



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

Utilización de residuos agroindustriales de maíz (*Zea mays* L.) y berenjena (*Solanum melongena* L.) como fuentes de fibra: extracción de biocompuestos, caracterización química y funcionalidad

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

Lic. Ricardo Alejandro Higuera Coelho

Director de Tesis: **Dra. Ana María Luisa Rojas.**

Director Adjunto: **Dra. Eliana Noemí Fissore.**

Consejero de Estudios: **Dra. Sandra Guerrero.**

Lugar de Trabajo: Departamento de Industrias-ITAPROQ, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2024

Utilización de residuos agroindustriales de maíz (*Zea mays* L.) y berenjena (*Solanum melongena* L.) como fuentes de fibra: extracción de biocompuestos, caracterización química y funcionalidad

Resumen

Existe una importante generación de residuos postcosecha provenientes de la producción del maíz y de la berenjena, con componentes de interés que justifican la valorización avanzada de los mismos. Las brácteas del maíz desechadas en la cosecha, industrialización y consumo, así como el cáliz, cáscara y pulpa de la berenjena descartados como residuos y/o por no cumplir con los estándares de comercialización, fueron aplicados a la obtención de compuestos funcionales útiles como aditivos en la formulación de alimentos.

Los tejidos mencionados fueron primero sometidos a secado y molienda para la obtención de polvos, de manera de asegurar la estabilidad de los componentes, mejorar los rendimientos y el proceso de extracción (menor relación líquido:sólido).

En la valorización avanzada de las brácteas del maíz, durante la extracción secuencial de los biopolímeros mayoritarios, se pudieron aislar pectinas novedosas (MP y MP-US) a partir del residuo insoluble en etanol hirviente (RIA-PB) obtenido del polvo de las brácteas del maíz (PB). Se implementaron tratamientos sustentables para la extracción de MP y MP-US, utilizando hidrólisis alcalina seguida de extracción enzimática con celulasa. La aplicación de un pretratamiento con ultrasonido de alta potencia (US) aumentó el rendimiento de extracción (MP-US). Las pectinas MP y MP-US fueron identificadas como homogalacturonano (HG) con bajo grado de metilesterificación (DM) y de acetilación, donde MP tenía un peso molecular promedio y una polidispersidad mayor que la de MP-US, siendo MP-US casi instantáneamente soluble en agua. Ambas pectinas fueron sensibles a los iones calcio, formando geles termo-irreversibles, mientras que en presencia de iones Fe(II) formaron sistemas termo-reversibles del “tipo gel-débil”. Estas pectinas serían útiles como modificadores de la textura en alimentos y productos farmacéuticos y con potencial bioactividad para la liberación de nutrientes esenciales [calcio, hierro (II)] en el intestino.

En la valorización avanzada de los tejidos descartados de la berenjena, cáliz y exocarpio o cáscara (P-CC) y pulpa (P-P), recuperados separadamente como polvos (P-CC y P-P), fueron caracterizados física y químicamente. P-CC presentó un mayor contenido de pectinas y mayor actividad antioxidante, la cual se atribuyó a su contenido elevado de α -tocoferol, carotenoides y compuestos fenólicos extraíbles. Dichas propiedades antioxidantes hicieron que los polvos funcionaran de manera eficaz como preservador en un queso vegano untado de castañas de cajú, retrasando el aumento del índice de peróxido y de los equivalentes de malondialdehído (TBARS) durante su almacenamiento en refrigeración. Además, se evaluó la utilidad de P-CC y P-P como fuentes de pectina, aplicando métodos de extracción amigables con el medio ambiente. Se realizaron extracciones mediante pretratamiento con US seguido de agitación (1h) en solución de Na_2CO_3 0,1M, logrando mayores rendimientos de ácidos urónicos (AU) en las pectinas obtenidas con el tratamiento de US. Los HG extraídos presentaron bajo DM, pesos moleculares variados y capacidad antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos, β -caroteno y luteína coextraídos. Las propiedades reológicas de las pectinas mostraron potencial como espesantes y gelificantes en presencia de iones calcio. Los antioxidantes coextraídos les dieron a las pectinas un valor tecnológico adicional, ya que las mismas funcionaron como aditivo antioxidante en leche al proteger de la fotooxidación por radiación UV-C al triptofano, la tirosina, las cadenas laterales alquílicas y el sulfhidrilo de las proteínas de la leche.

Los residuos de las brácteas del maíz y de la berenjena pueden ser aprovechados para obtener productos con valor agregado tales como pectinas y polvos útiles como aditivos funcionales. Estas pectinas poseen aplicaciones potenciales como modificadores de la textura en la industria alimentaria y farmacéutica, con capacidad bioactiva por la presencia de antioxidantes, útiles también en la preservación de alimentos.

Palabras clave: residuos del maíz, residuos de berenjena, extracción asistida por ultrasonido, extracción enzimática, extracción alcalina, pectina, antioxidantes, agente gelificante, agente viscosante, aditivo funcional.

Utilization of Agroindustrial Residues from corn (*Zea mays* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) as sources of fiber: extraction of biocompounds, chemical characterization, and functionality

Abstract

There is a large generation of post-harvest residues from corn and eggplant fruit, with components of interest that can justify their advanced valorization. The corn husks discarded after harvesting, industrialization, and consumption, as well as the calyx, peel, and pulp of the eggplant fruit discarded as waste and/or for not meeting marketing standards, were applied to obtain functional compounds useful as food additives.

