo liofilizado presentó una mayor retención de compuestos antocianínicos y una T_g mucho más elevada, así como también una menor humedad y a_w , siendo por lo tanto un producto con características más atractivas.

De acuerdo a estos resultados y su comparación con bibliografía es posible concluir que, si bien la utilización de ultrasonido continúa siendo una tecnología con potencial para mejorar la extracción de compuestos bioactivos en tejidos vegetales, en frutos del tipo de las berries como el sauco, es necesario explorar el uso de otras tecnologías dentro de las amigables con el medio ambiente, que permitan lograr un mayor rendimiento de extracción. En particular, la extracción asistida por enzimas surge como una alternativa interesante debido no sólo a los buenos resultados que han sido reportados con extractos de distintas berries sino porque las enzimas son consideradas aditivos alimentarios y tienen una amplia aplicación en diversas áreas de la industria. Su uso se extiende desde la obtención de jarabes y almidones modificados, fermentación y conservación en la industria láctea, mejora y rendimiento en masa de productos panificados, clarificación y mejora de extracción en vinos y jugos de frutas, hasta aplicación tecnológica en envases y biosensores (del Moral y col., 2015). Esto las convierte en un recurso disponible de

bajo costo y que puede implementarse fácilmente como tecnología de extracción de compuestos bioactivos a nivel industrial.

En la sección siguiente se presenta entonces el estudio posterior realizado utilizando el proceso de extracción asistida por enzimas, optando además por la liofilización como el método para preservar de mejor manera las propiedades bioactivas del nuevo extracto óptimo obtenido.

4.2.5. Extracción asistida por enzimas (EAE)

4.2.5.1. Optimización del proceso de extracción

Obtención del extracto óptimo (EO)

Como se verificó en la sección 4.1.2, la existencia de polifenoles y antocianinas formando complejos insolubles asociados a los polímeros que conforman la pared celular, convierte al uso de enzimas pectinasas en un tratamiento con potencial para liberar los compuestos bioactivos del tejido de la piel del fruto y generar extractos ricos en polifenoles, evitando el uso de otras técnicas no amigables con el medio ambiente como por ejemplo el uso de solventes orgánicos o inorgánicos. En este contexto, y con el fin de obtener un extracto de mayor concentración de bioactivos que el obtenido mediante EAU, se realizó un nuevo estudio de extracción, en este caso asistida por enzimas (EAE). Para ello se llevó a cabo un diseño multifactorial para encontrar las condiciones óptimas del proceso de extracción, considerando la temperatura ($T = X_1$) y la concentración de enzima ($C_E = X_2$) como variables independientes, y el contenido de polifenoles (CPT), el contenido de antocianinas monoméricas (ACY) y la actividad antioxidante (AA) como variables de respuesta. El comportamiento de las variables de respuesta se modeló utilizando polinomios de segundo grado, los cuales se ajustaron con un nivel de confianza de $\alpha = 0,05$, obteniendo las expresiones correspondientes, a las **ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3**, para CPT, ACY y AA, respectivamente.

$$y = -602,51 + 57,12 X_1 - 0,613 X_2 - 0,605 X_1^2 - 0,0332 X_1 X_2 + 0,00986 X_2^2 \quad (\text{ec. 4.1})$$

$$y = -1077,89 + 47,69 X_1 + 2,54 X_2 - 0,457 X_1^2 + 0,00234 X_1 X_2 - 0,00936 X_2^2 \quad (\text{ec. 4.2})$$

$$y = -568,88 + 38,09 X_1 - 1,08 X_2 - 0,379 X_1^2 - 0,0235 X_1 X_2 + 0,0121 X_2^2 \quad (\text{ec. 4.3})$$

La **Tabla 4.9** presenta los valores experimentales correspondientes a cada condición experimental ensayada, así como también los estadísticos utilizados para evaluar la bondad del ajuste (coeficiente de determinación R^2 y test de falta de ajuste, "lack of fit"). Dado que el valor-p para la falta de ajuste en los

resultados del ANOVA realizado fue mayor que 0,05 para todas las variables analizadas, los modelos parecen ser adecuados para los datos observados al nivel de confianza del 95%.

Tabla 4.9. Resultados obtenidos según el diseño experimental utilizado para la obtención de extractos de sauco mediante extracción enzimática.

Factor		Variables de respuesta		
T (°C)	C _E (ppm)	CPT* (mg ác. gálico/100g)	AA* (mg ác. gálico/100g)	ACY** (mg cyn-3-glu/100g)
40	80	630 ± 31 ^{Ba}	267 ± 46 ^{Ab}	267 ± 8 ^e
40	120	623 ± 18 ^{Ba}	296 ± 10 ^{Ab}	272 ± 13 ^{de}
40	160	646 ± 7 ^{Aa}	338 ± 40 ^{Aa}	271 ± 20 ^{de}
50	80	604 ± 33 ^{Ba}	291 ± 36 ^{Ab}	280 ± 10 ^{cd}
50	120	617 ± 19 ^{Ba}	294 ± 13 ^{Ab}	360 ± 8 ^{ab}
50	160	654 ± 4 ^{Aa}	346 ± 20 ^{Aa}	366 ± 9 ^a
60	80	525 ± 28 ^{Ca}	241 ± 7 ^{Bb}	312 ± 27 ^{cd}
60	120	487 ± 23 ^{Ca}	227 ± 37 ^{Bb}	312 ± 33 ^{cd}
60	160	498 ± 75 ^{Ca}	274 ± 7 ^{Ba}	320 ± 12 ^{bc}
R ²		0,873	0,736	0,765
Falta de ajuste		0,170	0,358	0,278

Cyn-3-glu: cianidina-3-glucósido.

*Efecto significativo de los factores individuales ($p < 0,05$). En cada columna, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el factor T. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas para el factor C_E.

**Resultados expresados en mg cianidina-3-glucósido/100g extracto. La interacción entre factores T*C_E fue significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas indican diferencias significativas para la interacción.

El ANOVA realizado no arrojó diferencias significativas en el rendimiento de extracción (RE) entre los distintos tratamientos analizados, obteniéndose valores similares y cercanos al 60%. Por otro lado, se obtuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) de la temperatura sobre las tres variables estudiadas, siendo la interacción de ambos factores significativa para la extracción de antocianinas. C_E afectó individualmente la actividad antioxidante pero no mostró efecto sobre CPT.

La **Figura 4.7** muestra las superficies de respuesta obtenidas, que facilitan la visualización del comportamiento de cada variable afectada por los factores estudiados. En cuanto a CPT, el efecto de la temperatura se manifestó al pasar de 50 a 60°C, donde se produjo un descenso en la concentración de polifenoles posiblemente debido al deterioro de estos compuestos por degradación térmica o a la disminución en la actividad enzimática a causa del aumento de la temperatura. Por otro lado, la concentración de enzima mostró un efecto poco relevante en toda la región del espacio, (**Figura 4.7a**).

Respecto de la actividad antioxidante, ambos factores presentaron efecto significativo, pero no la interacción entre los mismos (**Tabla 4.9**). Para una temperatura en particular, la decoloración del radical ABTS^{•+} aumentó con mayor cantidad de enzima en la muestra, siendo estos valores más altos a

temperaturas bajas (**Figura 4.7b**). En la condición 60°C-160 ppm, AA disminuyó casi un 20% respecto a los tratamientos con igual cantidad de enzima pero a menor temperatura, siendo concordante con la reducción en el contenido de polifenoles de los extractos obtenidos. La mayor actividad antioxidante se obtuvo a bajas temperaturas y alta concentración de enzima (**Figura 4.7b**).

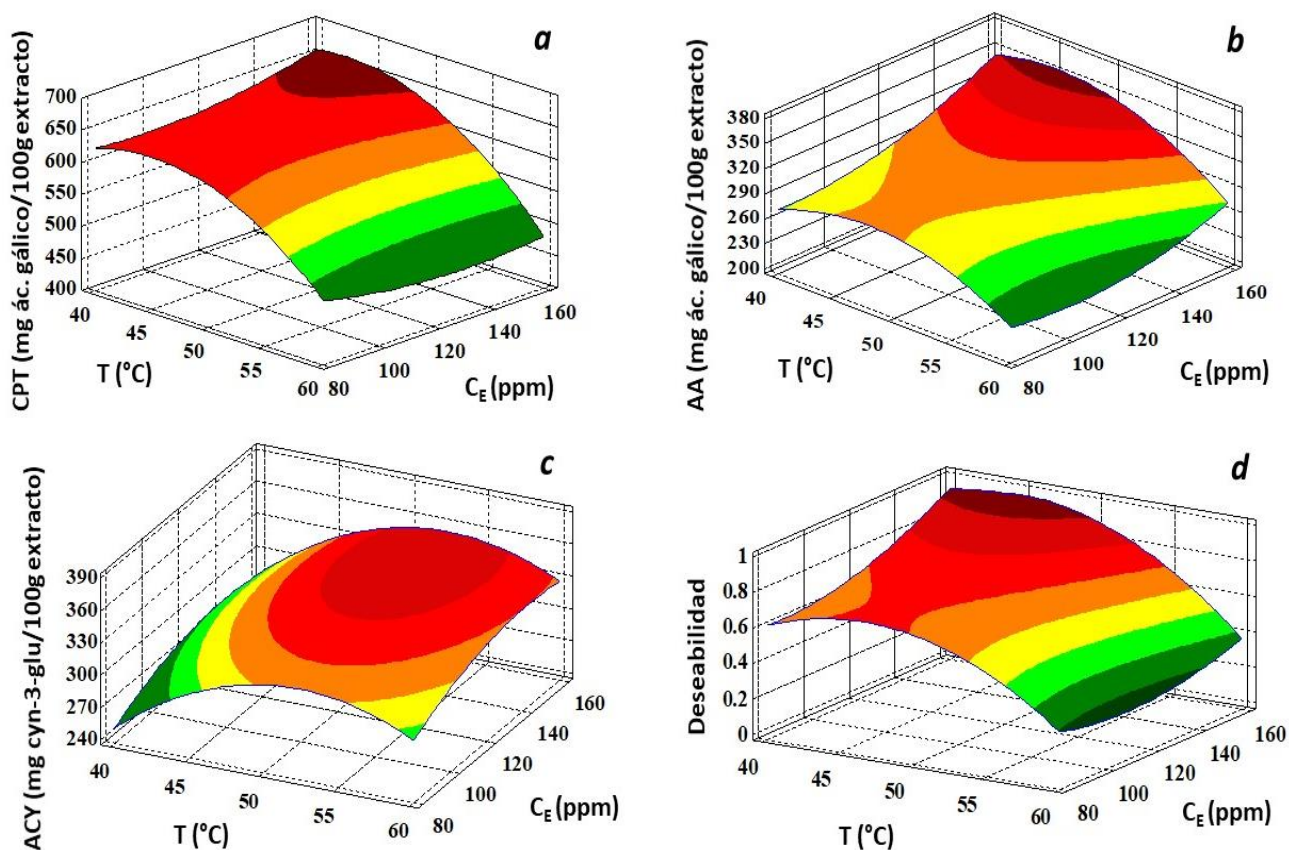


Figura 4.7. Gráficos de superficie de respuesta correspondientes al contenido de polifenoles totales CPT (a), actividad antioxidante AA (b), antocianinas monoméricas totales ACY (c) y a la función de deseabilidad *D* obtenida mediante la optimización por múltiples respuestas (d).

En cuanto a la concentración de antocianinas monoméricas, la superficie de respuesta presentó una curvatura cóncava, con valores máximos a temperaturas intermedias y concentraciones de enzima elevada (**Figura 4.7c**). La mejor condición para la liberación de pigmentos se logró a 50°C, con un claro efecto de la concentración de enzima, principalmente al pasar de 120 a 160 ppm. Si bien el aumento de temperatura favoreció la extracción de ACY al pasar de 40 a 50°C, el incremento hasta 60°C dio lugar a una disminución en la concentración final alcanzada, coherentemente con lo observado en los valores de CPT. Ello indicaría que temperaturas de maceración mayores que 50°C no serían recomendables para asegurar una mayor retención de compuestos bioactivos y de capacidad antioxidante en los extractos de sauco.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por otros autores. Landbo y Meyer (2004), al optimizar el proceso de extracción con enzimas pectinolíticas en grosella negra, observaron un efecto positivo de la temperatura sobre la liberación de antocianinas y compuestos fenólicos hasta 50°C, pero a 70°C se producía una disminución importante, sobre todo a tiempos largos de maceración (entre 50 y 300 min). Por otro lado, detectaron un rendimiento de extracción de antocianinas mucho mayor que el de polifenoles, atribuyendo este comportamiento a que, dentro de los compuestos fenólicos presentes en la fruta, las antocianinas glicosiladas están mayormente asociadas a las paredes celulares de la piel, por lo que una mayor degradación de polisacáridos de las paredes celulares del fruto producto de una mayor concentración de enzima, favoreció la liberación de estos compuestos. Swer y col. (2018) optimizaron la extracción de antocianinas de Sohiong (*Prunus nepalensis*), un fruto nativo de la India, utilizando temperaturas entre 35-50°C y concentraciones de celulasa entre 5-15%. En concordancia con los resultados de este trabajo, reportaron que un aumento en la concentración de enzima no provocaba un aumento en CPT, siendo la temperatura el único factor con efecto positivo sobre la extracción de estos compuestos. Con respecto a ACY, observaron una mayor extracción con el aumento de la concentración, hasta un cierto valor manteniéndose luego constante.

Priorizando el aumento de bioactivos y la actividad antioxidante del extracto, se calcularon las condiciones óptimas de extracción de acuerdo a la función de deseabilidad D. La superficie obtenida (**Figura 4.7d**) indica que, para la máxima deseabilidad resultante ($D = 0,96$), las condiciones experimentales óptimas fueron 45,3°C para T y 160 ppm para C_E . Los resultados predichos en estas condiciones óptimas fueron CPT = 656 mg ác. gálico/100g, ACY = 326 mg cyn-3-glu/100g y AA = 353 mg ác. gálico/100g.

Caracterización del extracto EO

El proceso de extracción enzimática se repitió utilizando las condiciones óptimas (45°C y 160 ppm), obteniendo resultados consistentes con los predichos. Adicionalmente se estudió un jugo de sauco control (J), el cual no había recibido tratamiento térmico ni enzimático. La **Tabla 4.10**, que presenta la caracterización fisicoquímica tanto del extracto enzimático óptimo (EO) como del jugo control, muestra que los valores de acidez, pH, sólidos solubles y color del extracto EO fueron similares a los obtenidos para J, sin embargo, se observó una mejora importante en CPT y ACY (43,7 y 42,0%, respectivamente), lo que se tradujo en una mejora en AA de 46% (desde 201 ± 22 mg ác. gálico/100g a 294 ± 12 mg ác. gálico/100g).

En los estudios existentes en bibliografía sobre extracción enzimática de sauco (Kaack y col., 2008; Szalóki-Dorkó y col., 2015), no se observó una mejora significativa en la concentración de compuestos fenólicos luego de la extracción con enzimas pectinolíticas, lo que probablemente se deba a que estos

estudios no involucraron una optimización de las condiciones de extracción, siendo solamente estudios comparativos de distintos genotipos o variedades de sauco.

Tabla 4.10. Propiedades fisicoquímicas del jugo de sauco (J) y el extracto enzimático óptimo (EO).

Propiedad	EO	J
Sólidos solubles (g sólidos/100 g)	11,5 ± 0,4 ^b	9,5 ± 0,2 ^a
Acidez (mg ác. cítrico/100 g)	0,65 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,02 ^a
pH	4,16 ± 0,02 ^b	4,24 ± 0,02 ^a
Color		
L*	13,8 ± 0,3 ^a	14 ± 2 ^a
a*	3,3 ± 0,3 ^b	1,4 ± 0,4 ^a
b*	0,8 ± 0,4 ^a	0,4 ± 0,3 ^a
C* _{ab}	3 ± 1 ^b	1,5 ± 0,5 ^a
h _{ab}	14 ± 8 ^a	14 ± 9 ^a
CPT (mg ác. gálico/100 g)	502 ± 13 ^a	341 ± 19 ^b
ACY (mg cyn-3-glu/100 g)	284 ± 16 ^a	201 ± 13 ^b
AA (mg ác. gálico/100 g)	294 ± 12 ^a	201 ± 22 ^b

Diferentes letras minúsculas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Teniendo en cuenta otras bebidas consideradas como fuente de antioxidantes, el aporte en polifenoles de un vaso de EO de sauco sería diez veces mayor que el aporte de un vaso de vino (Scalbert y col., 2005), y tres veces mayor que el de un vaso de jugo de arándanos (Granato y col., 2015).

Evaluación de la toxicidad del extracto EO

El sauco es una especie conocida por contener glucósidos cianogénicos (GCs) en semillas y frutos inmaduros, que pueden ser potencialmente tóxicos si se consumen en altas dosis (Olejnik y col., 2016). Knudsen y Kaack (2015) informan que el consumo de cualquier parte de la planta de sauco, inclusive de frutos inmaduros o frescos en gran cantidad, pueden causar náusea, vómitos y diarrea severa. En el caso de los frutos maduros, la mayor preocupación radica en la presencia de glucósidos cianogénicos en la semilla, pero se ha comprobado que el tratamiento térmico o la cocción de las frutas o del jugo de sauco, provoca la remoción del HCN producido, a causa de su volatilidad.

Si bien en el presente trabajo se utilizaron frutos maduros, se realizó igualmente un estudio de citotoxicidad del extracto EO con el fin de garantizar la seguridad del mismo, mediante un ensayo *in vitro* con células Vero. Los resultados obtenidos (**Tabla 4.11**) indican que el extracto EO no afectó la viabilidad celular (valores cercanos al 100%) para el rango de concentraciones evaluado (0-7000 µg/ml), al no presentar

diferencias significativas respecto a la muestra control (ausencia de extracto EO en el cultivo celular). Esto indicó que el extracto no presentó efectos tóxicos sobre el cultivo celular.

Tabla 4.11. Porcentaje de viabilidad celular en respuesta a las concentraciones de extracto óptimo de sauco (EO) estudiadas en el ensayo de citotoxicidad con células Vero.

Concentración (µg/ml)	Viabilidad celular (%)
0	100 ± 16
164	103 ± 17
328	104 ± 17
657	96 ± 15
3283	96 ± 15
6566	99 ± 11

Senica y col. (2016) han determinado que el contenido de GCs en el fruto de sauco es menor que el que se produce en hojas y flores, por lo cual, teniendo en cuenta el proceso de obtención del extracto EO, durante la etapa de trituración de la fruta que involucra la presencia de semillas del fruto, podrían liberarse GCs, como también facilitar la reacción de hidrólisis entre β -glucosidasas propias del sauco con los compuestos tóxicos. Además, es posible que los tratamientos térmicos aplicados (maceración a 45°C durante 1 h, e inactivación enzimática a 80°C durante 1 min) sumado a la trituración inicial hayan sido suficientes para hidrolizar los GCs, generando un extracto no tóxico y seguro para su utilización y consumo.

Habiendo corroborado que el extracto no presenta riesgos para la salud en el caso de llegar a consumirse, y teniendo en cuenta por otro lado los resultados previos obtenidos al comparar distintas técnicas de deshidratación del extracto UO, se decidió utilizar para este nuevo extracto optimizado por vía enzimática el proceso de liofilización. Se optimizó además este proceso de deshidratación estudiando distintas formulaciones previas del extracto con el objetivo de lograr un polvo liofilizado de óptima calidad desde el punto de vista de su potencial bioactivo, preservando al mismo tiempo sus propiedades físicas. Los resultados se presentan a continuación.

4.2.6. Optimización del proceso de liofilización

Varios estudios han demostrado la importancia de encontrar la cantidad adecuada de encapsulante que permita obtener un polvo con buenas propiedades físicas, sin provocar un efecto de dilución en la concentración de bioactivos presentes en el extracto o jugo de partida (Franceschinis y col., 2014; Garrido-Makinistian y col., 2019b; Baeza y col., 2020). Con el fin de hallar la concentración mínima de adyuvante necesaria para obtener un polvo liofilizado de buena calidad, se formuló el extracto enzimático óptimo EO

con distintas concentraciones de adyuvante (0, 5, 10, 15 y 20%, m/m), analizando al mismo tiempo la humedad y temperatura de transición vítrea finales luego del proceso de deshidratación (**Figura 4.8**).

Como era de esperar, la temperatura de transición vítrea aumentó y el contenido acuoso disminuyó a medida que el polvo contenía mayor proporción de maltodextrina. De acuerdo a los valores obtenidos para cada concentración, las formulaciones con encapsulante en una concentración superior al 10%, garantizarían la obtención de polvos estables a temperatura ambiente (25°C). Sin embargo, priorizando el objetivo de no generar un efecto de dilución en el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, la formulación con 10% de maltodextrina sería la mínima necesaria para obtener un polvo con baja humedad y alta temperatura de transición vítrea.

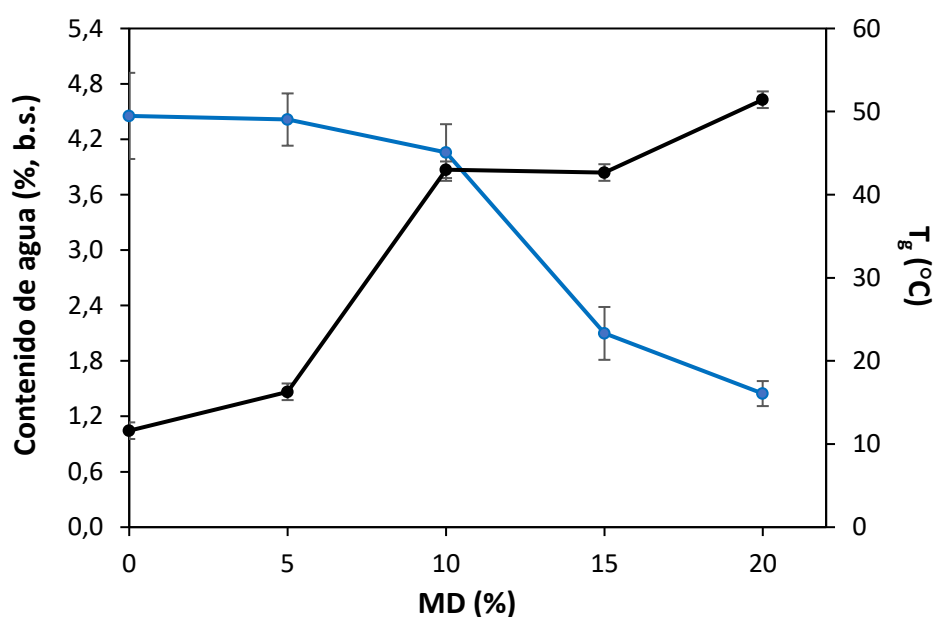


Figura 4.8. Humedad (línea azul) y temperatura de transición vítrea (T_g , línea negra) para cada polvo liofilizado obtenido a partir del estudio de formulación del EO con diferentes concentraciones de maltodextrina (MD).

4.2.7. Caracterización del ingrediente óptimo

Propiedades físicas

Habiendo hallado la mínima concentración de MD necesaria para formular el extracto óptimo EO, se repitió la preparación y liofilización del EO con 10% de MD, de modo de caracterizar el ingrediente obtenido. El contenido de agua en el producto final fue de $3,3 \pm 0,2$ g agua/100g ms con una actividad acuosa de $0,28 \pm 0,02$, ambos valores acordes para un producto deshidratado. El valor de T_g fue de $43 \pm 1^\circ\text{C}$, en concordancia

con el estudio de formulación realizado previamente. También se analizó la solubilidad del polvo, la cual fue muy elevada con un valor de $90 \pm 1\%$.

En cuanto al color (**Figura 4.9**), el ingrediente liofilizado presentó valores de a^* y b^* positivos, ubicándose en el primer cuadrante del círculo cromático, asociado a los colores rojo y amarillo. Los valores de saturación y ángulo de tono indican que este polvo liofilizado presenta tonalidades más rojizas que el polvo liofilizado UO (**Figura 4.5**), siendo aún más oscuro por su menor luminosidad. Esto podría deberse a la menor proporción de MD en EO que en UO, además de la mayor eficiencia en la extracción de pigmentos mediante extracción enzimática.

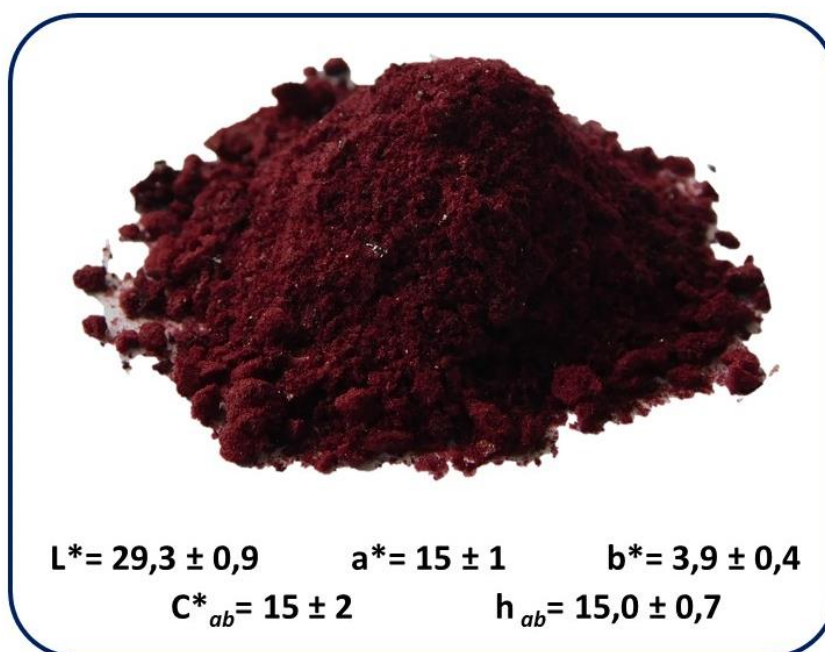


Figura 4.9. Aspecto y parámetros de color del polvo liofilizado obtenido a partir de la formulación óptima del extracto EO.

Para analizar la estabilidad del ingrediente, se estudió la isoterma de sorción de agua a 20°C y la evolución de la T_g en función de la humedad relativa (HR) (**Figura 4.10**). La temperatura de transición vítrea disminuyó a medida que aumentó el contenido acuoso, debido al efecto plastificante del agua en la estructura del sistema, que aumenta la movilidad molecular, provocando el pasaje del estado vítreo al estado sobreenfriado (Roos, 2010). El colapso y la pegajosidad del polvo pudieron observarse visualmente en las muestras almacenadas a valores de $HR \geq 43\%$. Estos resultados muestran la necesidad de almacenar el polvo en un envase con buen material de barrera a la humedad ambiente, de modo de garantizar su estabilidad física.

Comportamientos similares fueron observados en polvos liofilizados de murra y maqui, con 20% de maltodextrina (Gomez Mattson y col., 2020), en los cuales la temperatura de transición vítrea fue mayor que

25°C hasta 43% de HR. Por otro lado, Franceschinis y col. (2014), al estudiar el comportamiento de sorción de agua en polvos liofilizados de zarzamora a 20°C, observaron que para HR superiores al 40%, el contenido de agua en los polvos fue cercano al 10% (b.s.), con valores de T_g menores a 20°C. Estos resultados refuerzan la importancia de estudiar la sorción de agua de un producto deshidratado en conjunto con la temperatura de transición vítrea, con el fin de seleccionar las condiciones de almacenamiento más adecuadas para el producto en cuestión.

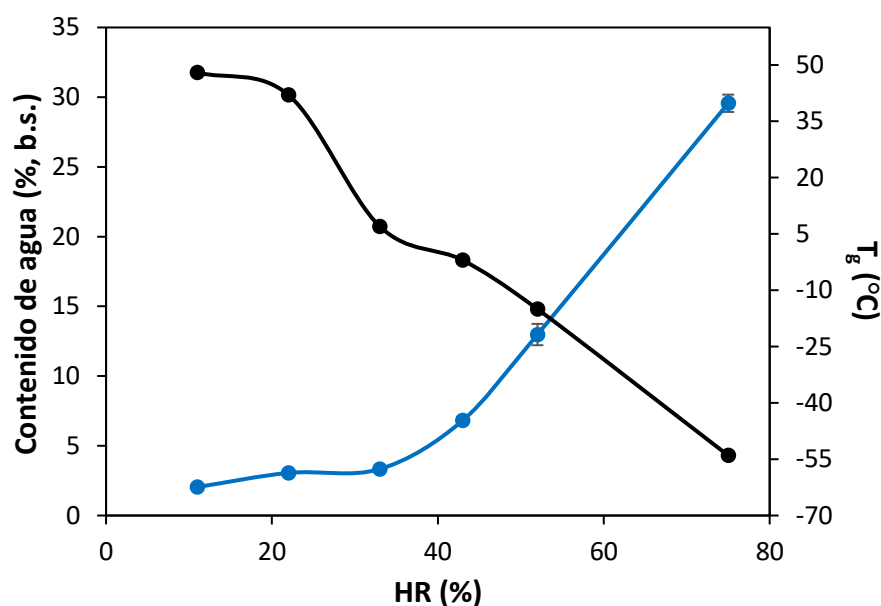


Figura 4.10. Contenido de agua (línea azul) y temperatura de transición vítrea (línea negra) del ingrediente liofilizado EO, almacenado a 20°C y diferentes humedades relativas (HR).