These tissues were first subjected to drying and milling to obtain powders as a way to ensure the stability of the components and improve the yields and the extractive procedure (lower liquid:solid ratio).

In the advanced valorization strategy of the corn husks, during the sequential extraction of the major biopolymers, novel pectins were isolated (MP y MP-US) from the ethanol insoluble residue (RIA-PB) obtained from the corn husks' powder (PB). Sustainable procedures were applied for the extraction of MP and MP-US by using alkaline hydrolysis followed by enzymatic extraction with cellulase. A pre-step of high-power ultrasound (US) increased the yield of extraction (MP-US). MP and MP-US were identified as homogalacturonan (HG) with a low degree of methylesterification (DM) and acetylation, where MP had higher average molecular weight and polydispersity than MP-US, and MP-US was highly and immediately soluble in water at room temperature. MP and MP-US were sensitive to calcium ions, constituting thermo-irreversible gels, while thermo-reversible "weak-gel" type systems were formed in the presence of Fe(II) ions. These pectins can be useful as texture modifiers in food and pharmaceutical applications, with potential bioactivity for delivering essential nutrients [Fe(II) and Ca²⁺] in the gut.

In the advanced valorization of discarded eggplant tissues, calyx and exocarp or peel (P-CC) and pulp (P-P), recovered separately as powders (P-CC and P-P), were characterized physically and

chemically. P-CC presented a higher content of pectins and greater antioxidant activity, which was attributed to its high content of α -tocopherol, carotenoids, and extractable phenolic compounds. These antioxidant properties made the powders efficient preservatives of a spreadable vegan cashew cream cheese by delaying the increases of the peroxide value and malondialdehyde equivalents (TBARS) during refrigerated storage.

Besides, P-CC and P-P were evaluated as sources of pectin by applying environmentally friendly extractive methods. Extractions performed with the US-pretreatment followed by stirring in 0.1M Na_2CO_3 solution for 1h permitted to obtain higher yields in the uronic acid (UA) contents of pectins. The extracted HG presented low DM, varied molecular weights, and antioxidant capacity due to the presence of co-extracted phenolic compounds, β -carotene, and lutein. The rheological properties of pectins showed their potentiality as thickeners and gelling agents in the presence of calcium ions. The co-extracted antioxidants gave additional technological value to pectins since pectins functioned as an antioxidant additive in milk by protecting the tryptophan, tyrosine, alkyl side chains, and sulfhydryl groups of milk proteins from photo-oxidation by UV-C radiation.

The corn husk and eggplant fruit residues can be applied to obtain value-added products such as pectins and tissue powders useful as functional food additives. These pectins can be used as texture modifiers in both food and pharmaceutical industries, with bioactive capacity due to the presence of antioxidant compounds, which are also useful in food preservation.

Keywords: corn waste, eggplant waste, ultrasound-assisted extraction, enzymatic extraction, alkaline extraction, pectins, antioxidants, gelling agent, thickening agent, functional additive.

Agradecimientos

Quiero agradecer al CONICET y a la ANPyCT por haberme otorgado las becas para la realización del doctorado y a la Universidad de Buenos Aires, junto con el Departamento de Industrias, por darme la oportunidad de poder ser parte de esta gran casa de estudios, darme formación como profesional y por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

A la Dra. Lía Gerschenson, directora del grupo de investigación, a las Dras. Ana Maria Rojas, Eliana Noemi Fissore, y Maria Florencia Basanta por brindarme su apoyo y conocimientos a lo largo del trabajo de investigación.

A mis compañeros que forman parte del laboratorio especialmente a Alondra, Aldana, Virginia, Sabrina, Adriana, Carlos y Enzo, por todos aquellos momentos que compartimos juntos en nuestros días en el laboratorio, que hicieron agradable cada día de trabajo, gracias por todo.

A mis Padres, María Teresa y Raúl, mis Hermanos Erika y Raúl, mis Tíos, Primas y Abuela por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, y que a pesar de la distancia siempre estarán allí para mí, este logro también les pertenece, los quiero eternamente.

A Yamilet por ser aquella personal incondicional, que me acompaña desde tiempos inmemoriales brindándome su apoyo, su amistad y consejos, demostrando que la distancia no impide grandes amistades. Agradezco muchísimo por todo lo que has hecho y haces por mí y por estar cuando más lo necesité, te quiero un montón.

A mi familia en Buenos Aires: José Alejandro, Francesca e Irania. Con el tiempo ustedes se han convertido en mi segunda familia, gracias por ser parte fundamental de mi vida, por todos esos momentos valiosos que compartimos y por todo el apoyo constante que va más allá de la amistad. Aprecio enormemente la suerte de tenerlos como amigos y como parte esencial de mi día a día. Gracias por brindarme la amistad. Un agradecimiento especial a Ernesto, que a pesar de ahora estar a distancia también formó parte de esta segunda familia donde recordaré los buenos momentos en Buenos Aires, gracias por tu amistad, apoyo y consejos. Y A todas esas hermosas personas que fui conociendo a través de estos últimos años: Agustina, Martín, Florencia, Nicholas, Silvio, Aseret, Nicolás, Ayelen, gracias por brindarme su amistad, siempre estarán presente en mi memoria por todos aquellos buenos momentos que compartimos.

Publicaciones

Parte de los resultados del trabajo de la presente tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones en revistas internacionales con arbitraje:

- Higuera Coelho RA, Lizarraga L, Ponce NMA, Stortz CA, Rojas AM, Bernhardt DC, Fissore EN (2021). Novel gelling pectins from Zea mays husks' agro-industrial residue and their interaction with calcium and iron (II). *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber*, 26, 100273.
- Higuera-Coelho R, Basanta MF, Rossetti L, Pérez CD, Rojas AM, Fissore EN (2023). Antioxidant pectins from eggplant (*Solanum melongena*) fruit exocarp, calyx and flesh isolated through high-power ultrasound and sodium carbonate. *Food Chemistry*, 412, 135547.
- Gerschenson LN, Fissore EN, Rojas AM, Idrovo Encalada AM, Zukowsky EF, Higuera Coelho RA (2021). Pectins obtained by ultrasound from agroindustrial by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106799.

Artículos enviados a revistas científicas internacionales con arbitraje.

1 - Eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit tissue powders recovered as additives for vegan cashew creamy cheese. Ricardo A. Higuera-Coelho, Evelyn L. Bonifazi, Stefanía Casciaro, Marta A. Carballo, Luciana Rossetti, Carolina D. Pérez, Ana M. Rojas, Maria F. Basanta, Eliana N. Fissore.

2 - Rheological characterization of pectins from discarded eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit isolated by combined high-power ultrasound – sodium carbonate. Ricardo A. Higuera-Coelho, Nora M. A. Ponce, Carlos A. Stortz, Eliana N. Fissore, Ana M. Rojas.

Índice

Capitulo I : Polvos de fibras a partir de residuos vegetales: Brácteas del maíz y fruto de la berenjena	1
I.1.Introducción	2
I.1.1. Residuos vegetales	2
I.1.2.La Fibra Dietaria	4
I.1.2.1.Fibra dietaria Soluble	5
I.1.2.2.Fibra dietaria Insoluble	6
I.1.3.Pared Celular vegetal	7
I.1.4.La pectina	10
I.1.4.1.Estructura de la pectina	12
I.1.4.2.Caracterización de la pectina	13
I.1.4.3.Propiedades químicas de las pectinas	14
I.1.4.4.Propiedades reológicas de las pectinas	15
I.1.4.4.1.Soluciones	15
I.1.4.4.2.Geles	15
I.1.4.4.3.Usos de las pectinas	18
I.1.5.Fibra antioxidante	19
I.1.6.Compuestos fenólicos	20
I.1.6.1.Clasificación de compuestos fenólicos.	21
I.1.6.2.Métodos de cuantificación de polifenoles	24
I.1.6.3.Beneficios para la salud de los compuestos fenólicos	25
I.1.6.4.Propiedad antioxidante	27
I.1.7.Carotenoides	27
I.1.8.La valorización de los residuos vegetales	30
I.1.9.Residuos de la cosecha y el procesamiento de la berenjena (<i>Solanum melongena</i> L.)	34
I.1.10.Residuos de la cosecha y del procesamiento del maíz (<i>Zea mays</i> L.): aprovechamiento de las brácteas	36
I.2.Objetivos de la tesis	40
I.3.Materiales y Métodos	43
I.3.1.Reactivos	43
I.3.2.Preparación de la muestra	43
I.3.3.Obtención de los polvos	44
I.3.3.1.Obtención del polvo de las brácteas del maíz (PB)	44
I.3.3.2.Obtención del polvo de la cáscara y cáliz de la berenjena (P-CC)	44
I.3.3.3.Obtención del polvo de Pulpa de berenjena (P-P)	45
I.3.4.Propiedades de Hidratación	45
I.3.4.1.Capacidad de hinchamiento (SC) y de atrapamiento de agua (WHC)	45
I.3.4.2.Capacidad de retención de agua (WRC)	46
I.3.5.Actividad de agua (a_w)	47
I.3.6.Determinación del color:	47

I.3.7. Microscopia del tejido fresco	47
I.3.8. Caracterización química del Polvo	48
I.3.8.1. Ácidos urónicos	48
I.3.8.2. Hidratos de carbono no celulósicos	49
I.3.8.3. Lignina	49
I.3.8.4. Determinación de Proteínas	50
I.3.8.5. Azúcares Reductores	50
I.3.8.6. Determinación del grado de metilación (DM)	51
I.3.8.7. Determinación del grado de acetilación (DA)	51
I.3.9. Capacidad Antioxidante de los polvos de P-P y P-CC.	52
I.3.9.1. Ensayo del FRAP	52
I.3.9.2. Ensayo del DPPH	52
I.3.10. Determinación de carotenos y tocoferoles en los polvos de berenjena P-P y P-CC	52
I.3.11. Determinación del contenido de polifenoles en los polvos de berenjena P-CC y P-P	53
I.3.11.1. Extracción y cuantificación de polifenoles extraíbles mediante HPLC-DAD	53
I.3.11.2. Identificación de fenoles mediante HPLC-ESI-microTOF/MS y HPLC-PAD	54
I.3.11.3. Cuantificación de Compuestos fenólicos unidos covalentemente mediante HPLC-DAD	54
I.3.12. Evaluación de los efectos citotóxicos de los extractos polifenólicos de P-P y P-CC en células HepG2	55
I.3.12.1. Cultivo celular y condiciones de incubación	55
I.3.12.2. Ensayo MTT	56
I.3.13. Evaluación del efecto del ultrasonido sobre los polvos de berenjena (P-P y P-CC)	56
I.3.14. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los polvos de berenjena (P-P y P-CC)	57
I.3.15. Análisis estadístico de los resultados	58
I.4. Resultados y Discusión	59
I.4.1. Tamaño de partícula de polvos	59
I.4.2. Color	61
I.4.3. Actividad de agua (a_w°)	61
I.4.4. Composición química	63
I.4.5. Propiedades de hidratación	64
I.4.6. Microscopia óptica del tejido fresco	66
I.4.7. Contenido de Carotenoides y tocoferoles	67
I.4.8. Compuestos fenólicos	69
I.4.9. Capacidad Antioxidante	82
I.4.10. Evaluación de la citotoxicidad de compuestos fenólicos extraíbles de P-CC y P-P en células HepG2	84
I.4.11. Evaluación del ultrasonido de alta potencia (US) como pretratamiento: Efecto sobre el tejido de los polvos P-CC y P-P	86
I.5. Conclusiones	91