Contenido de compuestos bioactivos

El ingrediente liofilizado presentó un alto contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante (CPT= 2637 ± 57 mg ác. gálico/100g; ACY= 1399 ± 120 mg cyn-3-glu/100g; AA= 1385 ± 310 mg ác. gálico/100g de polvo). Con el fin de analizar la recuperación de bioactivos en el polvo liofilizado, el mismo se reconstituyó adicionando agua destilada hasta llegar al contenido de agua del extracto enzimático óptimo (EO). Se obtuvieron valores similares a los obtenidos en EO, tanto en términos de capacidad antioxidante (AA= 262 ± 57 mg ác. gálico/100g) como de concentración de polifenoles y antocianinas (CPT= 501 ± 10 mg ác. gálico/100g y 265 ± 21 mg cyn-3-glu/100g), lo que indica una elevada recuperación de compuestos bioactivos (100% para CPT, 93% para ACY y un 89% para AA) luego del proceso de liofilización (**Tabla 4.10**).

Adicionalmente se analizó la concentración individual de polifenoles, tanto antociánicos como no antociánicos, mediante HPLC (**Tabla 4.11**), y se comparó el contenido de los distintos grupos entre fruta

fresca, extracto EO y polvo liofilizado. Puede apreciarse que los compuestos fenólicos presentes en la fruta prevalecieron tanto en el extracto líquido como en el polvo liofilizado, siendo estos resultados análogos a los obtenidos mediante técnicas colorimétricas. La proporción de los grupos principales de polifenoles (antocianinas, flavan-3-oles, flavonoles y ácidos fenólicos) se mantuvo sin muchas diferencias, a pesar de los tratamientos aplicados a lo largo de las distintas etapas de procesamiento (**Figura 4.11**).

Tabla 4.11. Contenido de compuestos fenólicos determinados por HPLC para fruta fresca, EO y polvo liofilizado. Valores expresados como mg/g muestra.

Fenoles		Fruta fresca	EO	Polvo liofilizado
Ácidos fenólicos Totales		0,11 ± 0,07	0,21 ± 0,06	0,63 ± 0,03
Ácidos Hidroxibenzoicos	Gálico	0,057 ± 0,004	0,15 ± 0,03	0,46 ± 0,04
	Elágico	0,006 ± 0,002	0,008 ± 0,004	<LDC
	Clorogénico	0,045 ± 0,003	0,048 ± 0,001	0,16 ± 0,01
Ácidos Hidroxicinámicos	Ferúlico	0,0010 ± 0,0002	<LDC	<LDC
	p-Cumárico	0,0010 ± 0,0007	0,0024 ± 0,0006	0,010 ± 0,004
	Cafeico	nd.	nd.	nd.
Flavan-3-oles Totales		0,28 ± 0,02	0,41 ± 0,08	1,81 ± 0,09
(+) -Catequina		0,28 ± 0,02	0,41 ± 0,08	1,81 ± 0,09
(-) -Epicatequina		nd.	nd.	nd.
Flavonoles Totales		0,32 ± 0,06	0,46 ± 0,04	1,99 ± 0,08
Quercetina		0,014 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,010 ± 0,003
Rutina		0,31 ± 0,05	0,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Antocianinas Totales		1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	7,7 ± 0,3
Cyn-3-glu/Cyn-3-samb		1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2	6,8 ± 0,2
Cyn-3-diglu/Cyn-3-samb-5-glu		0,09 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,89 ± 0,07
Delf-3-glu		nd.	nd.	nd.
Total		2,3 ± 0,3	3,2 ± 0,2	12 ± 1

Cyn-3-glu: Cianidina-3-O-glucósido. Cyn-3-samb: Cianidina-3-O-sambubiosido. Cyn-3-diglu: Cianidina-3,5-O-diglucósido. Cyn-3-samb-5-glu: Cianidina-3-sambubiosil-5-glucósido. Delf-3-glu: Delfinidina-3-glucósido.

nd.: no detectado.

LDC: límite de cuantificación (0,05 mg/g)

Para evaluar el comportamiento de los pigmentos, además del contenido de compuestos antocianínicos, tanto totales como individuales, se analizó también el color polimérico del extracto EO y del polvo liofilizado, obteniendo valores similares (CP= 8 ± 1 y 6,0 ± 0,3 %, respectivamente). Esto indicaría que no se habrían

generado nuevos pigmentos polimerizados, ya sea por formación de complejos o por generación de compuestos pardos producto de degradación de antocianinas o de reacciones de Maillard, que pueden contribuir al color polimérico. La elevada protección de antocianinas en su forma monomérica debido a las bajas temperaturas utilizadas en el proceso de deshidratación, permitió la preservación del color del polvo, el cual se mantuvo en la tonalidad típica de los frutos de sauco.

Además de la cuantificación de compuestos bioactivos, se realizó nuevamente un análisis cualitativo mediante ATR-FTIR, con el fin de corroborar posibles cambios en los compuestos presentes en el polvo luego de la extracción enzimática y la liofilización. La **Figura 4.12** compara los espectros obtenidos para el fruto de sauco (espectro previamente presentado en la **Figura 4.1**) y el polvo liofilizado. Se observa en el espectro del polvo que se mantienen los picos de la fruta, atribuyendo este comportamiento nuevamente a la metodología de deshidratación en frío, que permitió la preservación de los compuestos bioactivos.

Las principales vibraciones observadas en el polvo correspondieron a vibraciones de tensión a altas frecuencias, de enlaces O-H (3274 cm^{-1}), C-H (2939 cm^{-1}), grupos carbonilo (C=O) a 1721 cm^{-1} , y vibraciones asociadas a la presencia de enlaces C=C presentes en los anillos aromáticos a 1639 cm^{-1} . Al igual que en la fruta, se observaron picos entre $1510\text{--}1183\text{ cm}^{-1}$ y a 1023 cm^{-1} asociados a los modos vibracionales de flexión de los enlaces O-H, C-H y a grupos metilo (CH_3), y un pico pronunciado a 1023 cm^{-1} , generado por modos de flexión y estiramiento correspondientes a enlaces C-O, C-C- y C-C-H, presentes en azúcares simples.

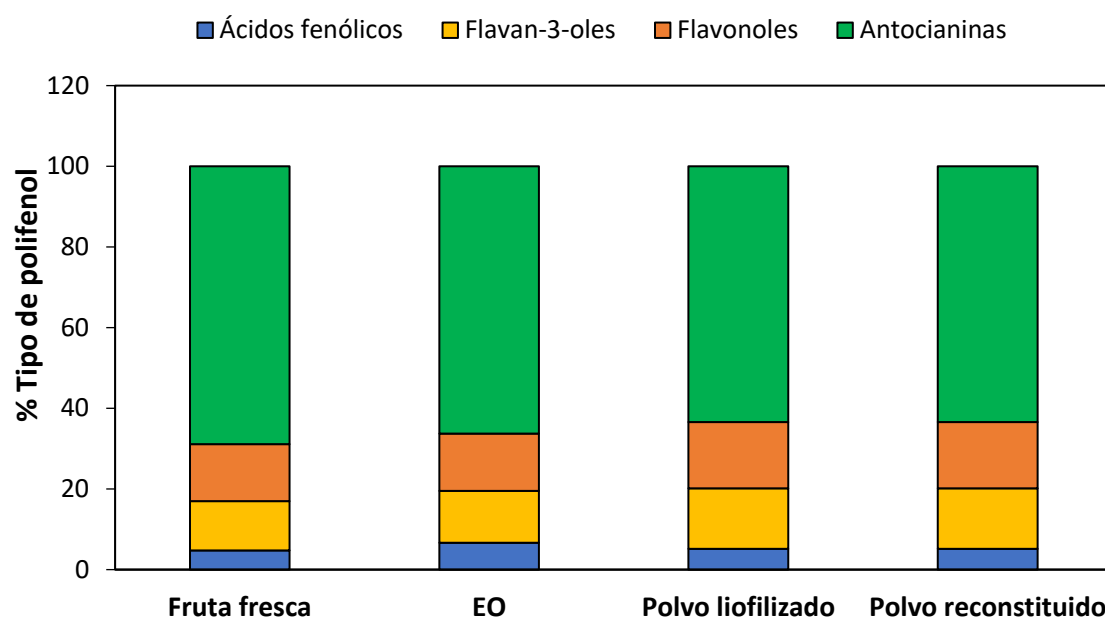


Figura 4.11. Proporción de familias de polifenoles presentes en la fruta fresca, el extracto EO y el polvo liofilizado y reconstituido.

Las principales diferencias se observan en la intensidad de los picos característicos, siendo los valores de transmitancia alcanzados en el espectro del polvo mucho menores (mayor absorción) en comparación con los de la fruta. El hecho de que la absorción de radiación infrarroja fue mucho más intensa en el polvo podría deberse, según la ley de Lambert-Beer, al aumento en la concentración tanto de azúcares, ácidos orgánicos como de compuestos fenólicos presentes en la muestra (Clark y col., 2018). Este comportamiento concuerda con el análisis cuantitativo realizado luego de la obtención del polvo (**Tabla 4.11**).

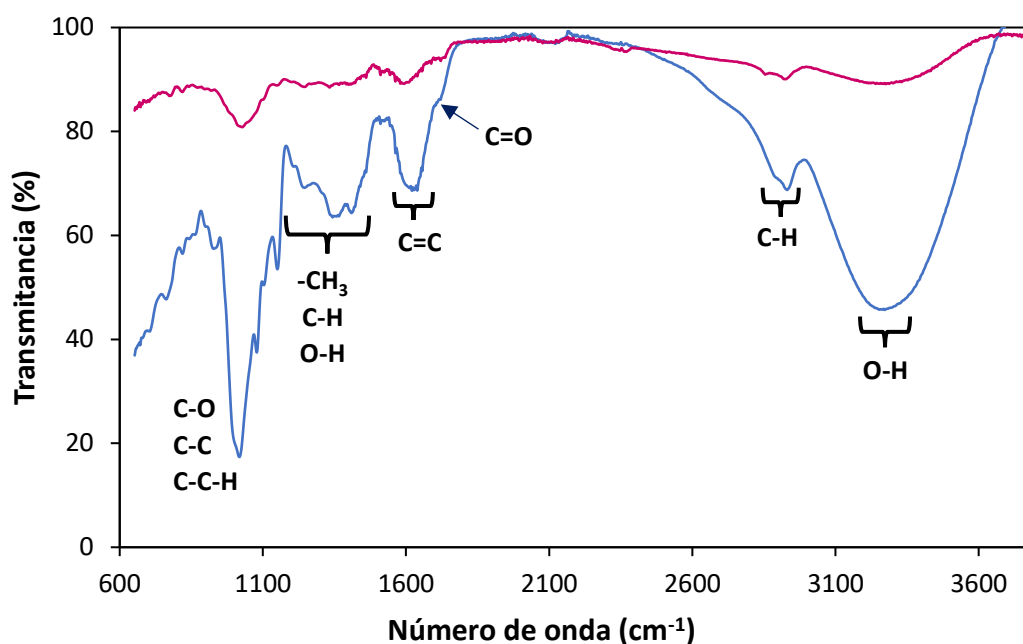


Figura 4.12. Espectro de absorción IR para frutos de sauco (rosa) y el polvo liofilizado a partir del extracto EO (celeste). Se encuentran indicadas las vibraciones de flexión y tensión de distintos enlaces presentes en los compuestos fenólicos, para el polvo liofilizado.

A su vez, el pico asociado a vibraciones de tensión correspondientes al enlace O-H (el cual se encuentra presente en la mayoría de los compuestos fenólicos, azúcares y ácidos orgánicos), presenta una forma más puntiaguda en comparación tanto con el espectro de la fruta, como con el pico asociado a flexiones C-H presentes en el polvo. Mondragón Cortes (2020) reportó que el aumento en la intensidad y ancho del pico a 3200 cm^{-1} , no sólo involucra las vibraciones entre átomos de oxígeno e hidrógeno, sino también a las generadas en los enlaces de tipo “puente de hidrógeno” (O---H). Al deshidratar la muestra, estas interacciones que se daban entre moléculas de agua y con otros compuestos, se generarían entre compuestos orgánicos, como polifenoles y azúcares que, al estar más concentrados en el polvo, se manifiestan como un pico más intenso y agudo. Un comportamiento similar fue observado por Rosas-Mendoza y Fernandez-Muñoz (2012), durante la deshidratación osmótica de mango con una solución de

sacarosa, observando cambios en la intensidad y frecuencia de aparición de algunos picos entre 900-1200 cm^{-1} (principalmente el estiramiento de O-H a 1650 cm^{-1}), al comparar las muestras osmodeshidratadas con el mango fresco. Los autores manifiestan que esto ocurre cuando las interacciones del tipo puente de hidrógeno existentes entre la sacarosa y el agua de la solución, son sustituidas por enlaces intermoleculares del mismo tipo entre la sacarosa y los compuestos presentes en el mango, como pectinas.

El estudio cualitativo mediante ATR-FTIR en berries procesadas ha sido analizado por otros autores. En cuanto al comportamiento en los espectros, en primer lugar, Gagneten (2020) analizó la aplicación de pulsos de campos eléctricos (PEF) durante la obtención de jugos de grosella negra. Si bien se trataba de muestras líquidas, Gagneten (2020) observó un aumento en la intensidad de los picos luego de la aplicación de PEF, que también fue atribuido a una mayor concentración de polifenoles luego del tratamiento de extracción. Por otro lado, Estupiñan-Amaya y col. (2020), obtuvieron polvos liofilizados de arándano Andino con diferentes concentraciones de maltodextrina (20-50%). En este trabajo, los autores detectaron picos asociados a vibraciones características de compuestos fenólicos encontrados en extractos ricos en antocianinas (enlaces C=O a 1712 cm^{-1} ; vibraciones de enlaces C=C a 1630 y 1521 cm^{-1}). Por otro lado, analizaron la posible interacción ocasionada por la presencia de maltodextrina, concluyendo que el carrier se comportó de forma inerte, al no generarse corrimientos o aparición de nuevos picos. Estos resultados coincidirían con lo observado en el polvo y la fruta de sauco, estudiados en el presente trabajo.

Por otro lado, Gomez Mattson y col. (2021), compararon polvos liofilizados de murra y maqui, obtenidos a partir de extractos sonicados y formulados con 20% de maltodextrina. Estos autores detectaron picos similares entre 1800-900 cm^{-1} , mientras que, al comparar el espectro de las frutas con los correspondientes polvos liofilizados, se observó un corrimiento a mayores números de onda ($\Delta\nu \approx 43 \text{ cm}^{-1}$) para la banda correspondiente al estiramiento del enlace O-H. Este comportamiento fue asociado a la disminución de interacciones tipo puente de hidrógeno, a causa de la copigmentación intermolecular entre antocianinas y otros polifenoles, siendo este efecto más intenso en los polvos de murra, los cuales habían presentado además un aumento importante en CP, confirmando una mayor presencia de compuestos poliméricos. El hecho de que no se haya producido este corrimiento en el polvo liofilizado de sauco del presente trabajo, se correlaciona con los valores constantes de CP, verificando así mediante otra técnica la predominancia de antocianinas monoméricas.

Las distintas técnicas de análisis de compuestos bioactivos utilizadas permitieron corroborar el efecto beneficioso de la aplicación de EAE, como técnica de extracción para recuperar los compuestos con capacidad antioxidante y colorante presentes inicialmente en los frutos de sauco, así como también del proceso de liofilización como tecnología de deshidratación adecuada para la preservación de los mismos en el ingrediente en polvo desarrollado.

4.3. Digestibilidad *in vitro* y bioaccesibilidad del ingrediente liofilizado a partir de EO

Habiendo cumplido con el objetivo de optimizar la extracción de compuestos bioactivos (polifenoles antociánicos y no antociánicos) presentes en frutos de sauco, y de obtener un ingrediente en polvo con buenas propiedades físicas y máxima concentración de estos compuestos, se analizó la bioaccesibilidad de los mismos, así como también de la capacidad antioxidante. Para ello se partió de un jugo preparado con el polvo liofilizado que fue sometido a un proceso de digestión *in vitro*.

La fracción soluble obtenida luego la digestión contiene aquellos compuestos fenólicos que resistirían el pasaje a través del tracto gastrointestinal (TGI) y estarían disponibles para ser absorbidos por las células intestinales (Minekus y col., 2014). Los valores obtenidos para la fracción soluble generada luego del proceso de digestión *in vitro* del jugo preparado con el ingrediente liofilizado fueron: $0,29 \pm 0,02$ mg ác. gálico/g para CPT, para AA $0,21 \pm 0,02$ mg ác. gálico/g y $0,093 \pm 0,006$ mg cyn-3-glu/g para ACY. De acuerdo a esto, la bioaccesibilidad de polifenoles y antocianinas fue de 39% y 23%, respectivamente, mientras que para la actividad antioxidante, la bioaccesibilidad superó el 50%. Varios estudios realizados en diferentes berries informan una pérdida entre 50-80% de antocianinas y polifenoles luego de la etapa de digestión intestinal, en comparación con muestras no digeridas (Thomas-Valdés y col., 2018). A su vez, Olejnik y col. (2016) estudiaron la digestión de pulpas de sauco liofilizadas, informando una pérdida significativa de antocianinas y polifenoles, entre la fase estomacal y el intestino delgado. La pérdida de ACY puede atribuirse principalmente a las condiciones alcalinas en las que se encuentra la fase intestinal, ya que causarían la ruptura del anillo principal de estos compuestos, que a su vez puede resultar en una pérdida de la capacidad antioxidante (Fredes y col., 2018). Sin embargo, el descenso significativo en la concentración de ACY luego de la digestión no implica necesariamente la completa pérdida o no absorción de estos compuestos, ya que se ha demostrado que alrededor del 20% de lo digerido puede absorberse durante la fase estomacal (Fernandes y col., 2014). Finalmente, más allá de la concentración final de bioactivos luego de la digestión, el impacto sobre AA fue menos severo, probablemente a causa de la liberación o generación de nuevas moléculas con propiedades antioxidantes.

Para profundizar estos estudios se analizó el transporte de estos compuestos a través de células intestinales, con el fin de detectar la actividad antioxidante que éstos podrían ejercer al llegar al torrente sanguíneo. La fracción soluble obtenida al cabo de la digestión *in vitro* presentó una AA = $0,105$ mg ác. gálico/ml, que luego del transporte mediante el sistema de células Caco-2, fue de $0,047 \pm 0,001$ mg ác. gálico/ml. Estos resultados son favorables ya que implican que un 50% de los compuestos antioxidantes presentes en el fluido digerido del jugo de sauco pueden ser recuperados. Por otro lado, parte de estos compuestos pueden haber sido utilizados por las células Caco-2.

Diferentes estudios sobre compuestos antioxidantes como derivados de cúrcuma (Zeng y col., 2017) y proantocianidinas (Deprez y col., 2001), entre otros, indicaron que la difusión pasiva o paracelular pueden ser los principales mecanismos de transporte para este tipo de compuestos. En el caso de los antioxidantes presentes en el jugo de sauco, es muy probable que su transporte haya ocurrido mediante los mismos mecanismos.

Teniendo en cuenta estos resultados, en conjunto con los obtenidos luego de la digestión *in vitro*, fue posible observar que un cuarto del total de la actividad antioxidante del polvo reconstituido, es capaz de llegar al torrente sanguíneo. Aunque se hayan utilizado estudios *in vitro*, estos análisis constituyen un acercamiento a la contribución real de la actividad antioxidante que los bioactivos presentes en los alimentos pueden proveer a través de su ingesta.

4.4. Estabilidad durante el almacenamiento del ingrediente de sauco liofilizado

En general los productos deshidratados son diseñados de forma de mantener sus propiedades físicas durante el almacenamiento. Sin embargo, es sabido que en estos productos, sobre todo aquellos a base de berries, pueden ocurrir cambios en la composición química debido a reacciones de deterioro a causa de las condiciones de almacenamiento, lo que puede alterar no sólo las propiedades potencialmente funcionales de los productos desarrollados sino también características organolépticas importantes como por ejemplo el color (Rocha-Parra y col., 2016).

Algunos autores (como Howard y col., 2012) han reportado que la pérdida por ejemplo de polifenoles que puede tener lugar durante el almacenamiento puede ser más severa que la producida durante el procesamiento. Dada la naturaleza inestable de las moléculas de polifenoles y de antocianinas ante cambios de temperatura, luz, exposición al O₂, humedad, entre otros, resulta relevante estudiar la estabilidad de estos compuestos durante el almacenamiento, sobre todo de los compuestos antociánicos, que como hemos visto constituyen el principal grupo de polifenoles en frutos de sauco y son responsables de su color característico.

De acuerdo a la caracterización fisicoquímica realizada sobre el polvo liofilizado (sección 4.2.7), un envase con buena barrera al vapor de agua y temperaturas por debajo de la T_g serían condiciones adecuadas para preservar las propiedades físicas del producto. Se estudió entonces la estabilidad del mismo ante diferentes condiciones de temperatura (temperatura de refrigeración, temperatura ambiente y temperatura alta), disponiendo el polvo en viales herméticamente cerrados, los cuales fueron almacenados durante 126 días, en oscuridad, en un intervalo de temperatura entre 6 y 40°C.

Estabilidad del color

Como se ha mencionado previamente, dentro de las variables analizadas, el color del polvo juega un papel muy importante tanto como propiedad organoléptica del producto, como también como indicador de una posible degradación de pigmentos antocianicos. El estudio indica que el color rojizo inicial del polvo sufrió leves modificaciones durante el almacenamiento a 6 y 20°C (**Figura 4.12**).

Sin embargo, a 40°C los parámetros cromáticos mostraron cambios significativos, perceptibles para el ojo humano ($\Delta E^*_{ab} > 4$) (Keraité y col., 2017). La luminosidad (L^*), disminuyó gradualmente a lo largo del tiempo, hasta una reducción del 11% luego de 84 días de almacenamiento (**Figura 4.12a**), mientras que h_{ab} y C^*_{ab} disminuyeron drásticamente luego de 7 días (35 y 16%, respectivamente) (**Figura 4.12b-c**). La pérdida de saturación al final del almacenamiento fue de 28%.

Se han publicados varios estudios sobre la estabilidad de color en polvos de berries. Por ejemplo, Sánchez y col. (2015) estudiaron el almacenamiento (38°C, 60 días) de polvos liofilizados de jugo de cereza, formulados con 25% de una mezcla maltodextrina-goma arábica. Estos autores no encontraron diferencias significativas en los parámetros de color, probablemente debido al mayor contenido de encapsulante utilizado, que protegió y estabilizó los pigmentos. Por otro lado, Rocha-Parra y col. (2016) analizaron la estabilidad de un vino liofilizado conteniendo 9% de mezcla maltodextrina-goma arábica, almacenado durante 145 días a 38°C, en oscuridad. De acuerdo a estos autores, la ausencia de cambios en el color tuvo lugar debido a la temperatura de transición vítrea que presentó el polvo ($T_g = 50,96^\circ\text{C}$) que fue considerablemente más elevada que la temperatura de almacenamiento, otorgándole al polvo estabilidad física. Por otro lado, Murugesan y Orsat (2011), analizaron los cambios de color durante el almacenamiento (90 días en oscuridad, a 5 y 20°C) de un polvo de sauco obtenido por secado por atomización, formulado con maltodextrina en un 8-10%. En esas condiciones, no observaron cambios significativos, comportamiento similar al obtenido en este trabajo.

La estabilidad del color de polvos a base de berries, no sólo depende de las condiciones de almacenamiento sino también del tipo de fruta, el carrier y proceso de encapsulación, el material del envase, así como del contenido inicial de pigmentos del polvo. Los resultados muestran que, más allá de que el ángulo de tono permanezca en las zonas de los colores rojizos, la pérdida de saturación y de luminosidad durante el almacenamiento a 40°C podrían deberse principalmente a reacciones de deterioro de antocianinas, que pueden producirse a temperatura relativamente altas (Fredes y col., 2018).

En cuanto al estado físico del polvo, pequeños cambios en el contenido acuoso de las muestras, como también pequeñas variaciones en la temperatura de almacenamiento (40°C) pueden haber llevado a estos polvos a superar la T_g y por lo tanto, favorecer en parte la velocidad de deterioro del color.

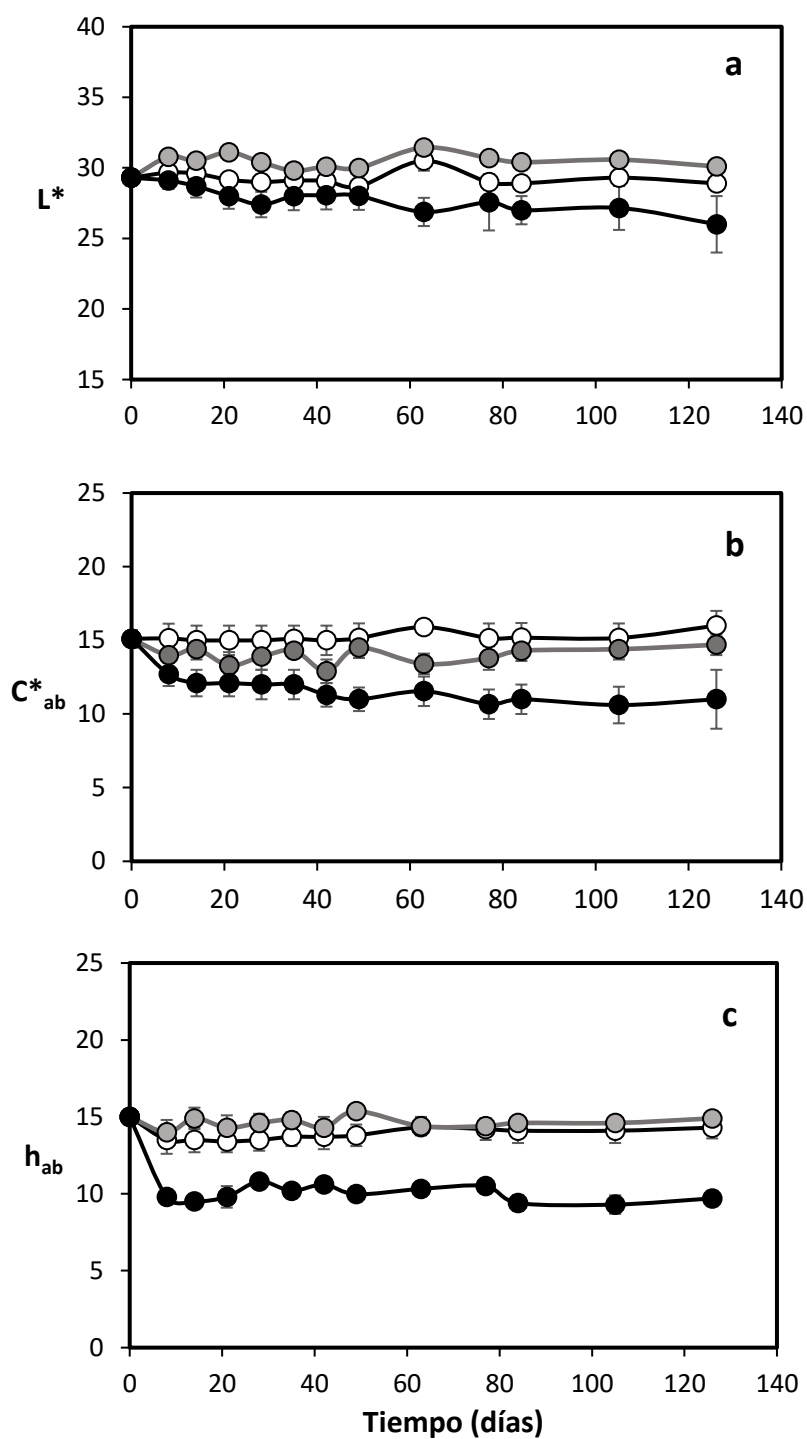


Figura 4.12. Evolución de parámetros cromáticos: a) luminosidad, L^* ; b) saturación, C^*_{ab} ; y c) ángulo de tono, h_{ab} ; para el polvo liofilizado de sauco EO almacenado a distintas temperaturas (Blanco: 6°C; Gris: 20°C; Negro: 40°C).

Estabilidad de compuestos bioactivos

La evolución a lo largo del almacenamiento de polifenoles antociánicos y no antociánicos se estudió mediante determinaciones espectrofotométricas y cromatográficas. Como ya se ha mencionado anteriormente, las antocianinas son importantes no sólo por su rol como pigmentos responsables del color de frutos como las berries, sino también por su actividad antioxidante (Wrolstad y col., 2005). La variación de CPT y ACY se presenta en la **Figura 4.13**. CPT experimentó un descenso en la concentración entre 25-30% al final del estudio, en comparación con los valores iniciales del polvo, sin existir diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas estudiadas (**Figura 4.13a**).

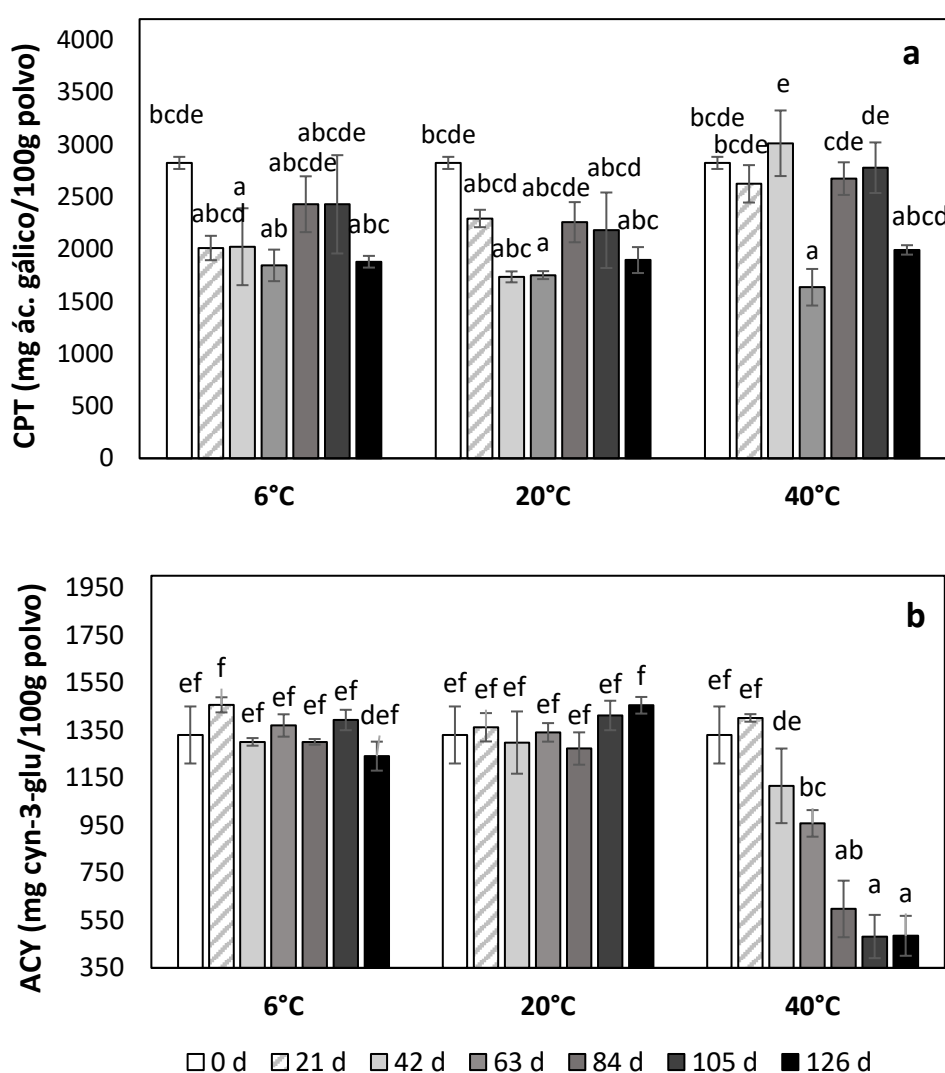


Figura 4.13. Evolución del contenido de a) polifenoles totales (CPT) y b) antocianinas monoméricas (ACY), durante los 126 días (d) de almacenamiento.

En cuanto a ACY, la concentración permaneció relativamente constante a 6 y 20°C, mientras que a 40°C se observó un descenso gradual desde el día 63 hasta una pérdida final del 65% (a los 126 días), en comparación con los valores iniciales (**Figura 4.13b**). Como se mencionó en el estudio de estabilidad del color, las altas temperaturas pueden generar reacciones de deterioro de las antocianinas presentes en el sauco, favorecidas por la baja concentración de encapsulante y la proximidad con la T_g del polvo.

La cuantificación mediante HPLC de compuestos fenólicos se presenta en la **Tabla 4.12**, la cual refleja que a bajas temperaturas (6 y 20°C) de almacenamiento, no se observó un deterioro importante en los compuestos presentes en el polvo, siendo concordante con las determinaciones espectrofotométricas. Sin embargo, se produjo un importante descenso (75%) a 40°C en el contenido en polifenoles totales, especialmente de compuestos de cianidina (**Figura 4.14a**), que representan al grupo mayoritario de los flavonoides presentes en el sauco.

Tabla 4.12. Concentración de compuestos fenólicos determinados por HPLC-DAD en el polvo liofilizado, al inicio (0 días) y fin del almacenamiento (126 días), para cada temperatura estudiada. Los resultados están expresados en mg/g polvo.

		Polvo inicial	6 °C	20 °C	40 °C
Ácidos fenólicos	<i>Gálico</i>	0,46 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,27 ± 0,02
	<i>Elágico</i>	<LOQ	<LOQ	nd.	nd.
	<i>Clorogénico</i>	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02
	<i>Ferúlico</i>	<LOQ	nd.	nd.	nd.
	<i>p-cumárico</i>	0,010 ± 0,004	0,009 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,002
	<i>Cafeico</i>	nd.	nd.	nd.	nd.
Flavan-3-oles	<i>(+) Catequina</i>	1,81 ± 0,09	1,78 ± 0,07	1,61 ± 0,08	nd.
	<i>(-) Epicatequina</i>	nd.	nd.	nd.	nd.
Flavonoles	<i>Quercetina</i>	0,010 ± 0,003	nd.	0,008 ± 0,001	0,013 ± 0,001
	<i>Rutina</i>	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,73 ± 0,09	1,6 ± 0,3
Antocianinas	<i>Cyn-3-glu</i>	6,8 ± 0,2	6,3 ± 0,4	6,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3
	<i>Cyn-3,5-diglu/ Cyn-3-samb-5-glu</i>	0,89 ± 0,07	0,84 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,069 ± 0,005
	<i>Delf-3-glu</i>	nd.	nd.	nd.	nd.
	<i>Resveratrol</i>	nd.	nd.	nd.	nd.
TOTAL		12 ± 1	11,4 ± 0,9	11 ± 1	3,12 ± 0,06

Cyn-3-glu: Cianidina-3-O-glucósido. Cyn-3-samb: Cianidina-3-O-sambubiosido. Cyn-3-diglu: Cianidina-3,5-O-digluósido. Cyn-3-samb-5-glu: Cianidina-3-sambubiosil-5-glucósido. Delf-3-glu: Delfinidina-3-glucósido. LDC: límite de cuantificación (0.05 mg/g) nd.: no detectado.

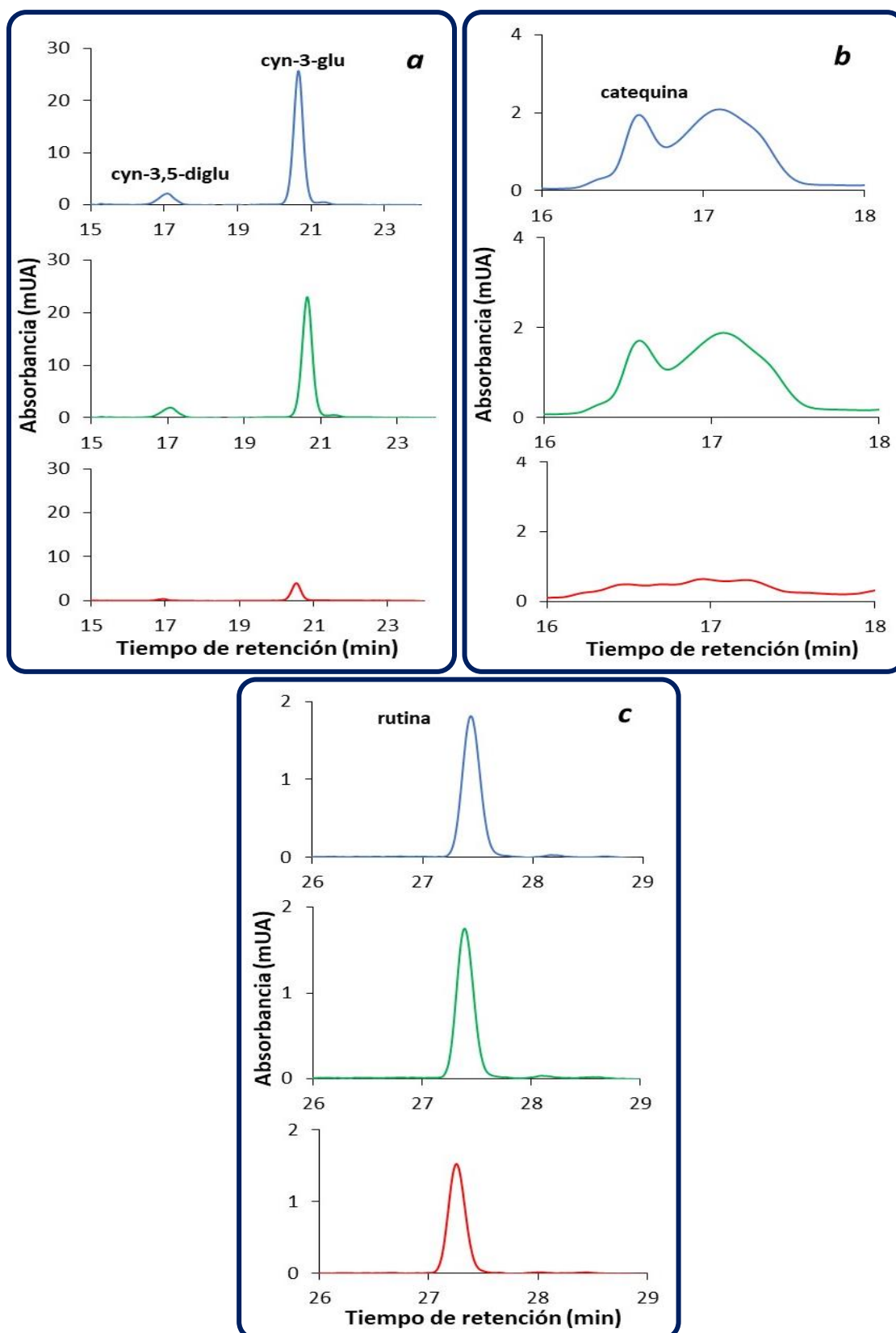


Figura 4.14. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-DAD para compuestos de cianidina (a), catequina (b) y rutina (c), presentes en el polvo liofilizado EO de sauco, al final del estudio de almacenamiento (126 días), a cada temperatura estudiada: 6°C (línea azul), 20°C (línea verde) y 40°C (línea roja).

Este descenso también se condice con la determinación espectrofotométrica de ACY. En particular, la cianidina-3,5-diglucósido inicialmente presente en el polvo, prácticamente desaparece durante el almacenamiento a 40°C.

La catequina (**Figura 4.14b**) fue otro compuesto que sufrió una importante pérdida (desde 1,8 mg/g a no poder detectarse) a altas temperaturas, mientras que la rutina (**Figura 4.14c**) y otros ácidos fenólicos mostraron un deterioro menos marcado. La degradación de antocianinas a altas temperaturas durante el almacenamiento, ha sido previamente estudiada.

Fredes y col. (2018), analizaron la estabilidad de los pigmentos de un polvo spray de maqui a 60°C durante seis meses (180 días), observando una retención del 50% de compuestos de cianidina, que mostraron una velocidad de deterioro mayor que aquellos pigmentos a base de delfinidina.

De acuerdo a los resultados del estudio de almacenamiento, el ingrediente liofilizado de sauco EO debería preservarse en un envase hermético, con barrera al vapor de agua, almacenándose a temperatura ambiente o menor, de modo de preservar sus propiedades físicas y el contenido de antocianinas. Estas condiciones permitirían que el polvo liofilizado pueda utilizarse en diversas aplicaciones, como colorante y/o ingrediente potencialmente funcional.

4.5. Aplicación del extracto de sauco EO: desarrollo de un snack frutal de funcionalidad enriquecida

Se propuso el desarrollo de un snack de manzana y sauco como una posible aplicación del extracto de sauco EO obtenido, a partir del uso combinado de tecnologías de impregnación y liofilización. Para ello se estudió en primer lugar el proceso de impregnación en distintas condiciones operativas (IV, IVA) e incluyendo un escaldado previo (IV-E, IVA-E), el cual fue realizado utilizando como solución de impregnación el extracto EO. En una segunda etapa, las manzanas así impregnadas se liofilizaron y se analizaron desde el punto de vista de su potencial bioactivo, así como también de sus propiedades físicas y estructurales, con el objeto de seleccionar el snack enriquecido de mejor performance.

4.5.1. Estudio del proceso de impregnación de rodajas de manzana con extracto de sauco

Se estudió el proceso de impregnación utilizando condiciones de vacío, cuya efectividad para producir cambios composicionales en matrices húmedas porosas (sin provocar cambios estructurales severos o apreciables a simple vista) es bien conocida (Salvatori y col., 2007; Alzamora y col., 2005; Gras y col., 2002; Ortíz y col., 2003; Castagnini y col., 2015; Pavez-Guajardo y col., 2020). El objetivo fue la introducción directa de compuestos fenólicos y pigmentos provenientes del extracto de sauco en el tejido de manzana generando así productos enriquecidos en compuestos bioactivos. En la **Figura 4.15**, que muestra la

concentración de CPT y ACY obtenida en las rodajas impregnadas, se puede observar que los diferentes periodos de impregnación (t_1 y t_2) afectaron notablemente la incorporación de compuestos bioactivos en la matriz vegetal. En las muestras MIV, sin pretratamiento de escaldado, la aplicación de IV ($t_1= 10$ min, $t_2= 10$ min) aumentó el contenido en polifenoles más del doble respecto a la manzana control (CPT varió de 80 ± 10 mg ác. gálico/100g a 174 ± 10 mg ác. gálico/100g), e introdujo al mismo tiempo una cantidad considerable de antocianinas (96 ± 5 mg cyn-3-glu/100g). El incremento en t_2 desde 10 min a 6 h (muestras MIVA) produjo un aumento en CPT y ACY de aproximadamente 2 veces, respecto de las muestras MIV. Un comportamiento similar fue observado por Salvatori y col. (2007, 2011), durante la incorporación de calcio en tejido de manzana mediante tecnologías de impregnación a vacío y a presión atmosférica en condiciones operativas similares. Estos autores, aprovechando la estructura porosa del tejido y la naturaleza semipermeable de las membranas celulares, lograron introducir 2,5 veces más de calcio al incrementar t_2 desde 15 min a 6 h.

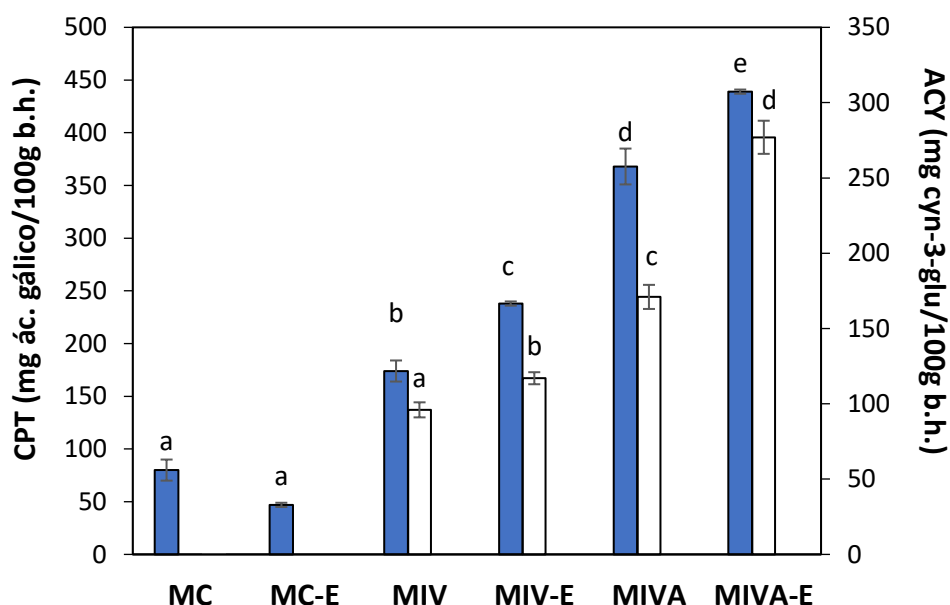


Figura 4.15. Contenido en polifenoles (azul) y antocianinas monoméricas (blanco) en manzanas frescas impregnadas con extracto EO de sauco. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras. Resultados expresados en base húmeda (b.h.).

En el presente estudio se analizó también el uso de un escaldado previo. Es sabido que este tratamiento, normalmente utilizado con el objeto de inactivar las enzimas responsables del pardeamiento enzimático en tejidos vegetales, también puede producir alteraciones en el tejido por efecto del calor, pudiendo acelerar fenómenos de transporte de materia. Puede apreciarse en la **Figura 4.15** que la aplicación de un tratamiento de escaldado condujo a un aumento considerable del contenido de compuestos bioactivos respecto de las manzanas no escaldadas, tanto en MIV-E (CPT= 37%; ACY= 22%) como en MIVA-E (CPT= 19%; ACY= 62%),

alcanzando en este último caso un contenido de polifenoles totales de 439 ± 2 mg ác. gálico/ 100g (b.h.) y de antocianinas monoméricas de 277 ± 11 mg cyn-3-glu/100g (b.h.). Estos resultados demuestran la gran efectividad de las tecnologías combinadas utilizadas en comparación con procesos tradicionales de impregnación a vacío (IV) o de deshidratación osmótica (proceso de impregnación a presión atmosférica).

Varios autores han reportado previamente un aumento en la velocidad de transporte de materia cuando se aplica escaldado en vapor de agua en ebullición, previo a procesos de secado o de deshidratación osmótica en diferentes frutas (Nieto y col., 2001; Giovanelli y col., 2012; Pirone y col., 2014). Particularmente en tejido de manzana, diversos estudios han demostrado que el escaldado produce alteraciones estructurales como colapso de paredes celulares y disrupción de membranas celulares, disminuyendo la resistencia al movimiento de agua y otros solutos durante el procesamiento posterior (Alzamora y col., 2000; Salvatori y col., 2007). Resulta evidente que alteraciones de este tipo (no detectadas visualmente) han tenido lugar como consecuencia del escaldado aplicado en este trabajo, lo que habría provocado que, a lo largo de los procesos posteriores de impregnación, se produzca una mayor penetración de la solución externa hacia el interior del tejido facilitando así la difusión de los compuestos bioactivos de sauco presentes en la misma. Esto explicaría el aumento observado de ACY y CPT observado en las muestras MIV-E y MIVA-E, en comparación con las muestras sin pretratamiento térmico (MIV y MIVA).

El uso de extractos o jugos de berries con el fin de incrementar la concentración de bioactivos en frutas ha sido poco estudiado. Por ejemplo, Samborska y col. (2019) incorporaron jugos o concentrados de arándano negro (bilberry) y aronia (chokeberry), a soluciones hipertónicas de sacarosa (22 y 65 °Brix), con el objeto de realizar una deshidratación osmótica de manzanas. Estudiaron la cinética de deshidratación osmótica a 45°C, evaluando el color desarrollado y realizaron una evaluación sensorial de los productos obtenidos, pero ningún dato fue reportado por los autores sobre el enriquecimiento final logrado en términos de compuestos bioactivos. Por otro lado, Kowalska y col. (2017), al estudiar la deshidratación osmótica de frutillas inmersas en soluciones de azúcar enriquecidas con jugo de aronia (50%, 1:1), observaron luego de 360 min un aumento del 50% en el contenido de polifenoles. El trabajo de Castagnini y col. (2015) se basa en la utilización de jugo de arándano azul (blueberry) para impregnar a vacío (IV) rodajas de manzana, que posteriormente eran sometidas a liofilización y secado convectivo; sin embargo, estos autores no estudian la etapa de IV, centrando sus análisis en los productos deshidratados obtenidos. Es importante resaltar que en los trabajos mencionados no se presenta información suficiente sobre la cantidad de compuestos bioactivos específicos (antociánicos y/o no antociánicos) que es posible incorporar en la matriz, cuando las variables operativas de los procesos de impregnación aplicados son adecuadamente controladas. Tampoco se plantean otras alternativas de procesamiento y su optimización para modificar la resistencia del tejido a la transferencia de materia. En particular en los trabajos de Samborska y col. (2019) y

Kowalska y col. (2017) se utilizan además azúcares libres como agentes osmóticos, lo que no conduce a un producto que pueda considerarse saludable.

4.5.2. Desarrollo de snacks liofilizados de manzana impregnada

4.5.2.1. Evaluación de propiedades bioactivas

Caracterización espectrofotométrica

Luego de la liofilización, las rodajas de manzana presentaron una concentración elevada de compuestos bioactivos a causa de la pérdida de agua, manteniendo una tendencia similar a la observada luego de la impregnación (**Figura 4.16a**). Nuevamente se produjo un aumento significativo en el contenido de antocianinas y polifenoles en la muestra SIVA, distinguiéndose de aquellos snacks obtenidos con aplicación del proceso de IV (muestra SIV). Finalmente, como era de esperar, la muestra más rica en polifenoles y antocianinas fue SIVA-E, presentando un valor de CPT final de 3201 ± 150 mg ác. gálico/100g (b.s.) y de ACY de 2364 ± 94 mg cyn-3-glu/100g (b.s.).

En cuanto a la actividad antioxidante de los snacks analizada mediante diferentes métodos (**Figura 4.16b**), todos los snacks impregnados presentaron mayor AA en comparación con los controles, poniendo de manifiesto el aporte de los compuestos fenólicos provenientes del sauco. Sin embargo, en general no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre snacks SIV, SIV-E y SIVA, mientras que el snack SIVA-E se distingue del resto, presentando el mayor potencial antioxidante, especialmente al ser analizado mediante el método FRAP. Este comportamiento, que no siempre se correlaciona con las variables CPT y ACY, podría explicarse teniendo en cuenta que existen otros compuestos, no necesariamente del tipo fenólicos, que pueden afectar los valores de AA al contribuir en la reducción de radicales libres, o interferir mejorando o empeorando la acción de los compuestos antioxidantes presentes. Por otro lado, si la concentración de ciertos compuestos se encuentra en una relación inapropiada, la capacidad antioxidante puede verse reducida (Phan y col., 2017). Incluso, los productos generados por la degradación de polifenoles pueden también presentar una AA que a veces es mayor que la provista por los compuestos fenólicos iniciales (Murakami y col., 2004).

Como se mencionó previamente, Castagnini y col. (2015) obtuvieron un snack liofilizado de aros de manzana previamente impregnados con jugo de arándano azul mediante un proceso tradicional de IV. A diferencia del estudio aquí realizado, el producto final obtenido por estos autores presentó un contenido notablemente menor en antocianinas (54 ± 7 mg cyn-3-glu/100g manzana seca), y una capacidad antioxidante levemente superior a la muestra control de ese estudio. Estas diferencias podrían adjudicarse al

empleo de jugos de otras frutas, en este caso de arándano, que contiene una menor concentración de compuestos bioactivos, así como también al uso de un proceso de impregnación ineficiente.

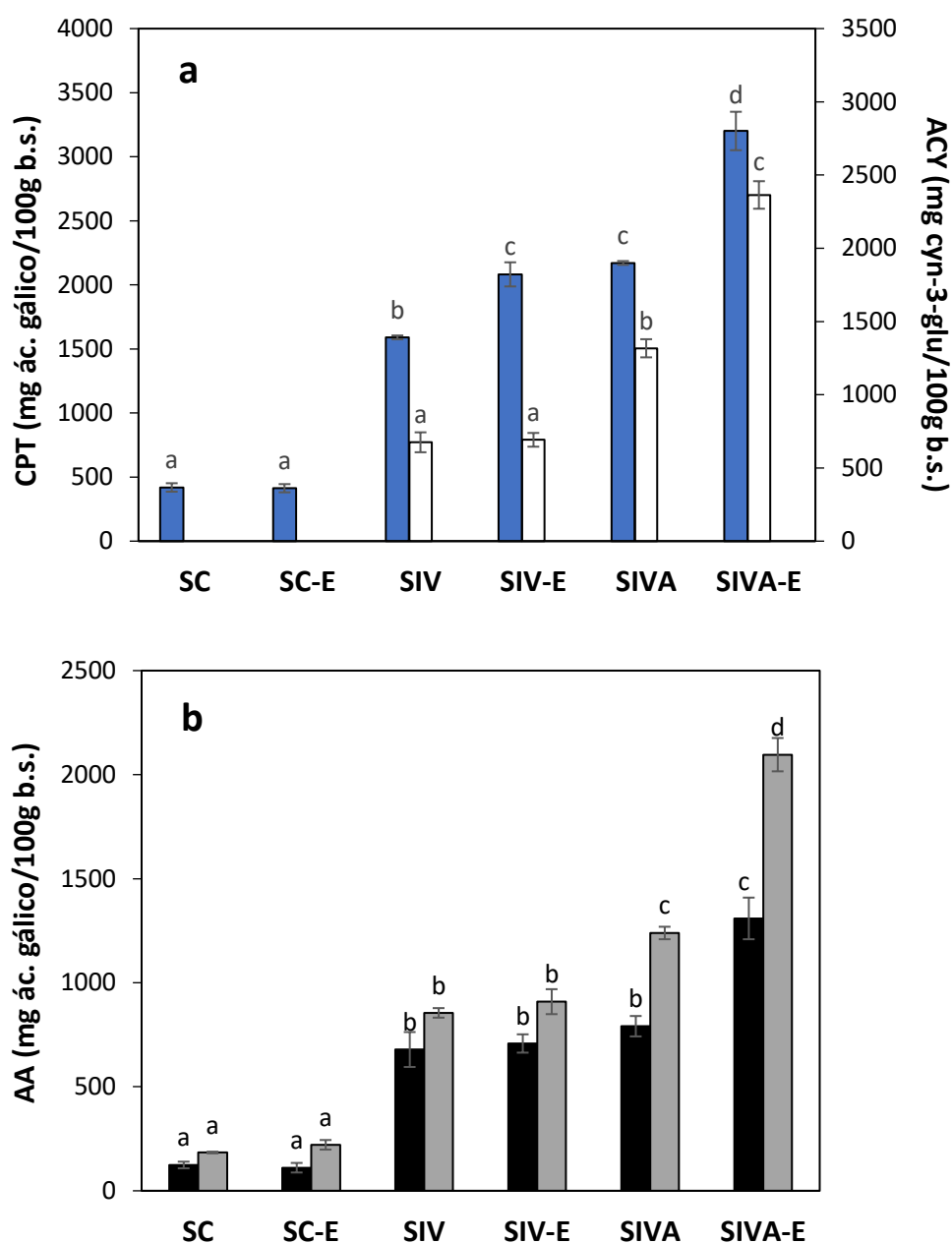


Figura 4.16. (a) Contenido en polifenoles (azul) y antocianinas monoméricas (blanco), y (b) actividad antirradicalaria frente a ABTS (negro) y poder reductor del hierro, FRAP (gris), en snacks liofilizados obtenidos mediante tecnologías de impregnación. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras. Resultados expresados en base seca (b.s.).

Por otro lado, Pavez-Guajardo y col. (2020) impregnaron manzanas con jugo de uva evaluando algunos procesos de impregnación. Por ejemplo, aplicación de vacío (5 min) o presión atmosférica (300 min), con o

sin calentamiento óhmico (30-50°C), y la combinación de los mismos, obteniendo finalmente snacks mediante secado convectivo (40-60°C). Estos autores lograron en la muestra de mejor performance, una concentración final de CPT de 382 mg ác. gálico/100g (b.s.) y un contenido de antocianinas (expresado como cianidina) de 10 mg/100g (b.s.). Nuevamente, es posible que la causa de las bajas concentraciones de compuestos bioactivos obtenidas por Pavez-Guajardo y col., esté relacionada con las características de la solución de impregnación utilizada, sumado a las altas temperaturas tanto del proceso de impregnación como del secado. Es importante destacar que el enfoque de los trabajos se centra solamente en la obtención y análisis de los snacks, no aprovechando el potencial de las bayas utilizadas y de las tecnologías disponibles para introducir y preservar la máxima cantidad posible de compuestos bioactivos en el tejido de manzana.