Parte I. Extracción de fracciones enriquecidas en pectina a partir de las brácteas del maíz.

Parte II. Extracción de fracciones enriquecidas en pectina y polifenoles a partir de residuos de frutos de berenjena.

II.1.Introducción	94
II.1.1.Métodos Tradicionales de extracción	95
II.1.1.1.Extracción con agua	95
II.1.1.2.Extracción en medio ácido	96
II.1.1.3.Extracción en medio alcalino	97
II.1.1.4.Extracción con agentes quelantes	99
II.1.2.Métodos alternativos	100
II.1.2.1.Extracción con Ultrasonido de alta potencia (US)	100
II.1.2.2.Extracción con Enzimas (EAE).	104
II.1.3.Combinación de tecnologías no convencionales	106
II.2.Objetivos	107
II.3.Materiales y Métodos:	108
II.3.1.Reactivos.	108
II.3.2.Extracciones a partir del polvo RIA-PB del maíz	108
II.3.2.1.Extracción con buffer citrato de sodio – enzimas	108
II.3.2.2.Tratamiento con Ultrasonido (US)	109
II.3.3.Extracciones a partir de los polvos P-CC y P-P de berenjena	110
II.3.3.1.Extracción de las fracciones enriquecidas en pectinas	110
II.3.3.2.Extracción con carbonato de sodio	110
II.3.4.Determinación de color de las fracciones extraídas	111
II.3.5.Características Químicas de las fracciones extraídas	111
II.3.5.1.Ácidos Urónicos	111
II.3.5.2.Determinación de Proteínas	111
II.3.5.3.Determinación de Carbohidratos Totales	112
II.3.5.4.Determinación del Grado de Metilación (DM)	112
II.3.5.5.Determinación del Grado de Acetilación (DA)	112
II.3.6.Determinación del perfil de Azúcares Neutros mediante cromatografía gaseosa (GC)	112
II.3.7.Pesos moleculares determinados por Cromatografía de Permeación en Geles (GPC)	113
II.3.8.Espectroscopia FT-IR	114
II.3.9.Determinación de carotenoides y tocoferoles de las fracciones extraídas	114
II.3.10.Determinación del contenido de compuestos fenólicos de las fracciones extraídas a partir de los polvos de berenjena (P-CC y P-P)	115
II.3.10.1.Extracción y cuantificación mediante HPLC-DAD	115
II.3.10.2.Identificación de fenoles mediante HPLC-ESI-microTOF/MS	115
II.3.10.3.Cuantificación de Compuestos fenólicos enlazados covalentemente mediante HPLC-DAD	115
II.3.11.Capacidad Antioxidante de las fracciones extraídas	116

II.3.11.1.Ensayo del FRAP _____	116
II.3.11.2.Ensayo del DPPH _____	116
II.3.12.Caracterización Reológica de las fracciones pécticas de berenjena _____	117
II.3.12.1.Efecto de iones Ca^{2+} _____	117
II.3.12.2.Ensayos de flujo _____	117
II.3.12.3.Ensayo dinámico u oscilatorio _____	118
II.3.13.Caracterización Reológica de las fracciones enriquecidas en pectinas extraídas de las brácteas del maíz _____	119
II.3.14.Análisis de las fibras por microscopía de fuerza atómica (AFM) de las fracciones enriquecidas en pectinas extraídas de las brácteas del maíz _____	120
II.3.15.Potencial zeta y diámetro hidrodinámico medio de las fracciones extraídas de las brácteas del maíz _____	121
II.3.16.Análisis estadístico _____	121
II.4.Resultados y discusión _____	122
II.4.1.Rendimientos _____	122
II.4.2.Caracterización química de las fracciones MP y MP-US _____	126
II.4.3.Peso Molecular de las fracciones MP y MP-US _____	130
II.4.4.Análisis de espectros FT-IR de las fracciones MP y MP-US _____	131
II.4.5.Microscopía de fuerza atómica (AFM) de pectinas MP y MP-US _____	133
II.4.6.Ensayos reológicos para las fracciones MP y MP-US _____	135
II.4.6.1.Caracterización termo-reológica: sensibilidad a Ca^{2+} y Fe^{2+} _____	135
II.4.6.2.Efecto de iones calcio Ca^{2+} _____	136
II.4.6.3.Efecto de iones hierro _____	141
II.4.7.Rendimientos de extracción de los polvos de berenjena P-CC y P-P _____	145
II.4.8.Color de las pectinas extraídas de los polvos P-CC y P-P _____	149
II.4.9.Caracterización química de las fracciones extraídas de los polvos de berenjena P-CC y P-P _____	150
II.4.10.Peso molecular de las pectinas extraídas de los polvos de berenjena P-CC y P-P _____	153
II.4.11.Espectros de FT-IR de las pectinas extraídas de los polvos de berenjena _____	154
II.4.12.Funcionalidad antioxidante _____	156
II.4.12.1.Antioxidantes lipofílicos _____	156
II.4.12.2.Compuestos Fenólicos _____	157
II.4.12.3.Capacidad antioxidante _____	165
II.4.13.Funcionalidad reológica _____	166
II.4.13.1.Contenido de calcio _____	166
II.4.13.2.pH y color de las soluciones acuosas de los sistemas preparados para estudios reológicos _____	168
II.4.13.3.Ensayo de flujo en agua _____	169
II.4.13.4.Ensayos dinámicos _____	172
II.4.13.4.1.En agua _____	172
II.4.13.4.2.En agua con agregado de iones calcio _____	177
II.4.13.5.Sensibilidad al calcio de las pectinas extraídas de los polvos de berenjena _____	179
II.5.Conclusión _____	181