Considerando una porción de 30 g del snack SIVA-E, la ingesta de la misma aportaría aproximadamente 680 mg de antocianinas monoméricas y 919 mg de polifenoles a la dieta. Teniendo en cuenta el consumo de polifenoles en diferentes países, incluyendo aquellos con una dieta mediterránea de 820 ± 323 mg/día (Tresserra-Rimbau y col., 2013), el consumo diario de una porción del snack desarrollado constituye una ingesta significativa de compuestos fenólicos. A su vez, de acuerdo a la ingesta sugerida por Bueno y col. (2012) que considera aproximadamente 12,5-250 mg de antocianinas por día, esta porción cubriría más del doble que lo incorporado por aquellas poblaciones con mayor consumo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podría pensarse que bastaría el consumo de estos snacks para garantizar el aporte de antioxidantes en la dieta argentina. Sin embargo, la alimentación saludable debe incluir variedad de frutas y hortalizas para garantizar una mayor variedad de compuestos bioactivos, recomendándose 5 porciones al día. En este sentido, los snacks SIV y SIV-E cobran relevancia dado que se acortan los tiempos de procesamiento, siendo el aporte de compuestos bioactivos igualmente considerable (195-200 mg antocianinas monoméricas y 458-599 mg polifenoles, aproximadamente).

Caracterización cromatográfica

La caracterización cromatográfica se realizó con el fin de analizar los tipos de polifenoles presentes en la matriz de partida y el nivel de enriquecimiento de cada uno de ellos en los snacks. Para ello, la cuantificación de compuestos fenólicos individuales se llevó a cabo mediante HPLC tanto en los snacks como en la manzana fresca.

La manzana fresca presenta un perfil de polifenoles variado, encontrando cinco grupos de polifenoles mayoritarios: monómeros de flavan-3-oles (catequinas), polímeros de flavan-3-oles (procianidinas), dihidrochalconas (glicósidos de floretina), flavonoles (glicósidos de quercetina) y derivados de ácidos hidroxicinámicos (Petkovska y col., 2017). La composición y distribución de los polifenoles varía no sólo con

el cultivar sino también entre los distintos tejidos del propio fruto; por ejemplo, dependiendo de la variedad pueden presentar antocianinas (cianidinas) en la piel (Khanizadeh y col., 2008).

La **Figura 4.17a** muestra el cromatograma obtenido para la manzana fresca. Fue posible identificar y cuantificar la presencia de catequina (pico 2) y de procianidinas (picos 1, 3-5). Las procianidinas están formadas por unidades de catequina y/o epicatequina, que se combinan generando dímeros, oligómeros y polímeros (más de 10 unidades), éstos últimos, más conocidos como taninos condensados. La diversidad estructural de este tipo de compuestos es muy variada, dependiendo del tipo de unión entre flavonoides y la longitud de la cadena formada, por lo cual la forma comúnmente utilizada para nombrarlas emplea las letras “A” para dímeros con más de una unión entre flavanoles, y “B y C” para dímeros y trímeros con una única unión, respectivamente (Rohr, 1999).

Dado que no se dispone de los estándares de los distintos tipos de procianidinas, la identificación y cuantificación de las mismas se realizó teniendo en cuenta los espectros UV-vis correspondientes a cada pico, y la comparación de los mismos con bibliografía (Rohr, 1999). En particular, las procianidinas en columnas cromatográficas del tipo C18 y frente a la aplicación de largos gradientes lineales (condiciones utilizadas en este trabajo), suelen causar deriva en la línea base del cromatograma (**Figura 4.17a**), lo que dificulta el análisis.

En cuanto a la absorción UV, los espectros se caracterizan por presentar dos bandas que muestran un máximo a 230-240 nm y a 270-280 nm (**Figura 4.17b-f**). Como se comentó en materiales y métodos, en el presente trabajo se determinó la concentración del total de procianidinas como equivalentes de catequina. La importancia de la determinación de las procianidinas radica en que son el grupo de polifenoles mayoritario (> 50% de los polifenoles totales) en la pulpa de manzana, independientemente de la variedad (Khanizadeh y col., 2008; Kalinowska y col., 2014; Petkovska y col., 2017). En la manzana fresca utilizada en el presente estudio, el contenido de catequina y procianidinas determinado fue de $0,0361 \pm 0,0002$ y $0,254 \pm 0,001$ mg/g fruta fresca, respectivamente. Otros autores han hallado cantidades diferentes de estos flavan-3-oles en pulpa de manzana var. Granny Smith. Por ejemplo, Kalinowska y col. (2014) informaron concentraciones de catequina entre 0,136 – 0,182 mg/g (b.h.) y una concentración de procianidinas totales de 0,439 mg/g (b.h.). Kebe y col. (2015) informaron un contenido de 0,029 mg catequina/g (b.h.) y una concentración de procianidinas mayor de 0,9 mg/g (b.h.), mientras que Kschonsek y col. (2018) reportaron concentraciones más bajas para ambos polifenoles (0,018 mg catequina/g, b.h., y 0,03 mg procianidinas/g, b.h.). Estas diferencias podrían asociarse no sólo al origen de la fruta en estudio, sino también a la forma de extracción de los compuestos bioactivos.

En cuanto a los snacks obtenidos, en las muestras control SC y SC-E, que surgieron de liofilizar directamente la manzana fresca y la escaldada, respectivamente, se identificó no sólo la presencia de catequina y procianidinas, sino también de ácido clorogénico en menor concentración (**Tabla 4.13**). El hecho

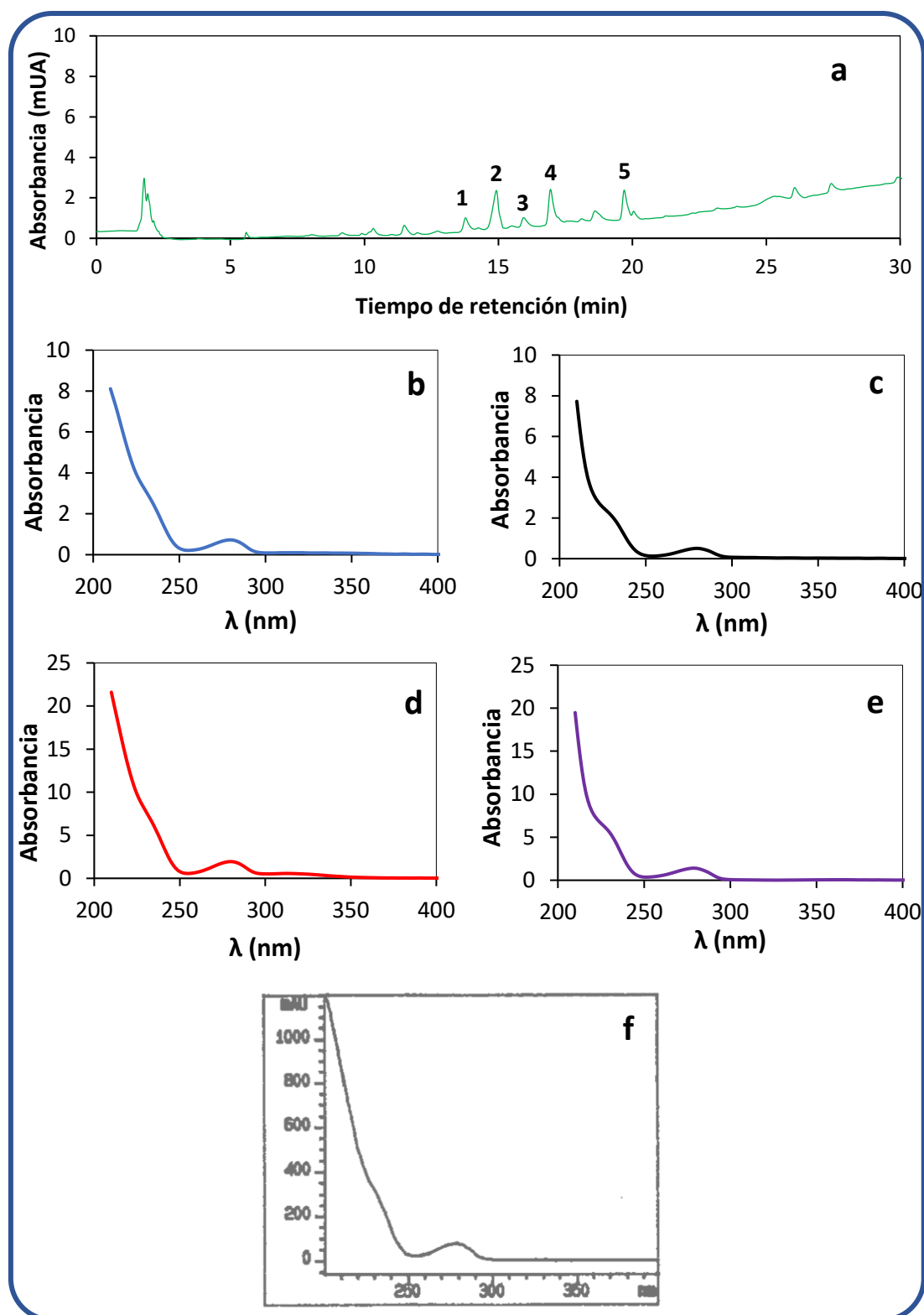


Figura 4.17. (a) Cromatograma correspondiente a la manzana fresca, registrado a 280 nm. Los picos 1, 3, 4, y 5 corresponden a procianidinas; el pico 2 corresponde a catequina. (b-e) Espectros UV-vis correspondientes a los picos 1 (azul), 3 (negro), 4 (rojo) y 5 (violeta). (f) Espectro UV-vis de procianidina obtenido por Rohr (1999) mediante un detector UV-DAD.

de que no se haya identificado este ácido, que forma parte de los compuestos fenólicos presentes en la pulpa de manzana fresca (Kalinowska y col., 2014; Kschonsek y col., 2018), podría deberse tanto a su baja concentración respecto de los demás polifenoles, así como también a una mejora en la extracción alcohólica en productos porosos, como son los liofilizados.

Puede apreciarse en la **Tabla 4.13**, que el pretratamiento de escaldado afectó la proporción de los compuestos fenólicos en la muestra SC-E, en la que la concentración de catequina se duplicó y las procianidinas aumentaron un 15%, mientras que el ácido clorogénico disminuyó su concentración en un 50%, aproximadamente. Estas variaciones podrían deberse a la alta temperatura involucrada durante el pretratamiento de escaldado ($T > 98^{\circ}\text{C}$) que, al afectar la estructura celular del tejido de manzana, pudo favorecer tanto la liberación de procianidinas y catequinas, como también ocasionar la degradación de ácido clorogénico. El aumento notorio en la concentración de catequina podría deberse también a la hidrólisis de algunas procianidinas por el tratamiento térmico, que genera monómeros de catequina. La degradación térmica ($< 90^{\circ}\text{C}$) de procianidinas con el consecuente incremento en la concentración de monómeros de flavan-3-oles (catequina o epicatequina) ha sido también observada por De Paepe y col. (2014) en jugos de manzana. Se observa en la **Tabla 4.13** que independientemente del tratamiento aplicado en las muestras control, se mantuvo el perfil de polifenoles original determinado en la manzana fresca.

Los snacks impregnados con sauco mostraron un perfil más rico en polifenoles, pudiendo identificar en estas muestras la mayoría de los compuestos presentes en los frutos de sauco (**Tabla 4.13**). A su vez, al comparar los cromatogramas de las muestras control con los snacks enriquecidos con sauco, fue posible identificar algunos picos de procianidinas encontrados en la manzana liofilizada. Sin embargo, su cuantificación se dificultó a causa de la mayor concentración de polifenoles provenientes del sauco y la superposición de picos, razón por la cual no fue posible la identificación completa de los compuestos fenólicos provenientes de la manzana en los snacks impregnados. A modo de ejemplo se presentan los cromatogramas correspondientes a los snacks SC y SIV en la **Figura 4.18**, que permite apreciar la superposición de picos mencionada. En la misma se indican con flechas los picos correspondientes a las procianidinas que se ven enmascarados por las señales generadas por la incorporación de polifenoles de sauco en la matriz.

En los snacks impregnados, coherentemente con lo analizado mediante técnicas espectrofotométricas (**Figura 4.16**), las diferencias entre tratamientos fueron similares, siendo los valores absolutos del mismo orden tanto en concentración total de polifenoles como de antocianinas individuales. Por ejemplo, el incremento en t_2 se tradujo en un 79-88% de aumento en la concentración total de polifenoles determinados por HPLC. Esta diferencia puede atribuirse principalmente a la incorporación de compuestos de cianidina, rutina y catequina provenientes del extracto de sauco, cambiando así la composición del

producto. La cianidina y la rutina aparecen como nuevos polifenoles en la matriz de manzana, mientras que la catequina, inicialmente presente, se incrementó entre un 88-93% respecto de la muestra SC.

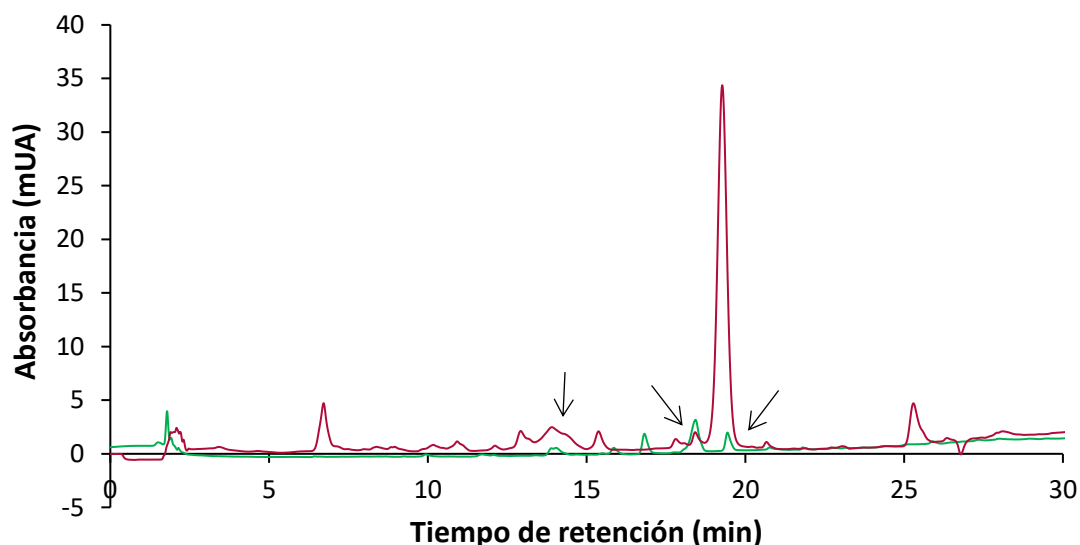


Figura 4.18. Cromatogramas correspondientes a los snacks SC (verde) y SIV (morado), registrados a 280 nm. Las flechas indican las zonas de superposición de picos correspondientes a procianidinas en el snack SIV.

Existen pocos trabajos en bibliografía sobre snacks enriquecidos en compuestos antioxidantes, en los que se haya profundizado en el análisis de compuestos individuales por HPLC y la evaluación de la pérdida del potencial bioactivo a través de las distintas etapas del procesamiento. Puede mencionarse solamente el trabajo publicado por Castagnini y col. (2015), sobre aros de manzanas impregnados con jugo de arándano y liofilizados, en el que se analizó por HPLC el contenido de 3 antocianinas individuales (delfinidina, cianidina y malvidina). Si bien las antocianinas mayoritarias del arándano no son las mismas que las del sauco, si se compara el contenido total de antocianinas individuales que se logra en los snacks desarrollados por estos autores, el valor es notablemente menor (0,0149 mg/g ms) que el alcanzado en el presente trabajo (8-25 mg/g ms). A su vez, estos autores no analizan la presencia de otros polifenoles provenientes del arándano, que pueden estar aportando a la capacidad antioxidante de los snacks. Resulta de gran relevancia realizar la caracterización completa del producto, complementando técnicas de análisis que permitan establecer el efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre los compuestos bioactivos presentes en la matriz de partida.

Tabla 4.13. Concentración de polifenoles determinada por HPLC-UV/DAD, en snacks liofilizados control e impregnados con extracto de sauco. Concentración expresada en mg/g (b.s).

Polifenol	SC	SC-E	SIV	SIV-E	SIVA	SIVA-E
Procianidinas	4,08 ± 0,03	4,69 ± 0,01	NC	NC	NC	NC
Catequina	0,19 ± 0,02	0,40 ± 0,03	1,64 ± 0,01	2,34 ± 0,04	2,21 ± 0,02	2,90 ± 0,03
Ác. clorogénico	0,042 ± 0,001	0,019 ± 0,002	0,250 ± 0,005	0,429 ± 0,003	0,455 ± 0,002	0,650 ± 0,001
Ác. <i>p</i> -cumárico	ND	ND	0,005 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,002	0,012 ± 0,002
Ác. gálico	ND	ND	0,649 ± 0,001	0,531 ± 0,003	0,437 ± 0,004	0,746 ± 0,004
Rutina	ND	ND	1,65 ± 0,03	1,95 ± 0,02	3,65 ± 0,01	6,44 ± 0,04
Quercetina	ND	ND	0,078 ± 0,001	0,13 ± 0,04	0,067 ± 0,003	0,08 ± 0,01
Cyn-3-glu/cyn-3-samb	ND	ND	7,8 ± 0,1	9,01 ± 0,03	13,1 ± 0,02	23,4 ± 0,04
Cyn-3,5-diglu/ Cyn-3-samb-5-glu	ND	ND	0,60 ± 0,03	1,1 ± 0,01	0,69 ± 0,01	1,39 ± 0,02
Total antocianinas	NC	NC	8,37 ± 0,06	10,12 ± 0,01	13,8 ± 0,3	24,8 ± 0,4
Total polifenoles	4,31 ± 0,03	5,11 ± 0,01	12,6 ± 0,2	15,50 ± 0,04	20,6 ± 0,3	35,7 ± 0,6

ND: no detectado; NC: no cuantificado; cyn: ciandinina; glu: glucósido; samb: sambubiócido; diglu: diglucósido.

4.5.2.2. Propiedades físicas de los snacks relacionadas con la estabilidad

Humedad, actividad de agua, propiedades de sorción de agua y temperatura de transición vítrea

En esta sección se describen los resultados relacionados con la estabilidad de los snacks liofilizados, teniendo en cuenta el contenido y la actividad de agua, la temperatura de transición vítrea y las isotermas de sorción de agua a 20°C.

La evaluación del contenido y la actividad de agua de los snacks mostró que se obtuvieron valores bajos de ambas variables en todos los casos (**Tabla 4.14**), lo cual es coherente con lo esperado en productos frutales liofilizados (Marques y Freire, 2005; Sette y col., 2017; Sosa y col., 2012). La modificación en la composición de los snacks debida a la impregnación de las manzanas con el extracto de sauco se vio reflejada en una humedad levemente mayor que en las muestras no impregnadas. Sin embargo, las diferencias en los valores de a_w fueron mínimas y todas las muestras presentaron valores inferiores a 0,2, lo cual garantiza su estabilidad microbiológica si los productos se almacenan adecuadamente.

Adicionalmente, se evaluó la transición vítrea de los snacks mediante calorimetría diferencial de barrido y en todos los casos se observaron termogramas mostrando transiciones (T_g) cuyo *onset* se presentó en un rango entre -4 y -6°C, lo que implica que todas las muestras se encontraban en estado sobreenfriado a temperatura ambiente.

Tabla 4.14. Contenido de agua y a_w de los distintos snacks desarrollados a la salida del proceso de liofilización. Resultados expresados como la media \pm desvío estándar.

Muestra	a_w *	Humedad (% bs)**
SC	0,192 \pm 0,005 ^a	3,5 \pm 0,2 ^b
SC-E	0,185 \pm 0,004 ^a	3,3 \pm 0,2 ^b
SIV	0,173 \pm 0,001 ^b	4,12 \pm 0,07 ^a
SIV-E	0,190 \pm 0,005 ^a	4,30 \pm 0,03 ^a
SIVA	0,175 \pm 0,001 ^b	4,3 \pm 0,1 ^a
SIVA-E	0,193 \pm 0,003 ^a	4,5 \pm 0,1 ^a

*Diferentes letras entre muestras indican diferencias significativas por efecto de la interacción pretratamiento-impregnación.

** Diferentes letras entre muestras indican diferencias significativas por efecto de la impregnación.

Con respecto al estudio de las isotermas de sorción de agua, este se realizó hasta 52% HR debido a que se trata de productos deshidratados que pierden sus características típicas a valores altos de contenido de agua. La **Figura 4.19** presenta las curvas de sorción de agua en función de la humedad relativa (HR) a 20°C,

para los diferentes snacks. El aumento en el contenido de agua con el incremento de HR generó curvas de forma sigmoidea (tipo II) de acuerdo a la clasificación de Brunauer, Deming y Teller (Brunauer y col., 1940). Las muestras control SC y SC-E en general presentaron el mismo comportamiento, salvo que a la mayor HR estudiada (52%), el control sin pretratamiento de escaldado adsorbió 4% más de agua que el control SC-E. Esto podría deberse a que la muestra escaldada presenta colapso en su estructura por el tratamiento térmico previo a la liofilización (como se describirá más adelante en la siguiente sección), pudiendo desfavorecer la adsorción en comparación con el tejido de SC, cuya estructura fue más uniforme con poros y sitios activos más disponibles para la adsorción de agua. Un comportamiento similar fue observado por Franceschinis (2016), al estudiar la sorción de agua en trozos de cerezas liofilizados.

Por otro lado, en las muestras sin pretratamiento de escaldado (**Figura 4.19a**) el comportamiento de sorción de cada muestra (SC, SIV y SIVA) se diferenció principalmente a altas HR, mientras que para los snacks que fueron escaldados (**Figura 4.19b**) el contenido acuoso fue variando desde un 33% de humedad relativa, siendo SIV-E el snack con mayor capacidad de adsorción de agua respecto de SC-E y SIVA-E. Los snacks SIV y SIV-E adsorbieron mayor cantidad de vapor de agua respecto de las muestras control, hasta alcanzar una HR alta (52%) donde el contenido de agua en la matriz fue 10% mayor en relación a los demás snacks estudiados. Por otro lado, SIVA y SIVA-E presentaron curvas similares a las muestras control.

Las diferencias producidas en los snacks SIV y SIV-E, podrían explicarse teniendo en cuenta dos situaciones: en comparación con las muestras control, estos snacks durante la impregnación a vacío podrían haber adquirido en su estructura sólidos solubles (como azúcares) provenientes del líquido de impregnación, que luego de la deshidratación se encontrarían disponibles para la interacción con el vapor de agua, favoreciendo el proceso de adsorción. En segundo lugar, comparando con SIVA y SIVA-E, cuyo tratamiento de impregnación implicó un mayor tiempo de contacto con el extracto de sauco, se produjo un mayor llenado de poros y, en consecuencia, el número de sitios activos para la adsorción de agua fue más bajo en estas muestras. A su vez, Maidana (2017) al estudiar la sorción de peras sometidas a infusiones con diferentes azúcares, y deshidratadas mediante secado convectivo, observó que la inclusión de un mayor contenido de sólidos en la matriz de la fruta (con o sin escaldado) provocó que sólidos solubles como los azúcares, compitieran con el vapor de agua por los sitios activos de interacción con la fase sólida, manifestándose como una menor adsorción en el equilibrio. Este fenómeno podría estar contribuyendo a un menor contenido de agua en equilibrio en los snacks SIVA y SIVA-E a la mayor HR.

Por otro lado, Sette (2015) al estudiar las isotermas de sorción de agua de frambuesas pretratadas con infusiones de sacarosa y posteriormente liofilizadas, observó que el agua retenida en cada muestra estudiada fue diferente dependiendo de los cambios que se producen en las fases sólida y líquida, al someter a la muestra a diferentes pretratamientos. Esto indicaría, que los cambios estructurales generados por el procesamiento utilizado en este trabajo, afectaron la capacidad de unión de compuestos presentes en

la fase sólida de la manzana y los sólidos solubles presentes en la fase líquida, modificando finalmente el contenido de agua en el equilibrio en los distintos snacks.

Con el objetivo de establecer la estabilidad de los snacks, se realizó la evaluación sensorial (mediante un panel interno) de las propiedades de textura y apariencia de las muestras almacenadas a las diferentes humedades relativas. Se observó que todos los snacks presentaron características de textura crujiente y que comenzaron a producirse cambios en la textura de las muestras a partir de 43% HR.

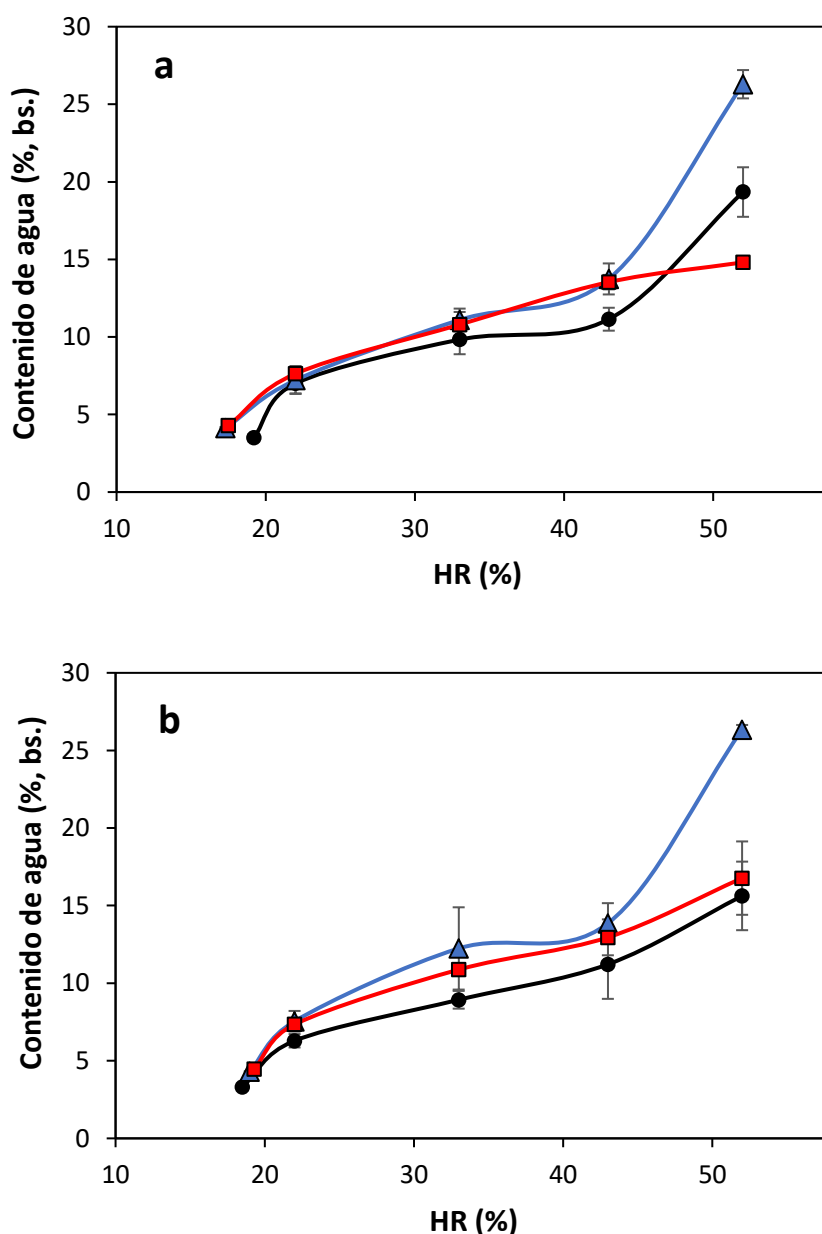


Figura 4.19. Curvas de sorción de agua en función de la humedad relativa (HR) a 20°C para los snacks sin pretratamiento de escaldado (a) y con pretratamiento de escaldado (b). SC y SC-E (●), SIV y SIV-E (▲), SIVA y SIVA-E (■).

La apariencia general de los snacks no se modificó en el rango de HR estudiado, por lo tanto, el factor determinante de la pérdida de estabilidad sería la textura de los snacks. A pesar de que todas las muestras analizadas presentaron una textura crujiente a $HR < 43\%$, el análisis de la temperatura de transición vítrea (T_g) indicó que en todos los casos el estado físico de los snacks era sobreenfriado a temperatura ambiente. La T_g se ha considerado un indicador de estabilidad de alimentos deshidratados, y se relaciona con la cantidad de agua residual que actúa como plastificante y potenciadora de la movilidad en los materiales. Sin embargo, en sistemas complejos como las frutas deshidratadas, que son sistemas multicomponentes y multifásicos, sus propiedades pueden no evolucionar según predice la teoría de la transición vítrea (Peleg, 1999) con respecto a algunas características de estabilidad tales como las propiedades de textura. La T_g es una característica de las fases solubles en agua, y el comportamiento mecánico en tejidos vegetales deshidratados depende principalmente de otras fases (compuestos no solubles de la matriz celular) y de otros fenómenos, como la porosidad, el proceso de contracción y de endurecimiento superficial. Estos aspectos pueden desempeñar un papel importante en la explicación de la textura en los casos en los que el concepto de vidrio no es válido. Esta aparente contradicción ya fue observada previamente en rodajas de manzanas liofilizadas (Sosa y col., 2012).

Por otro lado, las isotermas de sorción de agua constituyen una herramienta útil para analizar la perdurabilidad de las propiedades de textura de estos productos. En este sentido, se observó que si la humedad de las muestras aumenta un porcentaje inferior al 9% no se presentarán cambios generales en la textura, en un lapso de tiempo relativamente largo (≈ 1 mes). Evidentemente, para el rango de HR bajas evaluado, los snacks no presentarían una higroscopicidad elevada, sugiriendo que el almacenamiento en un envase apropiado permitiría conservar adecuadamente las muestras durante un considerable período de tiempo sin apreciar cambios relevantes en la textura.

Evaluación de las propiedades mecánicas de los snacks

El comportamiento mecánico de los alimentos puede explicarse de manera teórica analizando las interacciones entre las moléculas y la red estructural que los conforman. Muchas de las propiedades mecánicas de frutas y vegetales surgen de la unión de distintas sustancias a las paredes celulares, y de las modificaciones ocasionadas en las mismas por la manipulación, el procesamiento y el almacenamiento (Tunick, 2011). En productos deshidratados las propiedades mecánicas se ven fuertemente afectadas por el estado físico de la matriz (sobreenfriado o vítreo), la microestructura desarrollada como resultado de las deformaciones (encogimiento/hinchamiento) que pueden sufrir las células y los espacios intercelulares, así como también la ruptura de uniones entre células a medida que avanza el proceso de secado (Contreras y col., 2005; Deng y Zhao, 2008). A su vez, la incorporación de solutos, como azúcares, durante el procesado

puede afectar la organización estructural de un producto y, en consecuencia, sus interacciones con el agua, que desempeña un papel importante en las propiedades mecánicas de los materiales, principalmente en la textura crujiente de alimentos deshidratados (Barret y col., 1994; Onwulata y col., 2001; Roudaut y col., 2002; Van Hecke y col., 1998).

Si bien las técnicas sensoriales han sido tradicionalmente elegidas como la principal metodología de estudio de la textura, la complejidad de esta característica de los alimentos ha llevado al desarrollo de análisis instrumentales que permiten obtener parámetros mecánicos relacionados con la textura percibida y complementan el estudio sensorial. Particularmente, el análisis de la fuerza, la deformación y la energía involucradas en la ruptura de una estructura, permite clasificar un material de acuerdo a su fragilidad o ductilidad (Miranda y Aguilera, 2006).

En alimentos de baja humedad, la textura se describe mediante los conceptos de crujencia y fragilidad. El análisis de la ruptura de este tipo de materiales mediante ensayos de punción/penetración permite generar curvas de fuerza-desplazamiento (F vs. d), a partir de las cuales se obtienen los parámetros que caracterizan el comportamiento mecánico. Las curvas de fuerza-desplazamiento obtenidas para los distintos snacks (**Figura 4.20**) presentan un comportamiento típico de muestras crujientes, debido a la presencia de picos de diferentes magnitudes asociados a fracturas superficiales e internas de la estructura (Sosa y col., 2012). Se observa inicialmente un aumento de la fuerza a medida que la punta de medición penetró la muestra hasta un valor máximo ($F_{\text{máx}}$), para luego caer abruptamente debido al primer quiebre parcial de la estructura. Posteriormente, se generaron picos más pequeños asociados a fracturas locales debido a la porosidad generada en los snacks luego del proceso de liofilización, hasta que finalmente toda la muestra es atravesada. El valor de fuerza máxima ($F_{\text{máx}}$) está relacionado con la firmeza o dureza de la muestra y representa la resistencia del material a la penetración. La distancia a la cual la fuerza alcanza su valor máximo corresponde a la deformación que sufre el material antes de este punto de ruptura, mientras que la pendiente inicial de la curva (E_d), que es función de la rigidez de la muestra, depende de elementos estructurales como cavidades de aire, micro-heterogeneidades, parámetros geométricos, entre otros. Este parámetro, llamado módulo de deformabilidad, también se relaciona con la fracturabilidad o fragilidad del material. Finalmente, el trabajo (W) es la energía necesaria para fracturar la muestra y representa el comportamiento mecánico general de la estructura (dureza del material). El número de picos originados luego de la fractura principal se asocia, como ya se ha comentado, a la presencia de microestructuras internas, generando las curvas aserradas típicas de productos crujientes (*judjeness* en inglés). Normalmente, al disminuir la crujencia de los materiales, el número de fracturas (número de picos) disminuye, aumentando el ancho de los picos, los cuales además se suavizan (Miranda & Aguilera, 2006). En la **Tabla 4.15** se presentan los valores de los parámetros mecánicos mencionados para los snacks obtenidos.

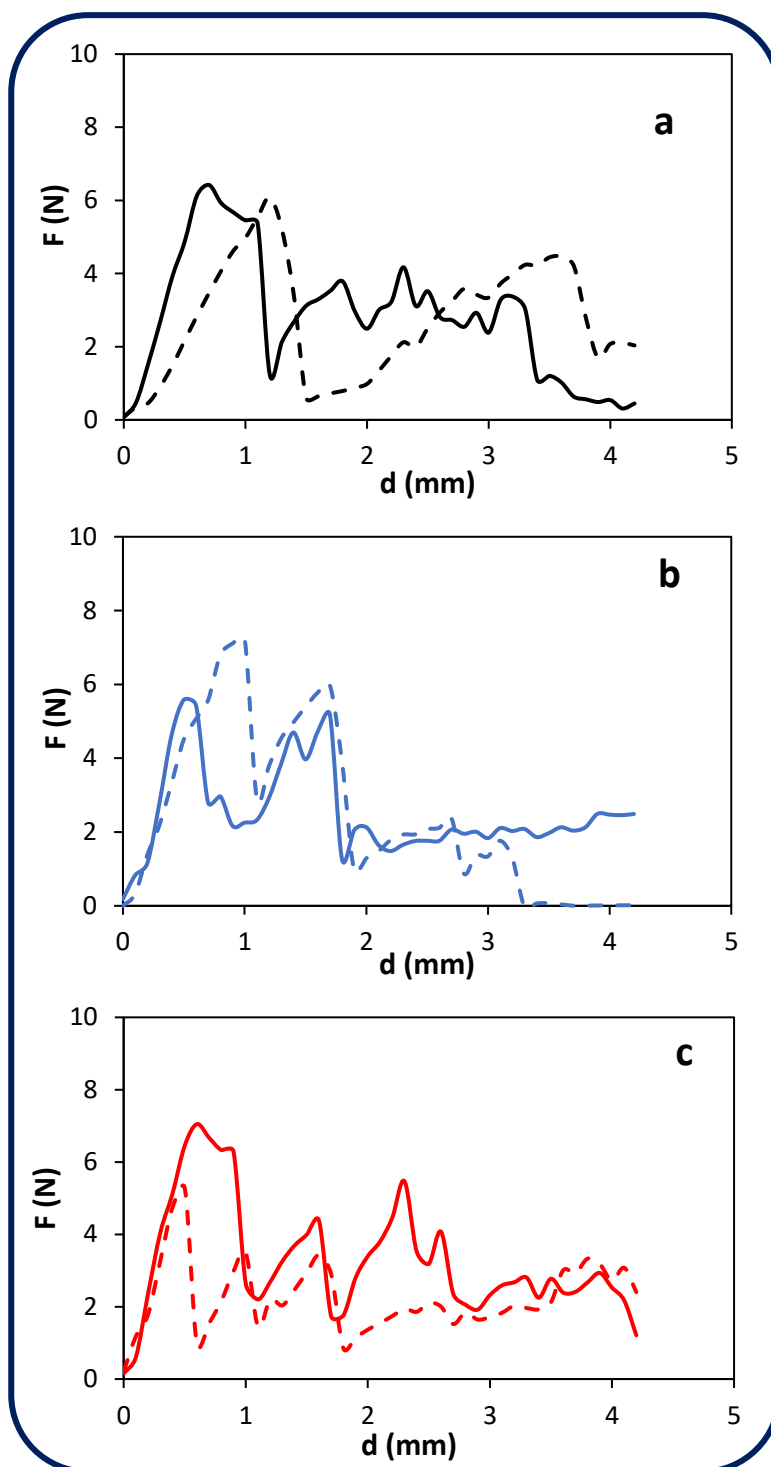


Figura 4.20. Curvas fuerza-desplazamiento obtenidas durante el ensayo de penetración. La línea punteada corresponde a las muestras con pretratamiento de escaldado. a) muestras control; b) muestras impregnadas con IV; c) muestras impregnadas con IVA.

Al analizar el pretratamiento de escaldado, se observó que éste no tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la firmeza de las muestras control (**Figura 4.20a**). Sin embargo, las curvas presentaron picos más

anchos y menos empinados, lo que estaría indicando una mayor deformabilidad de las muestras ($< E_d$). La pérdida de rigidez en muestras previamente escaldadas se asociaría a la pérdida del turgor celular que ha sido observada por otros autores (Alzamora y col., 2000; Salvatori y col., 2007) en tejido de manzana fresco a causa del colapso de paredes y membranas celulares por efecto térmico en etapas de escaldado. Ello generaría luego del liofilizado, una matriz vegetal más degradada con pérdida de crujencia.

Tabla 4.15. Parámetros de fuerza máxima ($F_{m\acute{a}x}$), trabajo (W), módulo de deformabilidad (E_d) y número de picos obtenidos a partir de las curvas fuerza-deformación de los snacks estudiados.

Snack	$F_{m\acute{a}x}$ (N)*	W (J)**	E_d (N/mm)**	N° de picos**
SC	7 ± 1^{ab}	$0,014 \pm 0,003^b$	7 ± 1^b	$5,7 \pm 0,5^a$
SC-E	$6,0 \pm 0,7^{ab}$	$0,012 \pm 0,004^{ab}$	5 ± 1^a	6 ± 1^a
SIV	$5,8 \pm 0,4^a$	$0,009 \pm 0,001^a$	9 ± 1^{bc}	8 ± 1^b
SIV-E	6 ± 1^{ab}	$0,010 \pm 0,001^{ab}$	7 ± 2^{ab}	6 ± 1^a
SIVA	$7,3 \pm 0,7^b$	$0,012 \pm 0,03^{ab}$	11 ± 1^c	7 ± 1^{ab}
SIVA-E	$5,0 \pm 0,5^a$	$0,009 \pm 0,001^a$	9 ± 1^{bc}	8 ± 2^b

*Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras sometidas al mismo tratamiento de impregnación.

**Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p > 0,05$) entre todas las muestras.

Para profundizar el análisis del efecto del escaldado sobre la microestructura, se tomaron fotomicrografías mediante microscopía óptica de secciones transversales de tejido parenquimático proveniente de las muestras frescas (**Figura 4.21**). La muestra de manzana control se presenta en la **Figura 4.21A**, donde puede observarse en el tejido fresco que las células y los espacios intercelulares se disponen en forma de red siguiendo un patrón inhomogéneo y anisotrópico. Las células aparecen túrgidas con paredes celulares intactas, las cuales presentan un material fibrilar densamente empaquetado con alta densidad electrónica y laminilla media bien definida (**Figura 4.21B**). Puede observarse la laminilla media cementando paredes celulares de células vecinas (ver flechas). La membrana plasmática y el tonoplasto se observan íntegros y el citoplasma se halla en posición parietal contenido entre ambas. Sin embargo, el tejido escaldado exhibe ruptura de membranas y un daño substancial de paredes celulares, con interrupciones en muchas zonas (**Figura 4.21C-D**). Pareció tener lugar, después del calentamiento, una redistribución de polisacáridos de la pared celular, mostrando agregados de alta densidad seguidos de zonas sin material donde ocurrió la ruptura, incluso en muchos casos estas zonas sin material fueron importantes. Se observa además que ha tenido lugar una contracción del tejido, presentando algunas células el citoplasma muy contraído y en otras totalmente vehiculizado (**Figura 4.21C**). Estas observaciones coinciden con las realizadas por Anino y col. (2006) y González-Fésler y col. (2008) en tejido de manzana. Este daño estructural

(disrupción de membranas y paredes celulares) producto del escaldado daría como resultado no sólo una disminución importante de la resistencia del tejido a la incorporación de solución de impregnación y de polifenoles y otros compuestos contenidos en ella durante el proceso de impregnación, sino también cambios en las propiedades mecánicas de los snacks liofilizados obtenidos.

De acuerdo al comportamiento mecánico de los distintos snacks escaldados, y las observaciones realizadas previamente mediante MO, el tratamiento térmico parece debilitar la estructura, generando luego de la liofilización productos menos rígidos y más deformables ($< E_d$) y de menor crujencia (picos en general más anchos y más suaves), especialmente en muestras control e impregnadas con IV (Tabla 4.15 y Figura 4.20).

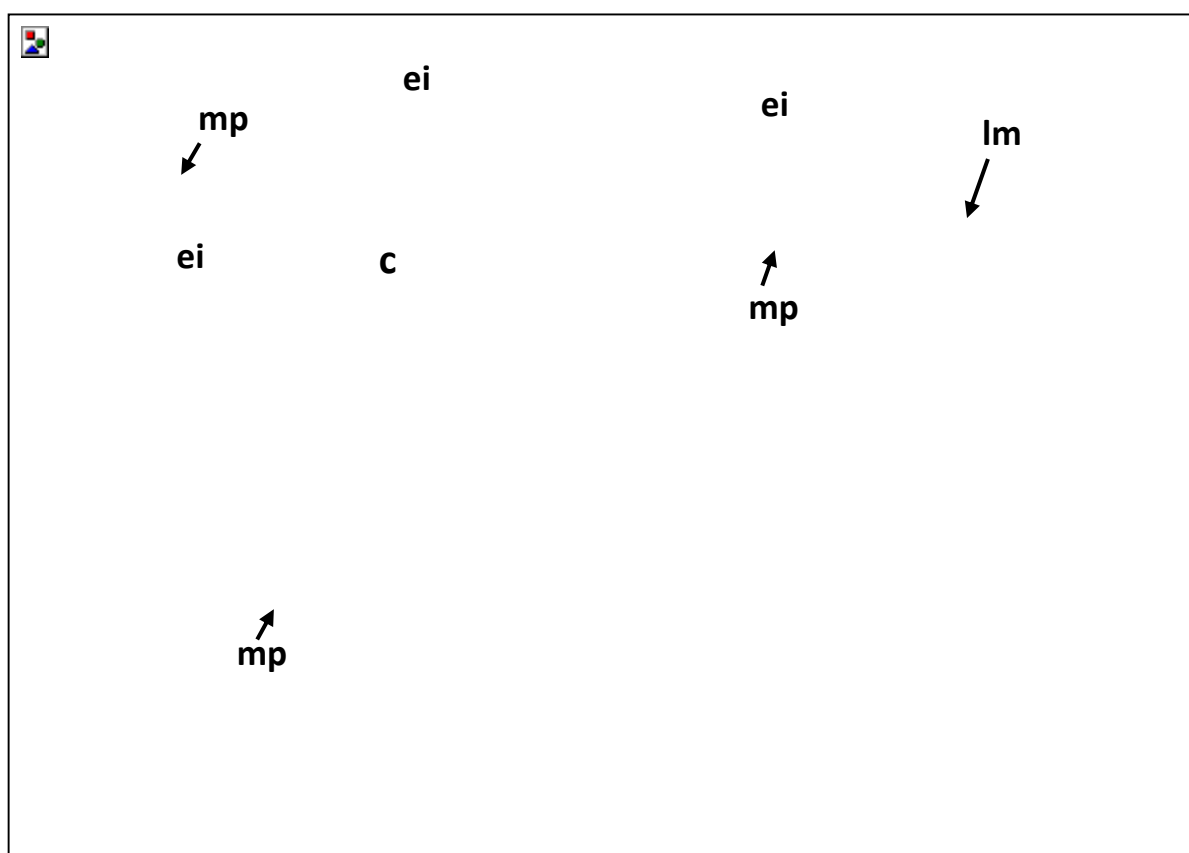


Figura 4.21. Fotomicrografías de tejido parenquimático de manzana fresca (A, B) y escaldada (C, D). c: citoplasma, ei: espacio intercelular, pc: pared celular, mp: membrana plasmática, lm: laminilla media.

Las muestras sólo impregnadas, presentaron en general curvas más aserradas en comparación con el control con un mayor número de picos más angostos y más definidos o puntiagudos (Figura 4.20b-c), lo cual sugiere la presencia de una estructura más quebradiza o frágil, siendo menor el trabajo o energía requerida para su ruptura ($< W$). Cabe recordar que el proceso de impregnación a vacío al que fueron sometidas las rodajas de manzana se realiza empleando una solución isotónica con respecto a los azúcares de la fase

líquida de la fruta, lo que previene el intercambio de agua y de sólidos solubles por mecanismos difusivos, teniendo lugar solamente la entrada de líquido externo hacia el interior de la estructura. Resulta evidente que la incorporación de agua y de azúcares provenientes del extracto de sauco genera alteraciones no sólo a nivel de la composición final del tejido liofilizado sino también de sus características microestructurales. Si se comparan los snacks con diferente tratamiento de impregnación, las muestras SIVA presentaron una $F_{m\acute{a}x}$ levemente mayor en comparación con SIV (**Tabla 4.15**), lo que podría deberse a un mayor porcentaje de poros ocupados por sólidos solubles provenientes del extracto de sauco incorporado durante el proceso de impregnación (al restablecerse la presión atmosférica), confiriendo así una mayor resistencia de la estructura a la fractura. Este comportamiento de fractura se revierte al incorporar un escaldado previo en muestras SIVA-E, debido al efecto combinado de pretratamientos (calor y tiempos largos de inmersión en un medio acuoso) intensificando el deterioro de la estructura. Por un lado, como se ha observado previamente, los tratamientos térmicos provocan disrupción de paredes y membranas celulares, pero los tiempos largos de inmersión en soluciones isotónicas pueden ocasionar solubilización e hidrólisis de pectinas, dando lugar a un ablandamiento general del tejido (Anino y col., 2006, Alzamora y col., 2000). Ello habría generado luego de la liofilización una estructura de menor firmeza y rigidez. En muestras SIV-E, en cambio, no se observaron diferencias tan notables en los parámetros mecánicos obtenidos en comparación con las muestras que no sufrieron tratamiento térmico (SIV).

Otros autores han estudiado las propiedades mecánicas de manzanas sometidas a procesos de inmersión o impregnación con soluciones de diferentes solutos y composición. Por ejemplo, Deng y Zaho (2008) analizaron manzanas liofilizadas que habían sido previamente deshidratadas osmóticamente (3 h, con y sin la aplicación de dos pulsos de vacío de 5 min) con soluciones de jarabe de maíz de alta fructosa. Obtuvieron valores de $F_{m\acute{a}x}$ más elevados tanto para aquellas muestras que no fueron tratadas con pulsos de vacío, como para aquellas que sí (19-25,5 N). Estos autores indicaron que el aumento en la dureza de estas muestras se debió a que la aplicación de pulsos de vacío permitió un mayor ingreso de solución, reemplazando el aire presente en los poros del tejido, y formando una estructura más compacta y menos deformada que aquellas manzanas sometidas al mismo tratamiento sin pulsos de vacío. Por otro lado, Sosa y col. (2012), estudiaron el efecto de procesos de infusión seca con sacarosa en rodajas de manzanas liofilizadas, obteniendo valores de $F_{m\acute{a}x}$ mucho mayores en muestras con azúcares incorporados (entre 44-54 N) que en aquellas que no habían recibido ningún tipo de tratamiento (7,1 N). Estos autores atribuyen la fragilidad de las muestras liofilizadas a la porosidad generada luego del proceso de deshidratación, y reportan un aumento en la resistencia del material en muestras con infusión previa.

Si bien los pretratamientos utilizados por los autores citados son diferentes a los del presente trabajo, dado que utilizaron procesos que corresponden a una deshidratación osmótica (pérdida de agua + ganancia de azúcares), es posible concluir que la incorporación de sólidos a la matriz vegetal, ya sea por mecanismos

difusivos, por introducción directa de líquido externo o ambos fenómenos a la vez, en general produce un aumento de la resistencia de los materiales a la fractura. Sin embargo, en los trabajos mencionados tiene lugar una incorporación mucho más importante de sólidos solubles, que en algunos casos quedan muy retenidos en la superficie del tejido, generando luego del secado un material mucho más compacto y de mayor dureza o firmeza.

Análisis de la ultraestructura de los snacks mediante MEB

Dentro de los factores que provocan la pérdida de crujencia se encuentran el contenido de agua y la modificación del arreglo celular inicial que presenta el tejido vegetal. Por otro lado, se ha observado que los pretratamientos térmicos aplicados al tejido y el proceso de impregnación pueden debilitar o mejorar sus propiedades mecánicas, ya sea por disrupción de la estructura celular (encogimiento de células, ruptura y plegamiento de pared celular, pérdida de turgor, etc.) o por el ingreso de sustancias provenientes del líquido de impregnación que restauran parcialmente la microestructura vegetal. Es decir, que la respuesta mecánica de los snacks estudiados será el resultado del comportamiento de la matriz celular y de la fase amorfa interna del tejido que contiene sólidos solubles, ambas con diferente interacción con el agua (Contreras y col., 2005).

Con el objeto de poder explicar con mayor profundidad el comportamiento mecánico de los tejidos de manzana sometidos a los distintos procesos, se realizó la caracterización de la ultraestructura mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB). Las **Figuras 4.22, 4.23 y 4.24** presentan las fotomicrografías obtenidas de la zona de tejido superficial de los snacks tomadas a distintos aumentos. En la **Figura 4.22**, correspondiente a un aumento de 300x, puede observarse que las muestras SC-E, las cuales habían recibido sólo un escaldado previo a la liofilización (**Figura 4.22B**), exhiben un tejido con células más deformadas y de menor tamaño en comparación con las muestras control (**Figura 4.22A**), así como también un mayor contacto célula-célula, lo que denota una leve compactación del tejido, coherentemente con lo observado previamente mediante MO en tejidos escaldados (**Figura 4.21**). Este comportamiento frente a tratamientos térmicos es típico de frutas porosas como la manzana con espacios intercelulares llenos de aire, los cuales pueden apreciarse en la muestra SC (**Figura 4.22A**). A mayores aumentos (**Figura 4.24B**) se observa en la muestra SC-E, que las células presentan paredes celulares debilitadas con plegamientos.

En muestras impregnadas (**Figuras 4.22C y E, y 4.23C y E**), si bien las micrografías exhiben un tejido con células levemente deformadas y un mayor contacto célula-célula, no se observan grandes diferencias en el patrón de deformación en comparación con las muestras control. Es posible, además, observar un recubrimiento parcial de la estructura que correspondería a la formación de una matriz concentrada

generada como consecuencia de la acumulación superficial de extracto de sauco durante el proceso de impregnación. Este efecto se observa en mayor grado en muestras SIVA (**Figura 4.22E**), en las cuales es posible detectar a mayores aumentos, la formación de estructuras amorfas visiblemente ubicadas en el volumen intracelular (**Figura 4.23E**). En estas muestras, que fueron impregnadas a tiempos largos, es probable que un mayor ingreso de volumen de líquido de impregnación (extracto de sauco de 11 °Brix) hacia el interior del tejido haya generado luego de la liofilización, la formación de estas deposiciones correspondientes mayoritariamente a azúcares en estado amorfo inicialmente contenidos en el extracto. Este recubrimiento de la estructura superficial desaparece en parte, al aplicar un escaldado previo en las muestras SIV-E y SIVA-E (**Figura 4.22D-F**), probablemente por la incapacidad de la estructura de retener superficialmente el líquido durante la impregnación. Además, puede apreciarse en estas muestras impregnadas con escaldado previo que el tejido ha colapsado, mostrando células muy deformadas y de tamaño mucho más reducido que la correspondiente muestra impregnada sin escaldado previo, sobre todo en las muestras sometidas a menores tiempos de impregnación (**Figura 4.22D**).

A mayores aumentos (**Figuras 4.23 y 4.24**) es posible visualizar el efecto de los distintos procesos sobre las paredes celulares de los tejidos. Se observa que las muestras SIV-E (**Figuras 4.23D y 4.24D**) y SIVA-E (**Figuras 4.23F y 4.24F**) presentan paredes celulares más delgadas, con mayor plegamiento y ruptura respecto a sus análogas sin escaldado (SIV y SIVA, **Figuras 4.24C y E**). Estos resultados permitirían explicar, al menos en parte, el comportamiento mecánico de las muestras con tratamiento térmico previo, el cual, si bien no tuvo un efecto significativo sobre la fuerza máxima de ruptura de las muestras control e impregnadas, afectó principalmente el módulo de deformabilidad y en el caso de muestras SIV-E, el grado de aserramiento de las curvas F vs. d obtenidas a través del ensayo de punción. El debilitamiento y plegamiento de las paredes celulares permite a la estructura deformarse fácilmente frente a la aplicación de una fuerza y de esa manera distribuir la energía hacia el resto de la estructura, manifestándose a través de un menor número de eventos de ruptura o fractura.

Por otro lado, se observa que las muestras SIVA (**Figura 4.23E y 4.24E**) presentan paredes celulares más reforzadas que SIV, con una mayor deposición de azúcares (ver flechas en las micrografías) en su estructura superficial, presentando el tejido un arreglo celular más similar a la muestra SC, lo cual explicaría su mayor resistencia a la ruptura y mayor rigidez. En este caso, el ingreso de una mayor cantidad de extracto de sauco al interior del tejido luego del restablecimiento de la presión atmosférica, pareciera proteger a las células de la deformación típica que tiene lugar en tejidos porosos sometidos a procesos de IV. Esta recuperación parcial del volumen celular luego de tiempos largos de impregnación es posible debido al comportamiento viscoelástico de las paredes celulares del tejido, y justificaría que las muestras SIVA muestren un comportamiento mecánico similar al control SC, aumentando la resistencia a la ruptura ($> F_{m\acute{a}x}$), a pesar de los tratamientos aplicados. En muestras SIVA-E (**Figura 4.22F**), si bien se observan células formando parte de

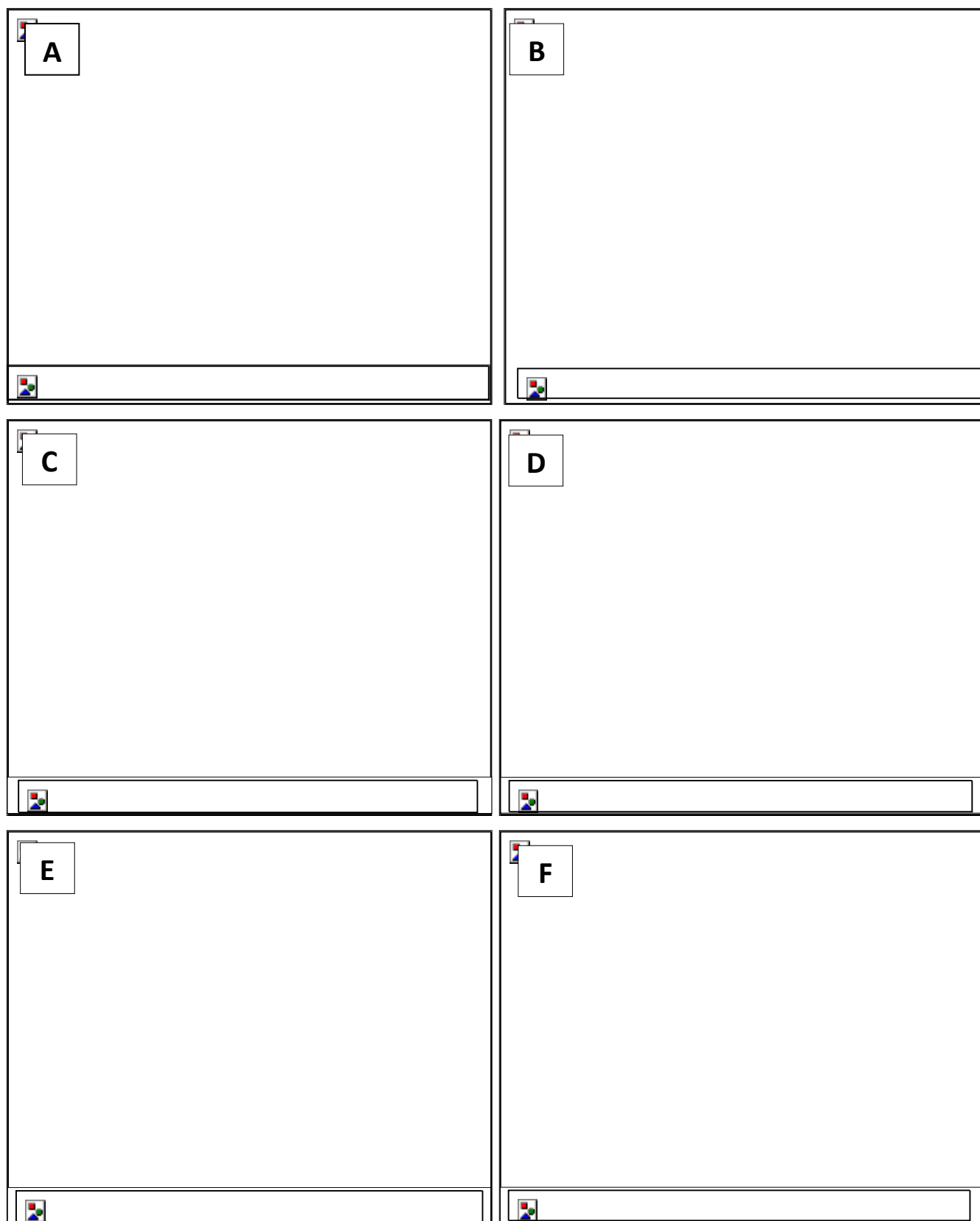


Figura 4.22. Caracteres microestructurales de snacks liofilizados de manzana y sauco. Fotomicrografías obtenidas con MEB (300x). (A) SC; (B) SC-E; (C) SIV; (D) SIV-E; (E) SIVA; (F) SIVA-E. c: célula; ei: espacio intercelular.