III. Capítulo III Aplicación como aditivos alimentarios de los polvos y de las pectinas extraídas a partir de residuos de berenjena	184
III.1. Introducción	185
III.1.1. Oxidación de lípidos	185
III.1.2. Oxidación de aminoácidos y proteínas	187
III.1.3. Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos	190
III.1.4. Mecanismo de acción de los carotenoides y tocoferoles	191
III.1.5. Queso crema vegano a partir de frutos secos	193
III.2. Objetivos	195
III.3. Materiales y Métodos	196
III.3.1. Reactivos	196
III.3.2. Preparación de queso vegano untable de castañas de cajú con polvos de berenjena (P-CC y P-P) como aditivo antioxidante	196
III.3.2.1. Determinaciones de propiedades físicas	197
III.3.2.1.1. Medición del pH	197
III.3.2.1.2. Actividad de Agua	197
III.3.2.1.3. Color	198
III.3.2.1.4. Caracterización reológica	198
III.3.2.2. Estabilidad química a la oxidación del queso vegano untable de castañas de cajú	198
III.3.2.2.1. Índice de peróxidos	198
III.3.2.2.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	199
III.3.3. Preparación de sistemas con leche descremada con las fracciones de pectinas de berenjena	199
III.3.3.1. Determinaciones de propiedades físicas	200
III.3.3.1.1. Color	200
III.3.3.1.2. Caracterización reológica	200
III.3.3.2. Estabilidad química a la oxidación de los sistemas leche-pectina bajo luz UV	201
III.3.3.2.1. Determinación de grupos carbonilo en las proteínas	201
III.3.3.2.2. Determinación de la oxidación de grupos sulfhidrilos	201
III.3.3.2.3. Determinación de la formación de nitrosina y N'-formilquinurena	202
III.3.4. Análisis estadístico	202
III.4. Resultados y Discusión	203
III.4.1. Aplicación de los polvos de berenjena preparados P-P y P-CC	203
III.4.1.1. P-CC y P-P como aditivos antioxidantes de queso vegano untable de castañas de cajú	203
III.4.1.2. Efectos antioxidantes de los polvos de berenjena	205
III.4.1.3. Estudio reológico del queso vegano untable de castañas de cajú	208
III.4.2. Pectinas extraídas de los polvos de berenjena P-P y P-CC	211
III.4.2.1. Pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS en los sistemas de leche descremada	211
III.4.2.2. Comportamientos reológicos de los sistemas Leche-Pectina	213
III.4.2.3. Efecto antioxidante de las pectinas	215
III.5. Conclusiones	223
Bibliografía	226
Conclusiones Generales	224

CAPITULO I

Polvos de fibras dietarias a partir de residuos
vegetales: Brácteas del maíz y Fruto de la
berenjena

I.1. Introducción

I.1.1. Residuos vegetales

Un tercio de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o desperdicia cada año y esto equivale a aproximadamente 1.300 millones de toneladas. El cuarenta y cinco por ciento de los alimentos desperdiciados provienen de frutas, verduras y hortalizas. El procesamiento de frutas, principalmente para la producción de jugo y frutas enlatadas, genera cantidades masivas de desechos sólidos. Si bien algunos residuos pueden transformarse en alimento para animales o fertilizantes, un gran volumen termina desechado (Ojha et al., 2020).

Los residuos vegetales se refieren a los materiales de desecho orgánicos que provienen de diversas fuentes como verduras, frutas y otros productos de origen vegetal. Los mismos pueden incluir cáscaras, carozos y semillas, tallos, hojas, verduras y frutas en mal estado o caducadas, y otros restos generados durante la preparación y el consumo de alimentos. En general, es importante destacar que, en los países en desarrollo, el desperdicio se genera principalmente en las etapas de postcosecha y procesamiento. Prácticas deficientes, limitaciones tecnológicas, restricciones financieras y la falta de infraestructura adecuada para el almacenamiento y el transporte son las causas fundamentales de estas pérdidas en las naciones de bajos ingresos. En las naciones industrializadas, el desperdicio generalmente ocurre durante la etapa de consumo de los alimentos, y la mayor parte de los alimentos desperdiciados se atribuye a los hogares, es decir, a los consumidores finales (Tchoukouang et al., 2023).