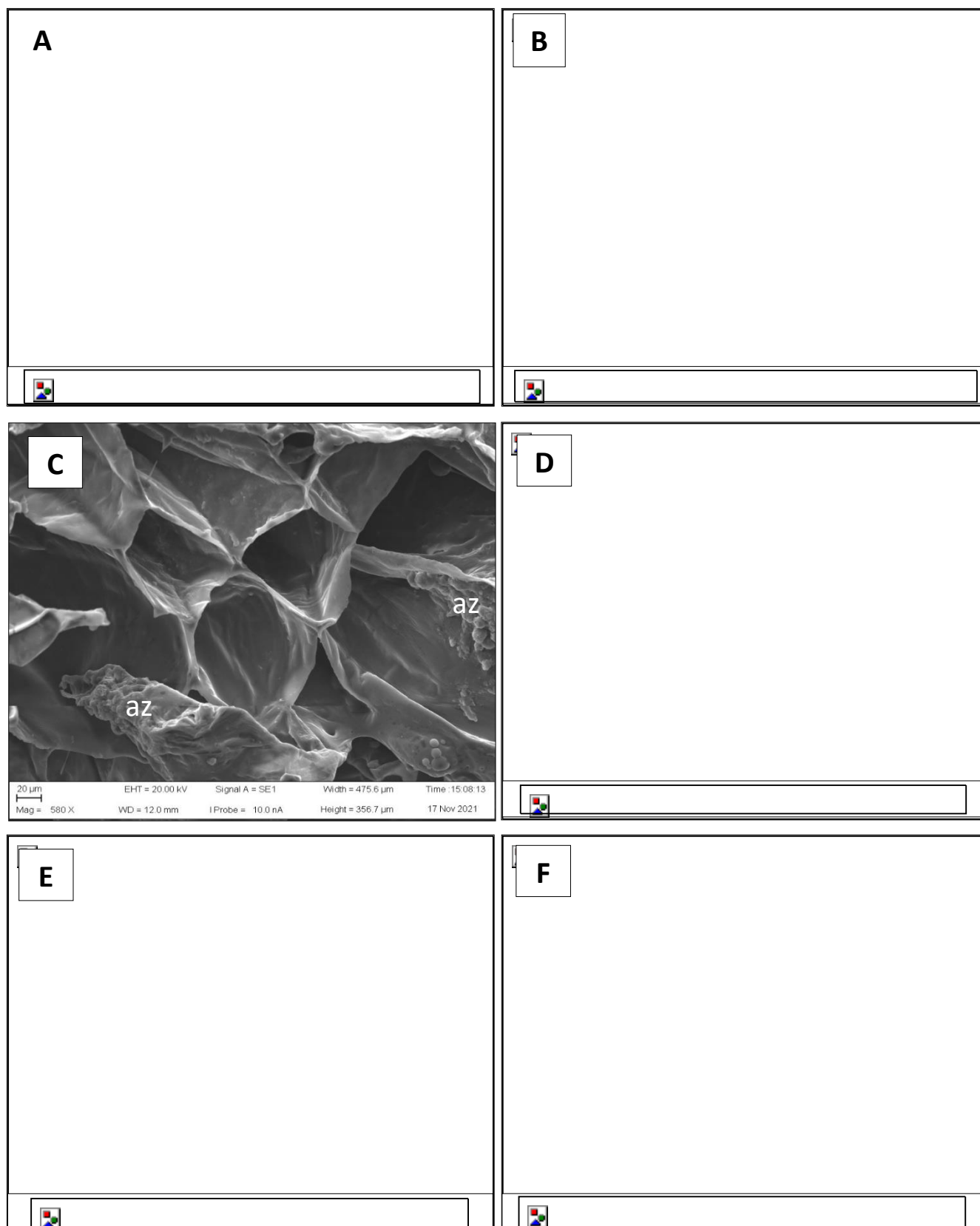


Figura 4.23. Caracteres microestructurales de snacks liofilizados de manzana y sauco. Fotomicrografías obtenidas con MEB (600x). (A) SC; (B) SC-E; (C) SIV; (D) SIV-E; (E) SIVA; (F) SIVA-E. az: azúcares.

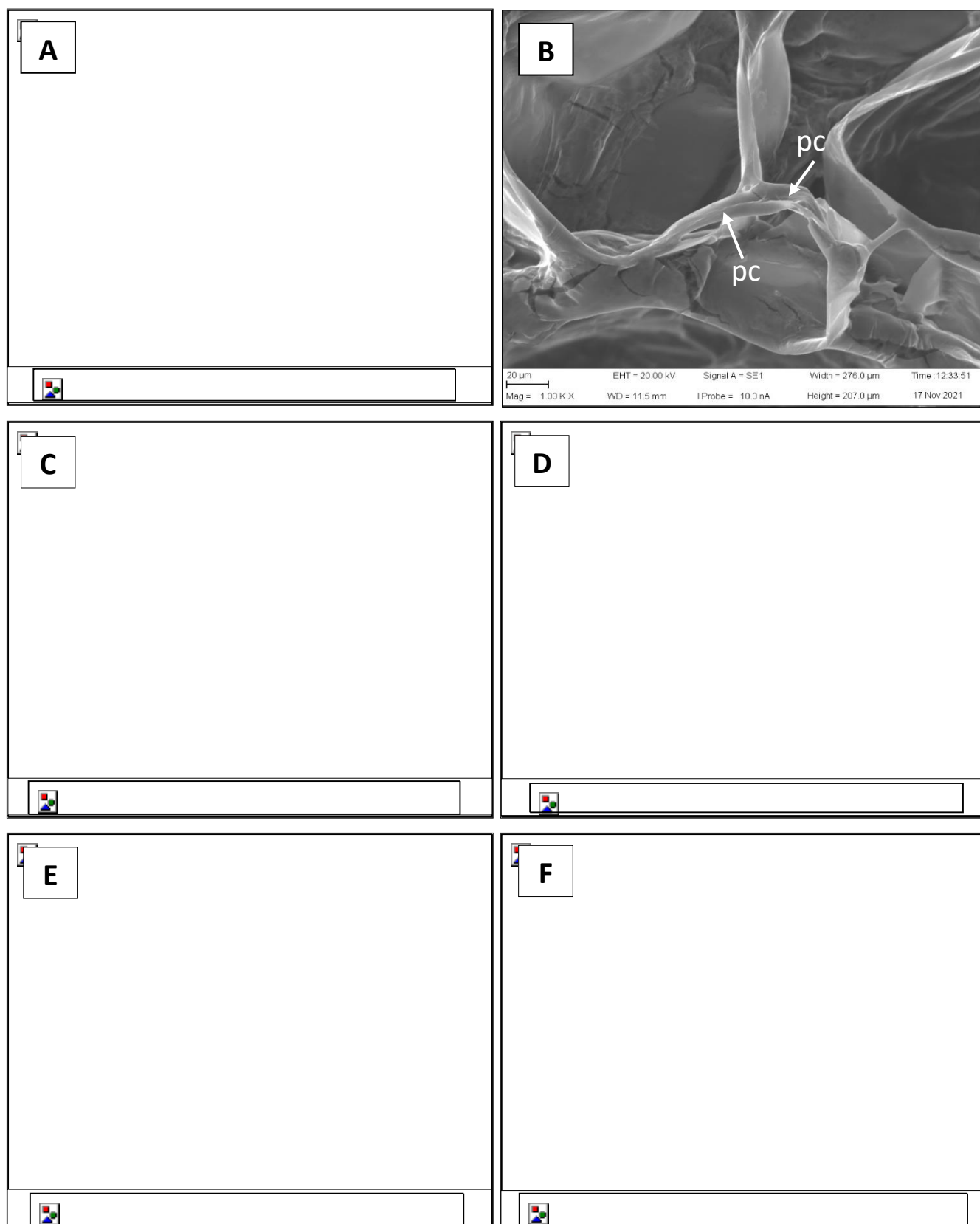


Figura 4.24. Caracteres microestructurales de snacks liofilizados de manzana y sauco. Fotomicrográficas obtenidas con MEB (1000x). (A) SC; (B) SC-E; (C) SIV; (D) SIV-E; (E) SIVA; (F) SIVA-E. mp: membrana plasmática; pc: pared celular; az: azúcares.

un tejido más compacto (de menor porosidad) con una estructura que denota la presencia previa de líquido de impregnación, se observa una cierta pérdida del arreglo celular por efecto del escaldado en comparación con SIVA, presentando un mayor deterioro de paredes y membranas celulares, dando como resultado un material de menor dureza o firmeza ($F_{máx} < W$).

La ultraestructura de frutas deshidratadas y en particular de tejidos de manzana ha sido estudiada por distintos autores (Sham y col., 2001; Deng y Zaho, 2008; Assis y col., 2019; Kahraman y col., 2021). No obstante, el enfoque de las investigaciones se ha inclinado principalmente hacia la comparación de muestras deshidratadas por diferentes métodos, como microondas, secado convectivo, liofilización, entre otros.

En los distintos estudios, si bien los procesos utilizados como etapas previas a procesos de liofilización son variados y dificultan la comparación con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que los tejidos de manzana sufren cambios a nivel de la microestructura, viéndose intensificados o no de acuerdo a las condiciones del proceso global elegido, impactando en mayor o menor grado sobre las propiedades físicas y composicionales. Esto destaca la importancia del análisis de la microestructura de alimentos deshidratados y su correlación con el comportamiento mecánico, propiedades íntimamente relacionadas con la estabilidad y aceptabilidad final del producto.

Color superficial

Luego de la impregnación con extracto de sauco, las manzanas se tiñeron notablemente con los pigmentos antocianicos, adquiriendo tonalidades entre el rojo y púrpura, características del fruto utilizado. En la **Figura 4.25** se presentan imágenes de los snacks obtenidos junto a los parámetros cromáticos medidos.

Puede apreciarse que los snacks no impregnados presentaron características cromáticas correspondientes a muestras blanquecinas con ausencia de pardeamiento, aún en muestras no escaldadas, debido al proceso de deshidratación utilizado. Es sabido que la liofilización reduce las variaciones de color que se producen en productos deshidratados debido a reacciones de degradación tanto enzimática como no enzimática, las cuales son minimizadas debido al uso de bajas temperaturas y la rápida transición de alto a bajo contenido de humedad (Ratti, 2001).

Los parámetros cromáticos obtenidos son similares a los reportados por Sosa y col. (2012) en rodajas de manzana liofilizada. Puede notarse que la muestra SC-E presentó una luminosidad levemente mayor ($p < 0,05$) que su análoga sin escaldado (SC), y una leve disminución del parámetro b^* , probablemente a causa de la inactivación de enzimas como la polifenoloxidasas responsable de la generación de compuestos pardos.

En cuanto a las muestras impregnadas, la luminosidad disminuyó notablemente al ingresar los pigmentos del sauco al tejido de la manzana, a causa de la concentración y tonalidad que presentaron los mismos. Este efecto fue observado también por Castagnini y col. (2015) en manzanas liofilizadas luego de ser impregnadas

mediante IV con jugo de arándano. Si bien fue detectable un leve efecto del pretratamiento de escaldado en las muestras control, el mismo no afectó al color final que tuvieron los snacks previamente impregnados con sauco.







SC  $L^* = 79 \pm 2^c$ $a^* = -2,9 \pm 0,4^a$ $b^* = 14,0 \pm 0,5^d$ $C^*_{ab} = 14,3 \pm 0,4^e$ $h_{ab} = 282 \pm 2^c$	SC-E  $L^* = 82 \pm 1^d$ $a^* = -2,9 \pm 0,2^a$ $b^* = 12,6 \pm 0,4^c$ $C^*_{ab} = 12,9 \pm 0,9^d$ $h_{ab} = 282,9 \pm 0,8^c$
SIV  $L^* = 31,3 \pm 0,2^b$ $a^* = 6 \pm 1^c$ $b^* = 1,4 \pm 0,3^a$ $C^*_{ab} = 6 \pm 1^b$ $h_{ab} = 13,7 \pm 0,2^a$	SIV-E  $L^* = 32,0 \pm 0,2^b$ $a^* = 9 \pm 2^d$ $b^* = 2,2 \pm 0,4^b$ $C^*_{ab} = 9 \pm 2^c$ $h_{ab} = 13,8 \pm 0,1^a$
SIVA  $L^* = 30,2 \pm 0,2^a$ $a^* = 3,8 \pm 0,9^b$ $b^* = 1,0 \pm 0,2^a$ $C^*_{ab} = 3,8 \pm 0,9^a$ $h_{ab} = 15 \pm 0,5^b$	SIVA-E  $L^* = 30,7 \pm 0,1^a$ $a^* = 4,7 \pm 0,6^{bc}$ $b^* = 1,3 \pm 0,2^a$ $C^*_{ab} = 4,7 \pm 0,6^a$ $h_{ab} = 15,0 \pm 0,9^b$

Figura 4.25. Parámetros de color del espacio CIELAB correspondientes a los distintos snacks. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras.

Los valores obtenidos en los parámetros a^* y b^* indican que los cuatro snacks de manzana y sauco se ubicaron en el primer cuadrante del espacio CIELAB (a y b positivos), siendo típico de las frutas finas de tonalidades rojizas. Sin embargo, para definir con mayor precisión el color de una muestra, es recomendable hablar de ángulo de tono (h_{ab}) y saturación o intensidad de color (C^*_{ab}). En las muestras impregnadas no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) por aplicación de un escaldado previo, pero sí se observó una diferencia de 1° entre los snacks generados mediante IV ($h_{ab} = 14^\circ$) y aquellos sometidos al tratamiento IVA

($h_{ab} = 15^\circ$). Valores próximos a 0° indican una tonalidad rojo-púrpura y una diferencia de 1° ya es perceptible al ojo humano (Wrolstad y col., 2005).

Con respecto a C^*_{ab} , las muestras SIV y SIV-E presentaron valores significativamente mayores (6 ± 1 y 9 ± 2 , respectivamente) respecto de los demás snacks enriquecidos en sauco. El mayor valor de croma de la muestra SIV-E estaría asociado al mayor contenido de pigmentos que se logra alcanzar por efecto del pretratamiento de escaldado en relación a SIV. A su vez, este valor junto a una mayor luminosidad respecto a las muestras SIVA y SIVA-E, pareciera conferirle una tonalidad más rosada (**Figura 4.25**). Si bien la intensidad del color se relaciona con la concentración de pigmentos, un aumento en la concentración de los mismos puede conducir a una disminución de C^*_{ab} cuando el color se oscurece (Wrolstad y col., 2005), fenómeno que parece haber ocurrido en las muestras SIVA y SIVA-E, las cuales presentaron una luminosidad levemente menor. Estos snacks presentaron valores de C^*_{ab} en el rango 4,1-4,8 a pesar de haber experimentado un incremento del contenido de antocianinas monoméricas.

4.5.2.3. Percepción del consumidor

Se realizó un estudio sensorial con el fin de explorar la percepción del consumidor sobre los snacks de manzana enriquecidos con extracto de sauco. La selección de la foto para poder realizar este estudio, se basó en las muestras que presentaban mejores propiedades bioactivas y mecánicas, que serían SIVA-E y SIVA, respectivamente. Debido a que las muestras presentaron una apariencia muy similar, se utilizó una de ellas para la elaboración de la encuesta utilizada. Para ello se aplicó el ensayo de asociación libre de palabras. Esta técnica permite estudiar las estructuras conceptuales y los cambios de actitud a nivel psicológico y sociológico, sin la necesidad de estudios cuantitativos más tediosos, los cuales consumen mucho más tiempo y recursos costosos (Vidal y col., 2013; Gambaro, 2018).

El estudio utilizó un grupo variado de 411 potenciales consumidores. Para el análisis se extrajeron de cada una de las respuestas las palabras relacionadas a la opinión del producto, obteniendo una lista de 940 palabras. Esto permitió generar una nube de palabras mediante el software *Word Art*, disponible online (**Figura 4.26**). En la nube pueden observarse vocablos con distintos tamaños, lo cual se relaciona con la frecuencia de aparición de las distintas palabras (a mayor tamaño, mayor frecuencia de aparición).

Dentro de la lista de palabras se encontraron los siguientes vocablos más frecuentes: “*saludable* (n= 99), *fruta* (n= 65), *interesante* (n= 55), *rico* (n= 51)”. Con el fin de identificar más fácilmente la opinión de los consumidores sobre el producto, se definieron las siguientes categorías para agrupar vocablos: *Aceptación*, *Salud*, *Aspecto*, *Productos*, *Gusto* y *Varios*. La **Tabla 4.16** presenta distintos ejemplos de vocablos dentro de una categoría y cómo varió el porcentaje de aparición de palabras en cada categoría.



Figura 4.26. Nube de palabras obtenida a partir del estudio de percepción del consumidor, mediante el software *Word art*.

La categoría *Aceptación* (31%) presentó el mayor contenido de palabras, seguida de *Salud* (18,3%), *Aspecto* (18,2%), *Productos* (14,5%), *Gusto* (14%) y *Varios* (4%). Estos resultados indican que la aceptación, el aspecto y aquellos términos relacionados con la salud, fueron las asociaciones más importantes entre las respuestas de los consumidores.

A continuación del análisis de cada palabra/grupo de palabras en las respuestas de los consumidores, se evaluó la predominancia de los términos positivos y negativos presentes en aquellas categorías relacionadas con la opinión sobre el snack (*Aspecto, Gusto, Salud y Aceptación*). En la **Figura 4.27** se observa que en tres de las cuatro categorías seleccionadas predominaron las evaluaciones positivas mostrando altos porcentajes de aceptación: se lo consideró un producto saludable (91% de términos positivos), de sabor rico (67% de términos positivos), predominando la buena aceptación (87% de términos positivos). Por otro lado, el aspecto mostró solamente un 36% de apreciaciones positivas.

Tabla 4.16. Categorías y frecuencia de aparición de palabras en las mismas, obtenidas a partir del estudio de asociación libre realizado sobre el snack de sauco y manzana.

Categoría	Ejemplos	Total de palabras por categoría	Frecuencia (%)
Aceptación	Me gusta, interesante, buena idea, no me gusta, aburrido, confuso, no tentador, no lo compraría, desagradable, novedoso, sabroso, etc.	291	31
Salud	Saludable, sin agregado de azúcar, artificial, calorías, aditivos, conservantes, procesado, harinas, colación, antioxidantes, nutrientes, etc.	172	18,3
Aspecto	Seco, duro, suave, mal aspecto, buen color, sucio, mal forma, etc.	171	18,2
Productos	Frutas, manzana, sauco, banana, chips banana, arándano, berries, snack, snack frutal, bizcochito, galletita, remolacha, carne, gomita, chicle, etc.	137	14,6
Gusto	Fresco, no fresco, dulce, sabor, ácido, salado, amargo, etc.	132	14
Varios	Más oferta, caro, industria, marketing, liofilizadas, Zona, lectura, foto, Patagonia, niños, etc.	37	4

A su vez, se evaluó la intención de compra del snack elegido. Los resultados mostraron que el 54% de los participantes compraría el snack, el 38,9% tal vez lo haría y solo el 7,1% no lo compraría. Estos resultados, en conjunto con el análisis de palabras y categorías, indicaría que dentro de los encuestados existe cerca del 93% de potenciales consumidores del snack de manzana y sauco, lo cual indicaría que, habiendo evaluado previamente la aceptación global mediante técnicas cuantitativas, el producto podría llegar a considerarse un posible prototipo a lanzar al mercado.

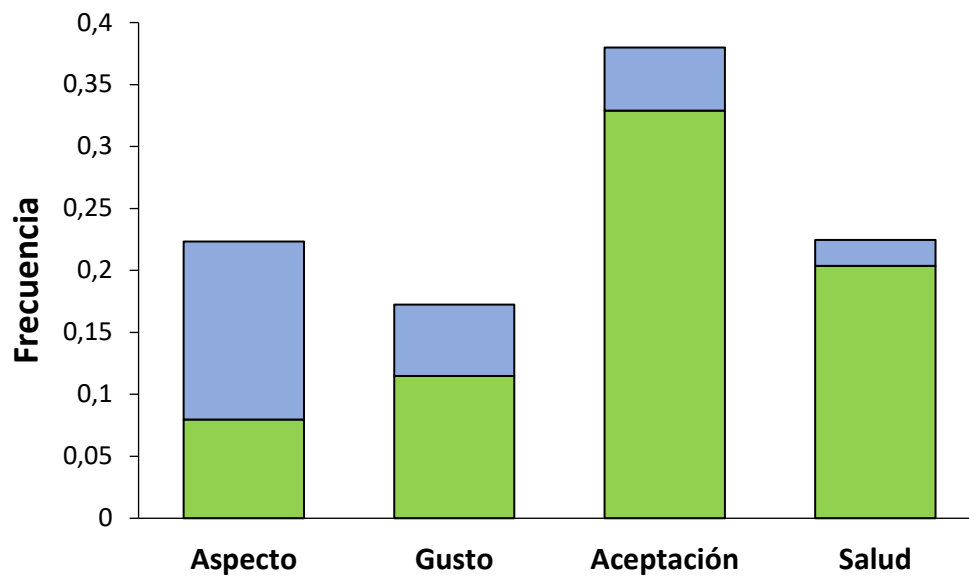


Figura 4.27. Frecuencia de aparición de palabras positivas (verde) y negativas (celeste) dentro de cada categoría relacionada con la opinión del consumidor por el snack.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis apuntó a realizar un estudio integral para aprovechar el potencial bioactivo de los frutos de sauco para el desarrollo de ingredientes y alimentos con funcionalidad enriquecida.

Materia prima

- La caracterización de frutos de sauco mediante el uso de distintas técnicas analíticas permitió comprobar que se trata de una materia prima con una elevada concentración de compuestos fenólicos, fundamentalmente antociánicos, destacándose frente a otras berries que crecen en la Patagonia Argentina. Esto lo convierte en un fruto con gran potencial para el desarrollo de ingredientes funcionales o colorantes naturales. Se destaca que actualmente este fruto está subexplotado industrialmente a nivel nacional.

Obtención de extractos mediante tecnologías verdes

- Se obtuvieron extractos líquidos de sauco mediante el uso de distintas tecnologías de extracción amigables con el medio ambiente, evitando el uso de solventes orgánicos tóxicos y disminuyendo la problemática asociada a la disposición de los mismos.
- El método de extracción asistida por enzimas (EAE) permitió obtener extractos mucho más ricos en compuestos bioactivos (concentraciones entre 4 y 5 veces mayores), en comparación con los extractos generados por extracción asistida por ultrasonidos (EAU). Sin embargo, ambos extractos optimizados presentaron buenas características para su aplicación directa en el desarrollo de ingredientes o alimentos potencialmente funcionales.
- El proceso optimizado de EAE resultó altamente satisfactorio con respecto a la extracción de compuestos bioactivos, alcanzando porcentajes superiores al 40% en comparación con un jugo obtenido por prensado directo de la fruta.
- Fue posible identificar mediante distintas técnicas analíticas los principales compuestos fenólicos individuales presentes en el extracto óptimo EO seleccionado, pudiendo establecer los distintos grupos de polifenoles (antocianinas, flavan-3-oles, flavonoles y ácidos fenólicos) que estarían contribuyendo a la capacidad antioxidante del extracto y cuya proporción se mantuvo sin muchas diferencias respecto de la fruta, a pesar del tratamiento enzimático aplicado.

Ingredientes en polvo de sauco

- La estabilización de extractos obtenidos por EAU mediante liofilización y secado por atomización permitió obtener polvos de buenas propiedades físicas. A pesar de que estos polvos podrían ser mejorados en cuanto a su potencial bioactivo, podrían ser igualmente incorporados en distintos alimentos para enriquecer el perfil fenólico o aportar colores atractivos.
- Se optimizó la formulación del extracto óptimo obtenido por EAE, de manera de obtener un polvo liofilizado de máxima concentración de compuestos bioactivos y buenas propiedades físicas, mediante el análisis de la temperatura de transición vítrea. Este polvo presentó una elevada concentración de polifenoles y pigmentos (CPT \approx 2637 mg ác. gálico/100g, ACY \approx 1400 mg cyn-3-glu/100g), elevada capacidad antioxidante (AA \approx 1385 mg ác. gálico/100g de polvo) y muy buena solubilidad (\approx 90 %), preservando el color rojo púrpura característico de frutos de sauco.
- El estudio de almacenamiento realizado, conjuntamente con el comportamiento de sorción y la temperatura de transición vítrea del polvo de sauco, permitió obtener información valiosa respecto a la estabilidad del ingrediente en polvo desarrollado, definiendo así la posibilidad de su conservación a temperatura ambiente en un envase adecuado para un producto liofilizado.
- El estudio de digestión *in vitro* mostró una elevada bioaccesibilidad (> 50%) de los compuestos antioxidantes contenidos en un jugo preparado con el polvo de sauco desarrollado. Además, el 50% de los compuestos bioaccesibles sería capaz de atravesar la barrera intestinal, pudiendo llegar al torrente sanguíneo y ejercer su actividad biológica.

Desarrollo de un snack potencialmente funcional

Pretratamientos

- Se aplicaron pretratamientos de escaldado y de impregnación a vacío, tanto IV (tiempos cortos a presión atmosférica) como IVA (tiempos largos a presión atmosférica), para promover la incorporación de compuestos bioactivos del extracto de sauco en rodajas de manzana. Se realizó una interpretación del comportamiento del tejido frente a los distintos pretratamientos, lo cual permitió identificar las condiciones a seleccionar para alcanzar productos de características definidas de enriquecimiento en compuestos fenólicos.

Compuestos bioactivos

- Los snacks liofilizados obtenidos luego de la aplicación de los distintos pretratamientos alcanzaron altos niveles de compuestos bioactivos y una elevada capacidad antioxidante. Con respecto a los compuestos

fenólicos, se obtuvo un rango entre ≈ 460 y 920 mg por porción de snack (30g) dependiendo de los procesamientos aplicados. Los snacks de mayor nivel de polifenoles requirieron la aplicación de escaldado y tiempos largos de impregnación (tiempo total de proceso IVA: 6 h y 10 min), mientras que los valores más bajos correspondieron a las muestras con el pretratamiento IV de tan sólo 20 min. Por lo tanto, es posible desarrollar distintos productos de acuerdo a las posibilidades tecnológicas y económicas disponibles para alcanzar en todos los casos snacks que aportan una proporción importante de compuestos fenólicos a la dieta, teniendo en cuenta que una dieta mediterránea contempla el consumo de ≈ 800 mg de polifenoles por día.

- Adicionalmente, los estudios espectrofotométricos y por HPLC permitieron caracterizar los principales compuestos fenólicos presentes tanto en la manzana como en los distintos snacks desarrollados, brindando un aporte más concreto sobre la calidad de los bioactivos presentes en estos productos.

Estabilidad

- La principal causa de pérdida de estabilidad de los snacks liofilizados frente al incremento en la actividad de agua fueron los cambios en la textura, presentando ablandamiento y pérdida de crujencia. La temperatura de transición vítrea no resultó un parámetro útil para establecer la estabilidad de las muestras debido a que no representó adecuadamente las propiedades mecánicas observadas en los snacks liofilizados. Sin embargo, la información provista por las isothermas de sorción de agua permitió identificar el rango de % de agua adsorbida que conduce a cambios de textura indeseable en los productos liofilizados. En este sentido, se destaca la higroscopicidad relativamente baja de los snacks (en un rango de bajas HR), lo cual representaría una ventaja para conservar las propiedades texturales durante el almacenamiento, empleando envases adecuados.