En muchos otros casos, como el de la zanahoria, por ejemplo, defectos estéticos tales como deformidades, tamaños fuera de estándar, bifurcaciones, hendiduras superficiales u otras imperfecciones, zanahorias con forma partida o bien pálidas con hombros verdes provocan un importante descarte, del orden del 35% (Alessandro et al., 2014). En el momento de la cosecha, las zanahorias deben ser firmes y de color naranja brillante, deben haber alcanzado el tamaño suficiente para llenar las puntas y deben tener una forma cónica uniforme desde el hombro hasta la punta. Los supermercados y también las verdulerías en general comercializan únicamente zanahorias rectas para facilitar el pelado de una sola vez en toda su longitud. De ahí que, entre el 25% y el 30% de

todas las zanahorias producidas en las granjas de Yorkshire, Reino Unido, son destinadas a la alimentación animal, después de ser revisadas en dichos defectos por máquinas con sensores fotográficos (Stuart, 2009). El color, otro determinante de la calidad, es causado por varios pigmentos como los α - y β -carotenos, que también funcionan como antioxidantes, siendo precursores de la vitamina A (Stuart, 2009). Dentro de otro ejemplo, las cerezas dulces, que se cosechan a mano para el mercado fresco, a menudo se clasifican mecánicamente y, frecuentemente, se transportan durante varias semanas a mercados lejanos. La capacidad de los productores para vender cerezas frescas de manera competitiva puede verse restringida por la sobreproducción y el exceso en el mercado. Además, dado que los intermediarios pagan a los productores un mayor valor por frutos de más de 2,5cm de diámetro, una firmeza superior a 300g/mm y contenidos de sólidos solubles superiores a 18° Brix (Piaskowski et al., 2018), las cerezas sin estas características generalmente se descartan (Jara-Rojas et al., 2015). Las frutas y hortalizas desechadas por defectos estéticos se pueden convertir en polvos altamente enriquecidos en fibra dietaria y valiosos antioxidantes naturales, que pueden resultar útiles como aditivos.

No existe un método universal para el tratamiento de los residuos alimentarios debido a la complejidad de su composición física y química, a las diferentes normas de los gobiernos locales y a las restricciones presupuestarias (Ooi y Woon, 2021). Los enfoques más populares para reducir el desperdicio de alimentos son convertirlos en comida para animales (Nath et al., 2023) y redistribuir los residuos de alimentos comestibles o los excedentes de alimentos a las comunidades desfavorecidas por parte de asociaciones benéficas (Hecht y Neff, 2019).

Una estrategia más reciente es la valorización avanzada de los residuos, la cual consiste en extraer componentes e ingredientes para producir nuevos alimentos o productos de aplicación industrial diversa. Esta valorización de los residuos alimentarios puede definirse como la conversión de residuos, subproductos o material alimentario infrautilizado o infravalorado en productos valorados o el uso eficaz de dichos productos. La disminución de la abundancia de recursos renovables, la disminución de la disponibilidad de tierras cultivables, el continuo aumento de la población mundial y la acumulación excesiva de residuos justifican el uso de estos y de los subproductos alimentarios en la industria. Por ejemplo, la valorización puede lograrse mediante la extracción de compuestos valiosos como los de la pared celular, metabolitos secundarios bioactivos,

aceites esenciales, pigmentos, enzimas y polisacáridos. Además, el uso de subproductos para generar productos con valor agregado contribuye al reciclaje de los residuos, promoviendo así el desarrollo sostenible y a un medio ambiente ecológico (Roy et al., 2023).

Los desechos vegetales son una matriz compleja que posee un grupo de compuestos diferentes que pueden interactuar entre sí. Se ha reportado que estos compuestos presentan algunas actividades biológicas específicas después de su consumo, además de proporcionar características químicas, físicas y biológicas a las plantas (Segneanu et al., 2017). Sin embargo, hay que destacar que los efectos beneficiosos para la salud están ligados a los compuestos bioactivos y sus interacciones con la matriz alimentaria. Dentro de estos compuestos bioactivos se encuentran altos niveles de fibra dietaria y de compuestos fenólicos que, cuando se combinan, se conocen como fibra dietaria antioxidante. Los mismos tienen propiedades beneficiosas para nuestra salud, entre ellas antiinflamatorias, antioxidantes y cardioprotectoras (Sagar et al., 2018).

Los desechos vegetales, que incluyen cáscaras, tallos y otras partes de plantas, contienen una cantidad significativa de materiales de la pared celular, que incluyen celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Estos componentes pueden ser utilizados como fibra dietaria en la nutrición humana. Comprender la relación entre los residuos vegetales y las paredes celulares puede conducir a prácticas de gestión de residuos más sostenibles y a una mejor apreciación del valor nutricional de los alimentos de origen vegetal.