Propiedades mecánicas

- Dada la complejidad de las propiedades mecánicas en los alimentos deshidratados, por un lado, se realizó una evaluación instrumental, de manera de poder describir las características típicas de los snacks y poder realizar comparaciones con productos similares informados en la bibliografía. Los snacks se presentan como un alimento crujiente, y dependiendo de los pretratamientos aplicados, sus propiedades texturales son variables. Estas diferencias fueron analizadas y descritas en profundidad mediante la realización de estudios de la micro y ultraestructura. Estos estudios contribuyeron a comprender no solamente las diferencias en las propiedades mecánicas sino también en la retención de compuestos bioactivos del extracto de sauco.

Propiedades sensoriales

- En este trabajo se realizó una evaluación sensorial cualitativa, la técnica proyectiva de asociación de palabras, con el objeto de recabar la opinión de potenciales consumidores sobre un snack seleccionado. Este estudio permitió identificar el vocabulario con el cual los consumidores asocian al producto. Además, los resultados mostraron un elevado nivel de aceptación general e intención de compra del producto, lo que sugiere que sería interesante continuar realizando estudios sensoriales cuantitativos con consumidores para verificar el potencial para considerar a los snacks como prototipos para su lanzamiento al mercado.

Conclusión final

Teniendo en cuenta el objetivo general de la presente Tesis, esto es, agregar valor a una berry silvestre (sauco) de la Patagonia Argentina, de alta disponibilidad y elevadas propiedades antioxidantes para la elaboración de nuevos productos y alimentos funcionales, se puede concluir que dicho objetivo fue alcanzado. En efecto, partiendo de la forma de comercialización más común del sauco (fruto congelado) se pudo elaborar productos intermedios (extractos optimizados) mediante la aplicación de distintos procesos tecnológicos amigables con el medio ambiente. A partir del extracto de mejor performance se obtuvo por un lado un ingrediente en polvo liofilizado de sauco con gran potencial para ser utilizado como ingrediente funcional, colorante natural o nutracéutico. Por otro lado, se estudió la incorporación del extracto optimizado como ingrediente en el desarrollo de un alimento enriquecido en compuestos bioactivos; se obtuvo así un snack frutal de bajas calorías y de buenas propiedades físicas, cuyo consumo (porción de 30 g) implicaría un aporte de polifenoles a la dieta equivalente a la ingesta diaria en países de mayor consumo. En todos estos desarrollos se hizo especial hincapié en la evolución de los compuestos fenólicos antociánicos y no antociánicos a lo largo de las distintas etapas de procesamiento (materia prima, extracto, polvo, snack).

Teniendo en cuenta la escasa oferta de alimentos/ingredientes a base de frutos de sauco, en particular productos deshidratados con aporte funcional, los distintos productos generados en este trabajo mostraron ser una alternativa para una alimentación más saludable.

Cabe aclarar que, durante el desarrollo de esta tesis, el proceso de extracción optimizado mediante EAE fue transferido a una empresa líder en el desarrollo de ingredientes para la industria alimenticia y farmacéutica, interesada en el desarrollo de ingredientes en polvo a partir de frutos de sauco. Actualmente el grupo de investigación se encuentra realizando el escalado del proceso de extracción en conjunto con dicha empresa con miras a la obtención de polvos de sauco para ser comercializados como nutracéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía citada

- Abalos, R.A., Naef, E.F., Aviles, M.V., & Gómez, B. (2020). Vacuum impregnation: A methodology for the preparation of a ready-to-eat sweet potato enriched in polyphenols. *LWT- Food Science and Technology*, 131, 109773.
- Akbulut, M., Ercisli, S., & Tosun, M. (2009). Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine*, 5 (20), 320-323.
- Alfaro, S., Mutis, A., Quiroz, A., Seguel, I., & Scheuermann, E. (2014). Effects of Drying Techniques on Murtilla Fruit Polyphenols and Antioxidant Activity. *Journal of Food Research*, 3, 73-82.
- Alongi, M., & Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*, 81, 104466.
- Alonso, J.R. (1998). Tratado de fitomedicina, Bases clínicas y farmacológicas. pp 883-886. Buenos Aires, Editorial Isis.
- Alzamora, S.M., Salvatori, D., Tapia, M.S., López-Malo, A., Welte-Chanes, J. y Fito, P. (2005). Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *Journal of Food Engineering*, 67, 205-214.
- Alzamora, S.M., Castro, M.A., Vidales, S.L., Nieto, A.B., & Salvatori, D. (2000). The rol of tissue microstructure in the textural characteristics of minimally processed fruits. En: Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental Aspects and Applications, Part II, ch. 9 - pp. 153-171. Eds. S.M. Alzamora, M.S. Tapia and A. López Malo. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, USA.
- Anino, S., Salvatori, D., & Alzamora, S.M. (2006). Changes in calcium level and mechanical properties of apple tissue due to impregnation with calcium salts. *Food Research International*, 39, 154-164.
- Anttonen, M.J., & Karjalainen, R.O. (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 759-769.
- AOAC. (2006) Official Methods of Analysis of AOAC Internatioanl, 18th ed. The Association of Official Analytical Chemists Inc, Gaithersburg, MD, USA.
- Araya-Farías, M., & Ratti, C. (2009). Dehydration of Foods: General Concepts. En Advances in Food Dehydration. C. Ratti (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Archaina, D., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2017). Physical and functional properties of spray-dried powders from blackcurrant juice and extracts obtained from waste of juice processing. *Food Science and Technology International*, 24 (1), 78-86.

- 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.
- Ares, G., Giménez, A., & Gambaro, A. (2008). Understanding consumers' perception of conventional and functional yogurts using word association and hard ladderling. *Food Quality and Preference*, 19, 636-643.
- Ares, G., & Varela, P. (2018). Consumer-based methodologies for sensory characterization. En *Methods in Consumer Research*, 1a ed., pp 187-207. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Elsevier.
- Arnold, G. (2016). Berries and blood pressure. In: *Fruits, Vegetables, and Herbs*, chp. 15. Elsevier Inc.
- Assis, F.R., Rodrigues, L.G.G., Tribuzi, G., de Souza, P.G., Carciofi, B.A.M., & Laurindo, J.B. (2019). Fortified apple (*Malus spp.*, var. Fuji) snacks by vacuum impregnation of calcium lactate and convective drying. *LWT-Food Science and Technology*, 133, 108298.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436.
- Bae, I.Y, An, J.S., Oh, I.K, & Lee, H.G. (2017). Optimized preparation of anthocyanin-rich extract from black rice and its effects on in vitro digestibility. *Food Science and Biotechnology*, 26 (5), 1415-1422.
- Baeza, R., Sánchez, V., Salierno, G., Molinari, F., López, P., & Chirife, J. (2020). Storage stability of anthocyanins in freeze-dried elderberry Pulp using low proportions of encapsulating agents. *Food Science and Technology International*, 27 (2), 135-144.
- Bakowska-Barczak, A.M., & Kolodziejczyk, P.P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34 (2), 1301-1309.
- Barcelo, R., Basilio, A., Dell Calsiyao, I., Mabesa, C.B., Palconete, R.M., & Tobias, J.A. (2015). Antioxidant property and total polyphenol and flavonoid contenido f selected fruits and fruit wines. *Philippine e-Journal for Applied Research and Development*, 5, 57-64.
- Barrett, A. H., Rosenberg, S., & Ross, E. W. (1994). Fracture intensity distributions during compression of puffed corn meal extrudates: Method for quantifying fracturability. *Journal of Food Science*, 59 (3), 617-620.
- Basu, A., Rhone, M., & Lyons, T. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*, 68 (3), 468-177.
- Bejarano, I., Quispe, S., & Matos, A. (2011). Licuefacción enzimática en el proceso de extracción de pulpa de fruta. I Congreso Nacional de Investigación – IASD, Universidad Peruana Unión – Lima, pp 1-7.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Padua Oliveira, E., Silveira Villar, L. & Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
- Bora, P., Regaee, S., & Abdel-Aal, E.M. (2019). Effect of incorporation of goji berry by-product on biochemical, physical and sensory properties of selected bakery products. *LWT- Food Science and Technology*, 112, 108225.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines: a critical review. *American journal of viticulture and enology*, 52 (2), 67-87.
- Brouillard, R. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. Anthocyanins As Food Colors. Academic Press, Inc. London, UK.
- Brouillard, R., & Dangle, O. (1994). Anthocyanins molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*, 51 (4), 365-371.
- Brunauer, S.; Demming, L.; Demming, W.; Teller, E. (1940). On a theory of the Van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62, 1723-1732.
- Bruzzone, I. (2007). Frutas finas, berries. *Revista Alimentos Argentinos*, 39, 30-33. https://issuu.com/alimentosargentinos.gob.ar/docs/revista_aa_39
- Bueno, J.M., Sáez-Plaza, P., Ramos-Escudero, F., Jiménez, A.M., Fett, R., & Asuero, A. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42 (2), 126-151.
- Bunea, A., Rugină, D.O., Pinte, A.M., Sconța Z., Bunea, C.I., & Socaci C. (2011). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 39 (2), 70-76.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. & Steinhart, H. (2000). Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 3166-3169.
- Busso Casati, C., Baeza, R., & Sanchez, 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*, 9 (3), 431-47.
- Caminiti, A. (2005). Berries, una alternativa para la región. Ed. INTA. Fruticultura & Diversificación, 46: 22-29. ISSN 1669-7057.
- Campostrini, F., Archaina, D., Carraza, A., Genevois, C., Larrosa, V., Muchiutti, G., Rivero, R., & Sosa, N. (2018). Optimización del uso de arándanos, nueces, amaranto y miel en la elaboración de un bocadito con compuestos bioactivos. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Mendoza, Argentina.
- Cantero, J.J., Núñez, C.O., Bernardello, G., Amuchastegui, A., Mulko J., y col. (2019). Las plantas de importancia económica en Argentina. 1ª ed. Río Cuarto: UniRío Editora.

- Casi-Sokolińska, D., & Walkowiak-Tomczak, D. (2021). Consumer-perception, nutritional, and functional studies of a yogurt with restructured elderberry juice. *Journal of Dairy Science*, 104 (2), 1318-1335.
- Castagnini, J.M., Betoret, N., Betoret, E., & Fito, P. (2015). Vacuum impregnation and air drying temperature effect on individual anthocyanins and antiradical capacity of blueberry juice included into an apple matrix. *LWT - Food Science and Technology*, 64 (2), 1289-1296.
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A., & Abert-Vian, M. (2017). Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, 357-377.
- Chiralt, A., Fito, P., Andrés, A., Barat, J.M., Martínez-Monzó, J., & Martínez-Navarrete, N. (1999). Vacuum impregnation: A tool in minimally processing of foods. En F.A.R. Oliveira y J.C. Oliveira (Eds.). *Processing of foods: Quality optimization and process assessment*, 341-356. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Clark, C.J., Cooney, J.M., Hopkins, W.A., & Currie, A. (2018). Global mid-infrared prediction models facilitate simultaneous analysis of juice composition from berries of *Actinidia*, *Ribes*, *Rubus* and *Vaccinium* species. *Food Analytical Methods*, 11, 3147-3160.
- Closa, S.J. (2007). *Energía y macronutrientes en la nutrición del siglo XXI*. M.L. Portela (Ed). Buenos Aires, Argentina: La Prensa Médica Argentina.
- Comunian, T.A., Silva, M.P., & Souza, C.J.F. (2021). The use of food by-products as a novel for functional foods: Their use as ingredients and for encapsulation process. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 269-280.
- Contreras, C., Martin, M.E., Martinez-Navarrete, N., & Chiralt, A. (2005). Effect of vacuum impregnation and microwave application on structural changes which occurred during air-drying of apple. *LWT- Food Science and Technology*, 38, 471-477.
- Contreras-Lopez, E., Castañeda-Ovando, A., González-Olivares, L.G., Añorve-Morga, J., & Jaimez-Ordaz, J. (2014). Effect of Light on Stability of Anthocyanins in Ethanolic Extracts of *Rubus fruticosus*. *Food and Nutrition Sciences*, 5 (06), 488-494.
- Dal Magro, L., Goetze, D., Ribeiro, C., Paludo, N., Rodrigues, E., Hertz, P., Klein, M., & Rodrigues, R. (2016). Identification of bioactive compounds from *Vitis labrusca* L. variety Concord grape juice treated with commercial enzymes: Improved yield and quality parameters. *Food Bioprocess Technology*, 9, 365-377.
- David, L., Modovan, B., Vulcu, A., Olenic, L., Perde-Schrepler, M., Fischer-Fodor, E., Florea, A., Crisan, M., Chiorean, I., Clichici, S., & Filip, G.A. (2014). Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European blackelderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 767-777.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Baraniak, B. (2006). The Antioxidant Properties of Alcoholic Extracts from *Sambucus Nigra* L. (Antioxidant Properties of Extracts). *LWT- Food Science and Technology*, 39, 308-315.

- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., & Paredes-López, D. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains—Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3), 173-289.
- del Moral, S., Ramírez-Coutiño, L.P., & García-Gómez, M.J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2 (3), 87-102.
- Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva, I., & Kratchanova, M. (2010). Solid-phase Extraction of Berries' Anthocyanins and Evaluation of Their Antioxidative Properties. *Food Chemistry*, 123, 1055-1061.
- Deng, Y., & Zhao, Y. (2008). Effect of pulsed vacuum and ultrasound osmopretreatments on glass transition temperature, texture, microstructure and calcium penetration of dried apples (Fuji). *LWT- Food Science and Technology*, 41, 1575-1585.
- De Paepe, D., Valkenburg, D., Coudijzer, K., Noten, B., Servaes, K., De Loose, M., Voorspoels, S., Diels, L., & Van Droogenbroeck, B. (2014). Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. *Food Chemistry*, 162, 176-185.
- Deprez, S., Mila, S., Huneau, J.F., Tome, D., & Scalbert, A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Forum Original Research Communication. Antioxidant & Redox Signal*, 3 (6), 957-967.
- De Santana, R.F., de Oliveira Neto, E.R., Santos, A.V., Soares, C.M.F., Lima, A.S., & Cardoso, J.C. (2014). Water sorption isotherm and glass transition temperature of freeze-dried *Syzygiumcumini* fruit (jambolan). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120, 519-524.
- Ding, X., Hu, X., Chen, Y., Xie, J., Ying, M., Wang, Y. & Yu, Q. (2021). Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 107, 455-465.
- Domínguez, R., Zhang, L., Rocchetti, G., Lucini, L., Pateiro, M., Munekata, P.E.S., & Lorenzo, J.M. (2020). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food Chemistry*, 33, 127266.
- Duymus, H.G., Göger, F., & Hüsni Can Başer, K. (2014). *In vitro* antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chemistry*, 155, 112-119.
- Dzah, C.S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbij, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19, 14879-14901.

- Esquivel-González, B.E., Ochoa Martínez, L.A., & Rutiaga-Quiñones, O.M. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16 (2), 180-192.
- Estupiñan-Amaya, M., Fuenmayor, C.A., & López-Córdoba, A. (2020). New freeze-dried Andean blueberry juice powders for potential applications as functional food ingredients: effect of maltodextrin on bioactive and morphological features. *Molecules*, 25, 5635.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 510-523.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.
- FAO. (2020). Frutas y verduras – esenciales en tu dieta. Año Internacional de las Frutas y Verduras, 2021. Documento de antecedentes. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb2395es>
- FAO UTF ARG 017. (2015). Proyecto: Desarrollo Institucional para la Inversión – Informe de Diagnóstico de los Principales valles y áreas con potencial agrícola de la provincia de Río Negro – DT N°6 Horticultura y otros Cultivos. ONU.
- Fennema, O. (2001). Química de los Alimentos. Segunda edición. Acribia Ed., Zaragoza, España.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54-66.
- Ferreira, S., Silva, A., & Nunes, F. (2020). *Sambucus nigra* L. fruits and flowers: Chemical composition and related bioactives. *Food Reviews International*, <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1788578>
- Fito, P., Andrés, A., Chiralt, A., & Pardo, P. (1996). Coupling of Hydrodynamic Mechanism and Deformation-Relaxation Phenomena during Vacuum Treatments in Solid Porous Food-Liquid Systems. *Journal of Food Engineering*, 27, 229-240.
- Fito, P., & Chiralt, A. (2000). Vacuum Impregnation of Plant Tissues. En: Alzamora, S.M., Tapia, M.S., López Malo, A. (eds). Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental Aspects and Applications. Aspen Publishers, Inc., Maryland, 153-171.
- Fito, P., Chiralt, A., Barat, J.M., & Martínez-Monzó, J. (2000). Vacuum impregnation in fruit processing. En J. E. Lozano, G. Barbosa-Cánovas, E. Parada Arias y M. C. Asimnón (eds.), Trends in food engineering, 149-164. Maryland: Aspen Publishers.
- Fito, P., Chiralt, A., Betoret, N., Gras, M., Cháfer, M., Martínez-Monzó, J., Andrés, A., & Vidal, D. (2001). Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering. Application in functional fresh food development. *Journal of Food Engineering*, 49, 175-183.
- Font Quer, P. (2016). Caprifoliáceas: 537-Sauco (*Sambucus nigra* L.), pp. 752-755. Editorial Península, Barcelona.

- Franceschinis, L.E. (2016). Propiedades fisicoquímicas y funcionales de productos deshidratados en base a cerezas y zarzamoras de la Patagonia argentina. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6120_Franceschinis
- Franceschinis, L., Salvatori, D.M., Sosa, N., & Schebor, C. (2014). Physical and functional properties of blackberry freeze- and spray-dried powders. *Drying Technology*, 32, 197-207.
- Franceschinis, L., Sette, P., Schebor, C., & Slavatori, D. (2015). Color and bioactive compounds characteristics on dehydrated sweet cherry products. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1716-1729.
- Fredes, C. (2009). Antioxidantes en berries nativos chilenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (6), 469-478.
- Fredes, C., Osorio, M.J., Parada, J., & Robert, P. (2018). Stability and bioaccessibility of anthocyanins from maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) juice microparticles. *LWT-Food Science and Technology*, 91, 549-556.
- Fredes, C., Yousef, G.G., Robert, P., Grace, M.H., Lila, M.A., Gómez, M., Gebauer, M., & Montenegro, G. (2014). Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (13), 2639-2648.
- Frøkiær, H., Henningsen, L., Metzdrorff, S.B., Weiss, G., Roller, M., Flanagan, J., Fromentin, E., & Ibarra, A. (2012). Astragalus Root and Elderberry Fruit Extracts Enhance the IFN- β Stimulatory Effects of Lactobacillus Acidophilus in Murine-derived Dendritic Cells. *PLoS One*, 7, e47878.
- Gadjalova, A.V., & Mihaylova, D.S. (2019). Ultrasound-assisted extraction of medicinal plants and evaluation of their biological activity. *Food Research*, 3 (5), 530-536.
- Gagneten, M. (2020). Aprovechamiento integral de la grosella negra como fuente de compuestos bioactivos para el desarrollo de productos deshidratados. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. <https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/>
- Gagneten, M., Archaina, D., Salas, M.P., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2021). Gluten-free cookies added with fibre and bioactive compounds from blackcurrant residue. *International Journal of Food Science and Technology*, 56, 1734-1740.
- Gagneten, M., Corfield, R., Gomez Mattson, M., Sozzi, A., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2019). Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. *Powder Technology*, 342, 1008-1015.
- Galvan d'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2013). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42-47.
- Gámbaro, A. (2018). Projective techniques to study consumer perception of food. *Current Opinion in Food Science*, 21, 46-50.

- Gámbaro, A., & Ellis, A.C. (2012). Exploring consumer perception about the different types of chocolate. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15 (4), 317-324.
- García Ramírez, B. (2005). Absorción *in vivo* de oligómeros de epicatequina. Tesis doctoral, Universitat Rovira i Virgil. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/322>.
- Garrido-Makinistian, F. (2020). Obtención de polvos frutales a partir de maqui (*Aristotelia chilensis*) con alto poder antioxidante mediante secado por atomización: optimización del proceso de secado, atributos de calidad y aplicaciones. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/5455>
- Garrido-Makinistian, F., Gallo, L., Sette, P., Salvatori D., & Bucalá, V. (2019a). Nutraceutical tablets from maqui berry (*Aristotelia chilensis*) spray-dried powders with high antioxidant levels. *Drying Technology*, 38 (9), 1231-1242.
- Garrido-Makinistian, F., Sette, P., Gallo, L., Bucalá, V., & Salvatori, D. (2019b). Optimized aqueous extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) suitable for powder production. *Journal of Food Science and Technology*, 56 (7), 3553-3560.
- Giovanelli, G., Brambilla, A., Rizzolo, A., & Sinelli N. (2012). Effects of blanching pre-treatment and sugar composition of the osmotic solution on physico-chemical, morphological and antioxidant characteristics of osmodehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Research International*, 49, 263-271.
- Giusti, M.M., & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13.
- Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crișan, G., & Ferreira, I.C.F.R. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 302-315.
- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013). Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1316-1323.
- Gomez Mattson, M.L., 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, 51-68.
- Gomez Mattson, M.L., Gagneten, M., Corfield, R., Sozzi, A., Salvatori, D., & Schebor, C. (2016). Aplicación de extracciones sucesivas para la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos de distintas berries de la Patagonia Argentina. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, Argentina. Libro de Actas, pg. 310. ISBN 978-987-45380-0-0
- Gomez Mattson, M., Sozzi, A., Corfield, R., Gagneten, M., Franceschinis, L., Schebor, C., & Salvatori, D. (2021). Colorant and antioxidant properties of freeze-dried extracts from wild berries: use of ultrasound-assisted

- extraction method and drivers of liking of colored yogurts. *Journal of Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05096-3>.
- González, F., García-Martínez, E., Camacho, M.M., & Martínez-Navarrete, N. (2019). Stability of the physical properties, bioactive compounds and antioxidant capacity of spray-dried grapefruit powder. *Food Bioscience*, 28, 74-82.
- González-Fésler, M., Salvatori, D., Gómez, P., & Alzamora, S.M. (2008). Convective air drying of apples as affected by blanching and calcium impregnation. *Journal of Food Engineering*, 87, 323-332.
- Grajales Atehortúa, B.M., Botero Galvis, M.M., & Ramírez Quirama, J.F. (2015). Características, manejo, usos y beneficios del sauco (*Sambucus nigra* L.) con énfasis en su implementación en sistemas silvopastoriles del Trópico Alto. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6 (1), 155-168.
- Granato, D., Karnopp, A.R., & Van Ruth, M.S. (2015). Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1997-2006.
- Gras, M., Vidal-Brotons, D., Betoret, N., Chiralt, A., & Fito, P. (2002). The response of some vegetables to vacuum impregnation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 263-269.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 81A (1), 90-96.
- Gueli, A.M., Bonfiglio, G., Pasquale, S., & Troja, S.O. (2016). Effect of particle size on pigments colour. *Color research and application*, 42 (2), 236-243.
- Guerra-Valle, M.E., Moreno, J., Lillo-Pérez, S., Petzold, G., Simpson, R., & Nuñez, H. (2018). Enrichment of apple slices with bioactive compounds from pomegranate cryoconcentrated juice as an osmodehydration agent. *Journal of Food Quality*, article ID 7241981.
- Guerrero, J., Ciampi, L., Castilla, C.A., Medel, S.F., Schalchli, S.H., Hormazabal, U.E., Bensch, T.E., & Alberdi, L.M. (2010). Antioxidant capacity, anthocyanins and total phenols of wild and cultivated berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(s), 537-544.
- Guerrero, L., Claret, A., Verbeke, W., Enderli, G., Zakowska-Biemans, S., Vanhonacker, F., Issanchou, S., Sajdakowska, M., Granli, B.S., Scalvedi, L., Contel, M., & Hersleth, M. (2010). Perception of traditional food products in six European regions using free word association. *Food Quality and Preference*, 21, 225-233.
- Haas, K., Obernberger, J., Zehetner, E., Kiesslich, A., Volkert, M., & Jaeger, H. (2019). Impact of powder particle structure on the oxidation stability and color of encapsulated crystalline and emulsified carotenoids in carrot concentrate powders. *Journal of Food Engineering*, 263, 398-408.

- Hawkins, J., Baker, C., Cherry, L., & Dunne, E. (2019). Black Elderberry (*Sambucus nigra*) Supplementation Effectively Treats Upper Respiratory Symptoms: A Meta-analysis of Randomized, Controlled Clinical Trials. *Complementary Therapies in Medicine*, 42, 361-365.
- Henry, J.C. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 657-659.
- Howard, L.R., Prior, R.L., Liyanage, R., & Lay, J.O. (2012). Processing and storage effect on berry polyphenols: challenges and implications for bioactive properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (27), 6678-6693.
- Iftikhar, M., Iftikhar, A., Zhang, H., Gong, L., & Wang, J. (2020). Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE) in Caco-2 cells monolayer: A review. *Food Research International*, 136, 109240.
- Inada, K.O.P, Batista Leite, I., Neves Martins, A.B., Fialho, E., Tomás-Barberán, F., Perrone, D., & Monteiro, M. (2021). Jaboticaba Berry: A comprehensive review on its polyphenol composition, health effects, metabolism, and the development of food products. *Food Research International*, 147, 110518
- Indaco, M.M. (2005). Enriquecimiento de papa en calcio por impregnación a altas temperaturas. Tesis de Magíster en Tecnología de los alimentos. Universidad Tecnológica Nacional. Buenos Aires, Argentina.
- Jensen, R.S., & Nielsen, J.B. (1973). Cyanogenic glucosides in *Sambucus nigra* L. *Acta Chemica Scandinavica*, 27, 2661-2685.
- Jenshi roobha, J., Saravanakumar, M., Aravindhan, K.M., & Suganya devi, P. (2011). The effect of light, temperature, ph on stability of anthocyanin pigments in *Musa acuminata* bract. *Research in Plant Biology*, 1 (5), 5-12.
- Jiang, H., & Zhang, M. (2013). Fruit and Vegetable Powders. En *Handbook of Food Powders, Processes and Properties*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Jimenez-Garcia, S.N., Guevara-Gonzalez, R.G., Miranda-Lopez, R., Feregrino-Perez, A.A., Torres-Pacheco, I., & Vazquez-Cruz, M.A. (2013). Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International*, 54, 1195-1207.
- Kaack, K., Fretté, X.C., Christensen, L.P., Landbo, A.K., & Meyer, A.S. (2008). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*, 226, 843-855.
- Kahraman, O., Malvandi, A., Vargas, L., & Feng, H. (2021). Drying characteristics and quality attributes of apple slices dried by a non-thermal ultrasonic contact drying method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105510.
- Kalinowska, M., Bielawska, A., LEwandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 169-188.

- Kaltsa, O., Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Bozinou, E., Lalas, S., & Makris, D.P. (2020). A green extraction process for polyphenols from elderberry (*Sambucus nigra*) flowers using deep eutectic solvent and ultrasound-assisted pretreatment. *Molecules*, 25 (4), 921.
- Kebe, M., Renard, C.M., El Maâtaoui, M., Amani, G.N., Maingonnat, J. (2015). Leaching of polyphenols from apple parenchyma tissue as influenced by thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, 166, 237-246.
- Keraité, G., Sivakova, B., & Kiuberis, J. (2017). Investigation of the impact of organic and inorganic halides on the ageing stability of paper with iron gall ink. *Chemija*, 28 (3), 137–147.
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T., & Rupasinghe, V. (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 369-401.
- Knudsen, B.F., & Kaack, K.V. (2015). A review of human health and disease claims for elderberry (*Sambucus nigra*) fruit. *Acta Horticulturae*, 1061, 121-131.
- Koroishi, E.T. (2005). Estudio del proceso de liofilización: Aplicación para jugo de naranja. Tesis de maestría, Facultad de Ingeniería Química. Universidad Estatal de Campinas.
- Kowalska, H., Marzec, A., Kowalska, J., Ciurzyńska, A., Czajkowska, K., Cichowska, J., y col. (2017). Osmotic dehydration of Honeoye strawberries in solutions enriched with natural bioactive molecules. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 500-505.
- Kowalska, G., Wyrostek, J., Kowalski, R., & Pankiewicz, U. (2021). Evaluation of glycerol usage for the extraction of anthocyanins from black chokeberry and elderberry fruits. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 22, 100296.
- Krawitz, C., Mraheil, M.A., Stein, M., Imirzalioglu, C., Domann, E., Pleschka, S., & Hain, T. (2011). Inhibitory Activity of A Standardized Elderberry Liquid Extract against Clinically-relevant Human Respiratory Bacterial Pathogens and Influenza A and B Viruses. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 16-17.
- Kschonsek, J., Wofram, T., Stöckl, A., & Böhm, V. (2018). Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the *in vitro* antioxidant capacity. *Antioxidants*, 7 (20), 1-14.
- Kwok, B.H.I., Durance, T., & Kitts, D.D. (2004). Dehydration techniques affect phytochemical contents and free radical scavenging activities of Saskatoon berries (*Amerlachie alnifolia* Nutt). *Journal of Food Science*, 69, SNQ122-SNQ126.
- Laaksonen, O., Sandell, M., Nordlund, E., Heiniö, R., Malinen, H., Jaakkola, M., & Kallio H. (2012). The effect of enzymatic treatment on blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice flavour and its stability. *Food Chemistry*, 130, 31-41.