I.1.2. La Fibra Dietaria

La fibra dietaria consiste en una mezcla de compuestos que forman las paredes celulares de las plantas, responsables de proporcionar soporte estructural a los vegetales. Es un grupo complejo de biocompuestos presentes en frutas, hortalizas y verduras y que no son digeridos por las enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal humano que, cuando se consumen en la dieta, desempeñan un papel esencial en la salud digestiva y también pueden prevenir algunas afecciones como la diabetes, la hipertensión y la enfermedad coronaria. Por esta razón, la fibra dietaria se ha convertido en una opción prospectiva para el desarrollo de alimentos, suplementos o ingredientes funcionales innovadores (Subiria-Cueto et al., 2021).

Químicamente, la fibra dietaria está constituida por varios polímeros de carbohidratos como homopolisacáridos, heteropolisacáridos, oligosacáridos, almidones resistentes, gomas y mucílagos (Ahmad y Khalid, 2018). Además, la lignina, un heteropolímero fenólico racémico complejo, constituyente de la pared celular secundaria, también tiene función de fibra dietaria (Saini et al., 2023). Estos compuestos se pueden dividir en dos categorías principales según sus propiedades químicas y efectos en el organismo: fibra soluble y fibra insoluble (**Fig. I.1.1**).

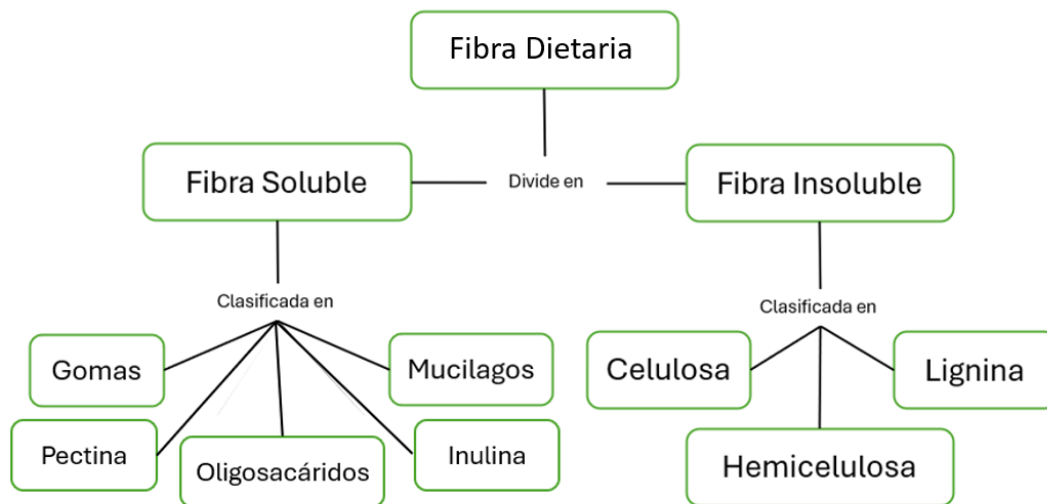


Figura I.1.1 Clasificación de la fibra dietaria (Subiria-Cueto et al., 2021).

I.1.2.1. Fibra dietaria Soluble

Son polisacáridos solubles en agua que pueden retener entre 15 y 20 veces su peso en agua, estimulan la secreción gástrica, aceleran el movimiento intestinal, acortan el tiempo de tránsito intestinal y reducen la absorción de colesterol, glucosa y grasas. (Subiria-Cueto et al., 2021) Una de las fibras dietarias solubles más comunes es la pectina, la cual es altamente soluble en agua y puede formar geles. Esta capacidad permite que la pectina atrape el colesterol, reduciendo así sus niveles en el organismo. Las gomas y los mucílagos son otros tipos de fibra dietaria soluble que se encuentran en las capas externas de semillas, raíces y hojas de hortalizas. Su composición química incluye compuestos hidrófilos y ácidos urónicos acetilados y metilesterificados. Debido a su afinidad con el agua y la materia orgánica, pueden actuar como espesantes, gelificantes o emulsionantes en productos farmacéuticos y alimenticios (Barber et al., 2020; Subiria-Cueto et al., 2021). A su vez, la

fibra dietaria puede actuar como prebiótico, promoviendo el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino. Los β -glucanos son fibra dietaria soluble que se encuentra en la pared celular y que puede regular los niveles de glucosa, insulina y colesterol en el organismo (Ahmad y Khalid, 2018).

I.1.2.2. Fibra dietaria Insoluble

La celulosa es uno de los ejemplos más comunes de este tipo de fibra. Esta molécula es la fibra más abundante en la naturaleza. Otros tipos de fibra insoluble son la hemicelulosa y la lignina. Tanto la celulosa como la hemicelulosa insoluble promueven el tránsito intestinal, aumentan el volumen fecal, actúan como prebióticos en la microflora y reducen el colesterol. La fibra insoluble no es fermentable en el colon y tiene menor capacidad de retener agua en su matriz estructural, aunque ayuda a acelerar el tránsito intestinal y a evitar el estreñimiento (Ahmad y Khalid, 2018; Barber et al., 2020). A pesar de estas observaciones que aparecen en cierta bibliografía, se ha establecido que las fibras menos solubles (ej. celulosa) pueden ser parcialmente fermentadas en el colon descendente y sigmoide, donde el tiempo de tránsito es más lento y las densidades bacterianas son mayores (Holscher, 2017). En el intestino inferior de los humanos, la fermentación microbiana de las fibras vegetales contribuye con menos del 10% a la energía total proporcionada por nuestra dieta. La comunidad microbiana humana en el colon está dominada por Firmicutes y Bacteroidetes, dos filos que también predominan en el intestino de los rumiantes. La presencia de *Ruminococcus* degradadores de celulosa en el intestino humano y el posterior aislamiento de *Ruminococcus champanellensis* ha permitido demostrar la capacidad de degradar tanto hemicelulosa como celulosa a través de los celulosomas (Cann et al., 2016).