- Landbo, A., & Meyer, A. (2004). Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 503-513.
- Lawless, H.T., & Heymann, H. (2010). Sensory evaluation of food: Principles and practices (2a ed.). New York: Springer.
- Lee, J., & Finn, C.E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2665-2675.
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X.D. (2020). Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 114-126.
- Luís, A., Duarte, A.P., Pereira, L., & Domingues, F. (2018). Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties. *European Food Research and Technology*, 244, 175-185.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). Fruit phenolics. 1st edn. Boca Raton: CRC Press.
- Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., Moreno-Jiménez, M.R., Medina-Torres, L., & González-Laredo, R.F. (2020). Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19 (2), 491-521.
- Maidana, S.B. (2017). Desarrollo de nuevos productos deshidratados a partir de peras (var. Packham's Triumph) de la Norpatagonia argentina. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66549>
- Maidana, S.B., Vullioud, M., Díaz, A., & Salvatori, D.M. (2015). "Capacidad de rehidratación de peras (*Pyrus communis* var. Packham's Triumph) deshidratadas". XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CYTAL, Buenos Aires, Argentina. Del 3 al 5 de Noviembre.
- Marques, G., & Freire, J.T. (2005). Analysis of freeze-drying of tropical fruits. *Drying Technology: An International Journal*, 23 (9-11), 2169-2184.
- Masters, K. (1991). Spray drying handbook (5a ed.). New York: Longman.
- Masters, K. (2004). Applying spray drying to customize powder manufacture. *Chemical Engineering Journal*, 12 (6), 744-749.
- Mazza, G., & Broiullard, R. (1990). The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solution. *Phytochemistry*, 29, 1097-1102.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc.
- Melzner, G. (2003). Diagnóstico productivo Sector Fruta Fina Comarca Andina Paralelo 42°. Fundación para el Desarrollo Humano Sustentable de la Patagonia Comarca Andina Paralelo 42°, Municipalidad de El Hoyo.

- Michalczyk, M., Macura, R., & Matuszak, I. (2009). The effect of air-drying, freeze-drying and storage on the quality and antioxidant activity of some selected berries. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 11-21.
- Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Schmitzer, V., Veberic, R., & Stampar, F. (2016). Comparison of Major Taste Compounds and Antioxidative Properties of Fruits and Flowers of Different *Sambucus* Species and Interspecific Hybrids. *Food Chemistry*, 200, 134-140.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-1124.
- Miranda, M., & Aguilera, J. (2006). Structure and Texture Properties of Fried Potato Products. *Food Reviews International*, 22 (2), 173-201.
- Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., & Lysiak, G.P. (2018). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of Functional Foods*, 40, 377-90.
- Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., Staniek, H., Kidoń, M., & Łysiak, G.P. (2020). The Content of Selected Minerals, Bioactive Compounds, and the Antioxidant Properties of the Flowers and Fruit of Selected Cultivars and Wildly Growing Plants of *Sambucus Nigra* L. *Molecules*, 25, 876.
- Mondragón Cortés, P.M. (2020). Principios y aplicaciones de la espectroscopía de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas. Zapopan, México: CIATEJ.
- Moreira, R.G., & Almohaimeed, S. (2018). Technology for processing of potato chips impregnated with red rootbeet phenolic compounds. *Journal of Food Engineering*, 228, 57-68.
- Mota, A.H., Andrade, J.M., Ntungwe, E., Pereira, P., Cebola, M.J., Bernardo-Gil, M.G., Molpeceres, J., Rijo, P., Viana, S., Ascensão, L., & Pinto Reis, C. (2020a). Green Extraction of *Sambucus nigra* L. for potential Application in Skin Nanocarriers. *Green Materials*, 8 (4), 181-193.
- Mota, A.H., Andrade, J.M., Rodrigues, M.J., Custódio, L., Bronze, M.R., Durate, N., Baby, A., Rocha, J., Gaspar, M.M., Simões, S., Carvalheiro, M., Fattal, E., Almeida, A.J., & Pinto Reis, C. (2020b). Synchronous insight of *in vitro* and *in vivo* bioalogical activities of *Sambucus nigra* L. extracts for industrial uses. *Industrial Crops & Products*, 154, 112709.
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3, 793-829.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., & Matoba, T. (2004). Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of Food Science*, 69 (1), 7-10.
- Murugesan, R., & Orsat, V. (2011). Spray drying of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) juice to maintain its phenolic content. *Drying Technology*, 29, 1729–1740.
- Muzaffar, K., Dinkarrao, B.V., & Kumar, P. (2016). Optimization of spray drying conditions for production of quality pomegranate juice powder. *Cogent Food & Agriculture*, 2 (1), 1127583.

- Nandiyanto, A.B.D., & Okuyama, K. (2011). Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology*, 22 (1), 1-19.
- Neves, D., Valentão, P., Bernardo, J., Oliveira, M.C., Ferreira, J., Pereira, D.M., y col. (2019). A new insight on elderberry anthocyanins bioactivity: Modulation of mitochondrial redox chain functionality and cell redox state. *Journal of Functional Foods*, 56, 145-155.
- Nieto, A., Castro, M.A., & Alzamora, S.M. (2001). Kinetics of moisture transfer during air drying of blanched and/or osmotically dehydrated mango. *Journal of Food Engineering*, 50, 175-185.
- Nile, S.H., & Park S.W. (2014). Edible berries: Review on bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30 (2), 134-144.
- Oberoi, D.P.S., & Sogi, D.S. (2015). Effect of drying methods and maltodextrin concentration on pigment content of watermelon juice powder. *Journal of Food Engineering*, 165, 172-178.
- Ochoa, J., Moncunill, E., Puntieri, J., Güenueleo, B., Stefe, S., Cardozo, M., Neranzi Barriga, F., Torrego, S., & Naon, S. (2019). Saberes locales y frutos comestibles de plantas nativas en la comarca andina del paralelo 42° (Patagonia, Argentina). *Ethnoscintia, Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology*, 4. doi: 10.22276/ethnoscintia.v4i1.247
- Olejnik, A., Olkowicz, M., Kowalska, K., Rychlik, J., Dembczyński, R., Myszk, K. y col. (2016). Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects in vitro cultured human colon cells against oxidative stress. *Food Chemistry*, 197, 648-657.
- Oniszcuk, A., Olech, M., Oniszcuk, T., Wojtunik-Kulesza, K., & Wójtowicz, A. (2019). Extraction Methods, LC-ESI-MS/MS Analysis of Phenolic Compounds and Antiradical Properties of Functional Food Enriched with Elderberry Flowers or Fruits. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 4719-4730.
- Onwulata, C.I., Smith, P.W., Konstance, R.P., & Holsinger, V.H. (2001). Incorporation of whey products in extruded corn, potato or rice snacks. *Food Research International*, 34 (8), 679-687.
- Ortiz, C., Salvatori, D., & Alzamora, S.M. (2003). Fortification of mushroom with calcium by vacuum impregnation. *Latin American Applied Research*, 33, 281-287.
- Panja, P. (2017). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 17, 173-182.
- Pap, N., Fidelis, M., Azevedo, L., Vieira do Carmo, M.A., Wang, D., Mocan, A., Rodrigues Pereira, Xavier-Santos, D., Sant'Ana, A., Yang, B., & Granato, D. (2021). Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. *Current Opinion in Food Science*, 42, 167-186.
- Parzanese, M. (2011). Tecnologías para la Industria Alimentaria: Liofilización de alimentos. Ficha 3. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnología/Ficha_03_Liofilizados.pdf.

- Paulino, C., Milanessi, I., Namor, F., De Michelis, A., & Ochoa M. (2019). Aplicación de frutas finas de la Patagonia en el desarrollo de alimentos funcionales. Desarrollos tecnológicos en el marco del Programa Nacional de Agroindustria y Agregado de Valor. Proyecto: Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.
- Pavez-Guajardo, C., Ferreira, S., Mazzutti, S., Guerra-Valle, M.E., Sáez-Trautmann, G., y Moreno, J. (2020). Influence of *in vitro* digestion on antioxidant activity of enriched apple snacks with grape juice. *Foods*, 9 (11), 1681.
- Peleg, M. (1999). Phase transitions and the mechanical properties of food biopolymers. In P. Colonna & S. Guilbert (Eds.), *Biopolymer science: Food and non food applications*. (pp. 271–282). Paris: INRA Editions.
- Perez-Moral, N., Saha, S., Philo, M., Hart, D.J., Winterbone, M.S., Hollands, W.J., Spurr, M., Bows, J., van der Velpen, V., Kroon, P.A., & Curtis, P.J. (2018). Comparative bio-accessibility, bioavailability and bioequivalence of quercetin, apigenin, glucoraphanin, and carotenoids from freeze-dried vegetables incorporated into baked snack versus minimally processes vegetables: Evidence from *in vitro* models and human bioavailability study. *Journal of Functional Foods*, 48, 410-419.
- Perkins-Veazie, P., Thomas, A.L., Byers, P.L., & Finn, C.E. (2015). Fruit composition of elderberry (*Sambucus spp.*) genotypes grown in Oregon and Missouri, USA. *Acta Horticulturae*, 1061, 219-24.
- Petkovska, A., Gjamovski, V., Stanoeva, J.P, & Stefova, M. (2017). Characterization of the polyphenolic profiles of peel, flesh and leaves of *Malus domestica* cultivars using UHPLC-DAD-HESI-MSⁿ. *Natural Product Communications*, 12 (1), 35-42.
- Phan, M., Paterson, J., Bucknall, M. & Arcot, J. (2017). Interactions between phytochemicals from fruits and vegetables: Effects on bioactivities and bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (8), 1310-1329.
- Piqueras-Fizman, B., Velasco, C., Salgado-Montejo, A., & Spence, C. (2013). Using combined eye tracking and word association in order to assess novel packaging solutions: A case study involving jam jars. *Food Quality and Preference*, 28, 328-338.
- Pirone, B., De Michelis, A., & Salvatori, D. (2014). Pretreatments effect in drying behaviour and colour of mature and immature 'Napolitana' sweet cherries. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1640-1655.
- Poiana, M.A., Moigradean, D., Raba, D., Alda, L.M., & Popa, M. (2010). The effect of long-term frozen storage on the nutraceutical compounds, antioxidant properties and color indices of different kinds of berries. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8 (1), 54-58.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C.J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30 (1), 37-44.
- Ramírez, M.J., Giraldo, G.I., & Orrego, C.E. (2015). Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates. *Powder Technology*, 277, 89-96.

- Ramírez Navas, J.S. (2006). Liofilización de alimentos. Colombia, ReCiTeIA. <http://revistareciteia.es.tl/>
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 49, 311-319.
- Ratti C. (2013). Freeze drying for food powder production. En *Handbook of Food Powders*, chp. 3, pp. 57-84. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9/10), 1231-1237.
- Reber, J., Eggett, D., & Parker, T. (2011). Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62 (5), 445-452.
- 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.
- Rodrigues, S. , Sousa de Brito, E., & Silva, E.O. (2018). Elderberry – *Sambucus nigra* L. En Exotic Fruits Reference Guide, pp 181-185. Academic Press, Elsevier.
- Rodríguez, K., Ah-Hen, K.S., Vega-Gálvez, A., Vásquez, V., Quispe-Fuentes, I., Rojas, P., & Lemus-Mondaca, R. (2016). Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 537 – 542.
- Rodriguez-Saona, L.E., & Allendorf, M.E. (2011). Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 467-483.
- Rohr, G.E. (1999). Analytical Investigation on and isolation of procyanidins from Crataegus leaves and flowers. Tesis doctoral, Swiss Federal Institute of Technology Zurich. <https://doi.org/10.3929/ethz-a-002045003>
- Roos, Y.H. (2010). Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annual Reviews in Food Science and Technology*, 1, 469-496.
- Rosas Mendoza, M.E., & Fernández Muñoz, J.L. (2012). FTIR aplicada durante la deshidratación osmótica de mango Ataulfo (*Mangifera indica* L.). *Superficies y Vacío*, 25 (1), 8-13.
- Roudaut, G., Dacremont, C., Vallès Pàmies, B., Colas, B., & Le Meste, M. (2002). Crispness: A critical review on sensory and material science approaches. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (6–7), 217–227.
- Salvatori, D., Doctorovich, R., & Alzamora, S.M. (2011). Impact of calcium on viscoelastic properties of fortified apple tissue. *Journal of Food Process Engineering*, 34, 1639-1660.
- Salvatori, D., González-Fesler, M., Weisstaub, A., Portela, M.L., & Alzamora, S.M. (2007). Uptake kinetics and absorption of calcium in apple matrices. *Food Science and Technology International*, 13 (5), 333-340.

- Sambroska, K., Eliasson, L., Marzec, A., Kowalska, K., Piotrowski, D., Lenart, A. y col. (2019). The effect of adding berry fruit juice concentrates and by-product extract to sugar solution on osmotic dehydration and sensory properties of apples. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 1927-1938.
- Sánchez, V., Baeza, R., & Chirife, J. (2015). Comparison of monomeric anthocyanins and colour stability of fresh, concentrate and freeze-dried encapsulated cherry juice stored at 38°C. *Journal of Berry Research*, 5 (4), 243-251.
- Santos, D., Colette Maurício, A., Sencadas, V., Santos, J.D., Fernandes, M.H., & Gomes, P.S. (2018). Spray Drying: An Overview. Chp. 2, en *Biomaterials – Physics and Chemistry*. Pignatello R., Musumeci, T., eds. IntechOpen.
- Santos-Buelga, C. (2001). Sustancias polifenólicas y el color del vino tinto. En Ed. A. Mas. *Facultat d'Enologia avui*. Tarragona.
- Santos-Buelga, C., García-Viguera, C., & Tomás-Barberán, F. (2003). On-Line identification of flavonoids by HPLC coupled to Diode Array Detection. En Gary Williamson, editor. *Methods in Polyphenol Analysis*, chp. 5. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Sari, P., Wijaya, C.H., Sajuthi, D., & Supratman, U. (2012). Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*, 132 (4), 1908-1914.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101,492-501.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 45 (4), 287-306.
- Scheffeldt, P., & Hrazdina, G. (1978). Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *Journal of Food Science*, 43, 517-520.
- Schmitzer, V., Veberic, R., Slatnar, A., & Stampar, F. (2010). Elderberry (*Sambucus Nigra* L.) Wine: A Product Rich in Health Promoting Compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 10143-10146.
- Seeram, N. (2008). Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 627-629.
- Senica, M., Stampar, F., Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2016). Processed elderberry (*Sambucus nigra* L.) products: A beneficial or harmful food alternative? *LWT - Food Science and Technology*, 72, 182-188.
- Sette, P. (2015). Tecnologías combinadas para el desarrollo de productos de frambuesa deshidratados. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar/>

- Sette, P., Garrido-Makinistian, F., Maturano, C., & Salvatori, D. (2021). Particulate systems from maqui (*Aristotelia chilensis*) wastes to be used as nutraceuticals or high value-added ingredients. *Drying Technology*, DOI: 10.1080/07373937.2021.1953521.
- Sette, P., Fernandez, A., Soria, J., Robriguez, R., Salvatori, D., & Mazza, G. (2020). Integral valorization of fruit waste wine and cider industries. *Journal of Cleaner Production*, 242, 118486.
- Sette, P.A., Franceschinis, L.E., Schebor, C., & Salvatori, D. (2015). Osmotic Dehydrated Raspberries: Changes in Physical Aspects and Bioactive Compounds. *Drying Technology*, 33 (6), 659–670.
- Sette, P., Franceschinis, L., Schebor, C., & Salvatori, D. (2017). Fruit snacks from raspberries: influence of drying parameters on colour degradation and bioactive potential. *Internatioanl Journal of Food Science and Technology*, 52, 313-328.
- Sham, P.W.Y., Scaman, C.H., & Durance, T.D. (2001). Texture of vacuum microwave dehydrated apple chips as affected by calcium pretreatment, vacuum level, and apple variety. *Journal of Food Science*, 66 (9), 1341-1347.
- Shima, M., Tanaka, M., Kimura, Y., Adachi, S., & Matsuno, R. (2005). Enhancement in transport of a hydrophilic marker through intestinal epithelial cell (Caco-2) monolayer by W/O/W multiple emulsion containing C8TG. *Food Hydrocolloids*, 19 (2), 321-328.
- Shishir, M.R.I., & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science and Technology*, 65, 49-67.
- Sidor, A., & Gramza-Michałowska, A. (2015). Advanced Research on the Antioxidant and Health Benefit of Elderberry (*Sambucus nigra*) in Food – A Review. *Journal of Functional Foods*, 18, 941-958.
- Singleton, V. & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., & Durst, R.W. (2000). Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65(2), 357-364.
- Skupień, K. (2006). Evaluation of chemical composition of fresh and frozen blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Scientiarum polonorum, Hortorum Cultus*, 5 (1), 19-25.
- Soares, E.K.B., Esmerino, E.A., Ferreira, M.V., da Silva, M.A., Freitas, M.Q., & Cruz, A.G. (2017). What are the cultural effects on consumers' perceptions? A case study covering *coalho* cheese in the Brazilian northeast and southeast area using word association. *Food Research International*, 102, 553-558.
- Soria, E.A., Goleniowski, M.E., Cantero, J.J., & Bongiovanni, G.A. (2008). Antioxidant activity of different extracts of Argentinian medicinal plants against arseni-induced toxicity in renal cells. *Human & Experimental Toxicology*, 27, 341-346.

- Sosa, N., Salvatori, D., & Schebor, C. (2012). Physico-Chemical and Mechanical Properties of Apple Disks Subjected to Osmotic Dehydration and Different Drying Methods. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1790-1802.
- Sozzi, A., Zambon, M., Mazza, G., & Salvatori, D. (2021). Fluidized bed drying of blackberry wastes: Drying kinetics, particle characterization and nutritional value of the obtained granular solids. *Powder Technology*, 385, 37-49.
- Sun, J., Mei, A., Tang, Y., Ding, L., Jiang, G., Zhang, C., Sun, A., & Bai, W. (2016). Stability, antioxidant capacity and degradation kinetics of pelargonidin-3-glucoside exposed to ultrasound power at low temperature. *Molecules*, 21, 1109.
- Sun-Waterhouse, D., Jin, D., & Waterhouse, G.I.N. (2013). Effect of adding elderberry juice concentrate on the quality attributes, polyphenol contents and antioxidant activity of three fibre-enriched pastas. *Food Research International*, 54 (1), 781-789.
- Swier, T.L., Mukhim, C., Bashir, K., & Chauhan, K. (2018). Optimization of enzyme aided extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. *Food Science and Technology*, 91, 382-390.
- Szajdek, A., & Borowska, E.J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 147-156.
- Szalóki-Dorkó, L., Stéger-Máté, M., & Abrankó, L. (2016). Effects of fruit juice concentrate production on individual anthocyanin species in elderberry. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 641-648.
- Tarantilis, P.A., Troianou, V.E., Pappas, C.S., Kotseridis, Y.S., & Polissiou, M.G. (2008). Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 111, 192-196.
- Taskin, O., Izli, G., & Izli, N. (2021). Physicochemical and Morphological Properties of European Cranberrybush Powder Manufactured by Freeze Drying. *International Journal of Fruit Science*, 21 (1), 1008-1017.
- 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 (Basel.)*, 9, 451.
- Thomas-Valdés, S., Theoduloz, C., Jiménez-Aspee, F., Burgos-Edwards, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2018). Changes in polyphenol composition and bioactivity of the native Chilean white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* f. *chiloensis*) after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 105, 10-18.
- Torabian, G., Valtchev, P., Adil, Q., & Dehghani, F. (2019). Anti-influenza Activity of Elderberry (*Sambucus nigra*). *Journal of Functional Foods*, 54, 353-360.

- Toscano Martínez, H., Gagneten, M., Díaz-Calderón, P., Enrione, J., Salvatori, D., Schebor, C., & Leiva, G. (2020). Natural food colorant from blackcurrant spray-dried powder obtained by enzymatic treatment: characterization and acceptability. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, e15011.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M.A., Covas, M.I., Corella, D., y col. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 23 (10), 953-959.
- Tunick, M.H. (2011). Food Texture Analysis in the 21st Century. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1477-1480.
- Van de Velde, F., Grace, M.H., Esposito, D., Pirovani, M.E., & Lila, M.A. (2015). Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 82-91.
- Van Hecke, E., Allaf, K., & Bouvier, J. M. (1998). Texture and structure of crispy-puffed food products. Part II: Mechanical properties in puncture. *Journal of Texture Studies*, 29, 617-632.
- Vázquez-Espinosa, M., González de Peredo, A.V., Ferreira-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barbero, G.E, & Espada-Bellido, E. (2019). Assessment of ultrasound assisted extraction as an alternative method for the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from maqui berries (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Agronomy*, 9, 148.
- Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., & Schmitzer, V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114, 511-555.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Clavería, R., Quispe, I., Vergara, J., Uribe, E., Paez, H., & Di Scala, K. (2011). Effect of air temperature on drying kinetics and quality characteristics of osmo-treated jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *LWT - Food Science and Technology*, 44, 16-23.
- Vega-Gálvez, A., Rodríguez, A., & Stucken, K. (2020). Antioxidant, functional properties and health-promoting potential of native South American berries: a review. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 101, 364-378.
- 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, 1-7.
- Vidal, L., Ares, G., & Jaeger, S.R. (2018). Application of social media for consumer research. En *Methods in Consumer Research*, chp. 6, pp 125-155. Elsevier.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2010). Enhanced Extraction from Solid Foods and Biosuspensions by Pulsed Electrical Energy. *Food Engineering Reviews*, 2 (2), 95-108.

- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2017). Selective Extraction of Molecules from Biomaterials by Pulsed Electric Field Treatment. En D. Miklavčič (Ed.), *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing, pp 655-670.
- Vujanović, M., Majkić, T., Zenging, G., Beara, I., Cvetanović, A., Mahomoodally, F.M., & Radojković, M. (2019). Advantages of contemporary extraction techniques for the extraction of bioactive constituents from black elderberry (*Sambucus nigra* L.) flowers. *Industrial Crops & Products*, 136, 93-101.
- Vulic, J.J., Vračar, L.O., & Šumić, Z.M. (2008). Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. *Acta Periodica Technologica*, 39 (6), 85-90.
- Wang, W., Jung, J., Tomasino, E., & Zhao, Y. (2016). Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin composition. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 229-238.
- Wang, P., Cheng, C., Ma, Y., & Jia, M. (2020). Degradation behavior of polyphenols in model aqueous extraction system based on mechanical and sonochemical effects induced by ultrasound. *Separation and Purification Technology*, 247, 116967.
- Wang, W., Xu, S., & Jin, M. (2009). Effects of different maceration enzymes on yield, clarity and anthocyanin and other polyphenol contents in blackberry juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2342-2349.
- Westfall, A., Sigurdson, G.T., Rodriguez-Saona, L.E., & Giusti, M. (2020). Ex vivo and in vivo assessment of the penetration of topically applied anthocyanins utilizing ATR-FTIR/PLS regression models and HPLC-PDS-MS. *Antioxidants*, 9 (6), 486.
- Wilkowska, A., Ambroziak, W., Czyżowska, A., & Adamiec, J. (2016). Effect of microencapsulation by spray-drying and freeze-drying technique on the antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juice polyphenolic compounds. *Polish Journal of Food Science and Nutrition*, 66 (1), 11-16.
- Wrolstad, R., Durst, R.W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16 (9), 423-428.
- Wu, G., Fan, G., Zhou, J., Liu, X., Wu, C., & Wang, Y. (2021). Structure and main polyphenols in the haze of blackberry wine. *LWT - Food Science and Technology*, 149, 111821.
- Yang, B., & Kortessniemi, M. (2015). Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Current Opinion in Food Science*, 2, 36-42.
- Yao, G., MA, X., Cao, X., & Chen, J. (2016). Effects of power ultrasound on stability of cyanidin-3-glucoside obtained from blueberry. *Molecules*, 21, 1564.
- Yilmaz, F.M., & Bilek, S.E. (2018). Ultrasound-assisted vacuum impregnation on the fortification of fresh-cut apple with calcium and black carrot phenolics. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 48, 509-516.

- Youdim, K.A., Martin, A., & Joseph, J.A. (2000). Incorporation of the Elderberry Anthocyanins by Endothelial Cells Increases Protection against Oxidative stress11mention of Trade Name, Proprietary Product, or Specific Equipment Does Not Constitute a Guarantee by the US Department of Agriculture and Does Not Imply Its Approval to the Exclusion of Other Products that May Be Suitable. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 51-60.
- Zamora, F. (2003). El color del vino tinto. En: AMV Ediciones and Mundi-Prensa. Elaboración y crianza del vino: Aspectos científicos y prácticos. Madrid, España.
- Zeng, Z., Shen, Z.L., Zhai, S., Xu, J.L., Liang, H., Shen, Q., y col. (2017). Transport of curcumin derivatives in Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 117 (17), 123-131.
- Zheng, Y., Wang, S.Y., Wang, C.Y., & Zheng, W. (2007). Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 49-57.
- Zujko, M.E., & Witkowska, A.M. (2011). Antioxidant potential and polyphenol content of selected food. *International Journal of Food Properties*, 14 (2), 300-308.

6.2. Bibliografía generada durante el desarrollo de este trabajo

- Gomez Mattson, M.L., Gagneten, M., Corfield, R., Sozzi, A., Salvatori, D., & Schebor, C. (2016). Aplicación de extracciones sucesivas para la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos de distintas berries de la Patagonia Argentina. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Libro de Actas, pg. 310. ISBN 978-987-45380-0-0. Córdoba, Argentina, del 2 al 4 de noviembre.
- Sozzi, A., Gomez Mattson, M., Gagneten, M., Corfield, R., Garrido Makinistian, F., Leiva, G., Schebor C., & Salvatori, D. (2017). Obtención de polvos por secado por aspersión a partir de extractos de berries silvestres de la Patagonia argentina. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CYTAL. Presentación en póster, exposición oral y trabajo completo en formato CD. Mar del Plata, del 18 al 20 de septiembre.
- Corfield, R., Gagneten, M., Sozzi, A., Gomez Mattson, M., Franceschinis, L., Schebor C., & Salvatori, D. (2017). Obtención de productos liofilizados a partir de extractos de berries de la Patagonia argentina. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CYTAL. Presentación en póster, exposición oral y trabajo completo en formato CD. Mar del Plata, del 18 al 20 de septiembre.
- Gomez Mattson, M., Schebor, C., & Salvatori, D. (2018). Liofilización de extracto de sauco (*Sambucus nigra*) para la obtención de ingredientes con alto poder antioxidante. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Presentado en póster y publicado en libro de resúmenes (área: Ingeniería, pág. 688). ISBN 978-987-45380-9-3. CICYTAC, Córdoba, del 1 al 3 de octubre.

- Gomez Mattson, M., Schebor, C., & Salvatori, D. (2019). Evaluación sensorial de un snack frutal a base de sauco (*Sambucus nigra*) y manzana verde: Utilización de técnicas proyectivas de asociación con consumidores. XVII CONGRESO CYTAL® y XXI CONGRESO ALACCTA. Presentado en póster y publicado en libro de resúmenes (ISBN 978-987-22165-9-7). Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Gomez Mattson, M., Sette, P., Schebor, C., & Salvatori, D. (2019). Estabilidad de compuestos bioactivos y color durante el almacenamiento de un polvo liofilizado de sauco (*Sambucus nigra*). XVII CONGRESO CYTAL® y XXI CONGRESO ALACCTA. Presentado en póster y publicado en libro de resúmenes (ISBN 978-987-22165-9-7). Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Gagneten, M., Corfield, R., Gomez Mattson, M., Sozzi, A., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2019). Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. *Powder Technology*, 342, 1008–1015.
- Gomez Mattson, M.L., Corfield, R., Bajda, L., Pérez, O., Schebor, C., & Salvatori, D. (2020). Potential bioactive ingredient from elderberry fruit: Process optimization for a maximum phenolic recovery, physicochemical characterization, and bioaccessibility. *Journal of Berry Research*, 11, 51-68.
- Gomez Mattson, M., Sozzi, A., Corfield, R., Gagneten, M., Franceschinis, L., Schebor, C., & Salvatori, D. (2021). Colorant and antioxidant properties of freeze-dried extracts from wild berries: use of ultrasound-assisted extraction method and drivers of liking of colored yogurts. *Journal of Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05096-3>.
- Gomez Mattson, M., Sette, P., Schebor, C., & Salvatori, D. (2021). Tecnologías de impregnación para el desarrollo de snacks frutales liofilizados enriquecidos. 5to. Congreso Argentino de Ingeniería, 11vo. Congreso Argentino de Enseñanza de la Ingeniería y 3er. Congreso Latinoamericano de Ingeniería. CADI, CAEDI Y CLADI. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, del 5 al 7 de octubre (Plataforma Virtual).