Como se menciona anteriormente, la lignina no es un polisacárido, se la considera fibra dietaria porque resiste la digestión en el intestino. La definición actual del Codex (con la inclusión de la nota 1 a pie de página), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el Instituto de Medicina (IOM), la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC), las Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) mencionan que, cuando es de origen vegetal, la fibra dietaria puede incluir fracciones de lignina y/u otros compuestos asociados con los polisacáridos en las paredes celulares de las plantas (Shin y Kashyap, 2023; Stribling e Ibrahim, 2023). A su vez, el método AOAC 2009.01, recomendado por el Codex para cuantificar la fibra

dietaria, fue diseñado para medir la fibra dietaria en su conjunto (polisacáridos solubles e insolubles, lignina, almidón resistente y oligosacáridos), aunque no puede medir cada componente por separado (Stribling y Ibrahim, 2023).

I.1.3. Pared Celular vegetal

La pared celular es una estructura compleja semirrígida que rodea a la membrana citoplasmática. Sus principales funciones son proporcionar protección física y elasticidad para la respuesta osmótica al flujo de agua y turgencia, así como un medio poroso para los intercambios con el medio extracelular (Anderson y Kieber, 2020). De esta manera, las paredes celulares determinan la textura de los alimentos vegetales. Constituyen la principal fuente de fibra dietaria en la alimentación. Sin embargo, entre las diferentes especies, tipos de células y etapas de desarrollo, la estructura fisicoquímica y la función de las paredes celulares pueden variar ampliamente. Además, la pared celular de las plantas es el recurso renovable más abundante en la Tierra, con un gran valor práctico para los seres humanos, incluido el uso para la nutrición animal y la producción de calor, como material de construcción y como fuente de fibras naturales para la producción de textiles y papel (Vaahtera et al., 2019; Zhang et al., 2021).

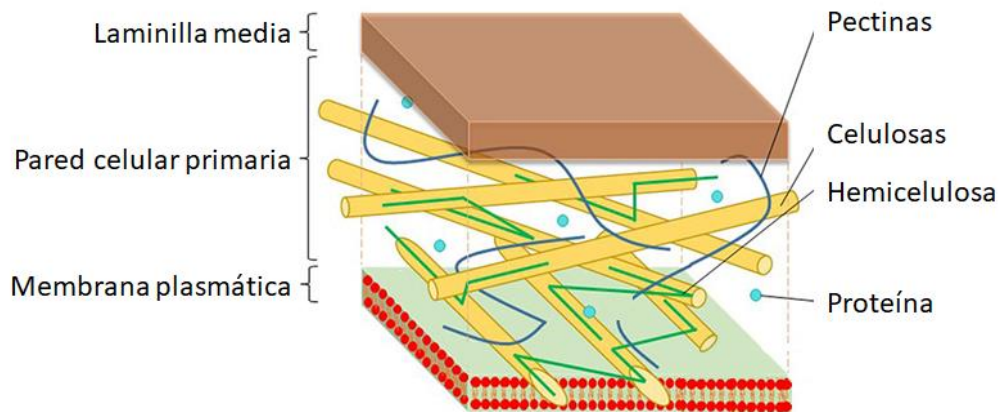


Figura I.1.2. Estructura y composición de la pared celular primaria de las plantas (Loix et al., 2017).

El componente más abundante en las paredes celulares es la celulosa (**Figura I.1.2**), un homopolímero lineal polidisperso formado por unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces β - $(1\rightarrow4)$ en C1 y C4 (**Figura I.1.3**), con un grado de polimerización superior a 15000. Las unidades de

glucosa rotan 180° unas sobre otras, en una estructura helicoidal formando fibras y cristales de celulosa. Este ordenamiento cristalino es una de las características más notables de la celulosa y contribuye a su resistencia y estabilidad química. La celulosa es conocida por su capacidad de formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, lo que contribuye a su estabilidad y a sus propiedades de absorción de agua. Estos puentes de hidrógeno también son responsables de la capacidad de la celulosa para formar geles y coloides en soluciones acuosas, lo que tiene implicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica (Kesten et al., 2019; Anderson y Kieber 2020; Liu et al., 2020).

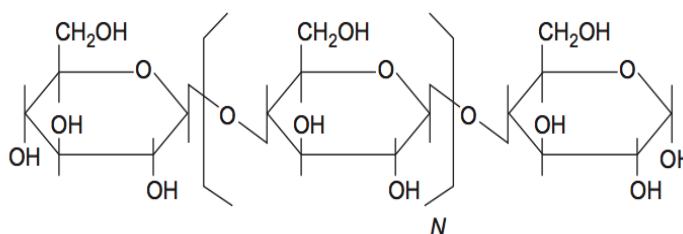


Figura I.1.3. Estructura química de la cadena de celulosa.

Las hemicelulosas constituyen un grupo importante de polisacáridos que forman enlaces covalentes entre sí y también con otros polisacáridos por puentes de hidrógeno, como con las microfibrillas de celulosa y las pectinas (**Figura I.1.2**). Es el segundo polisacárido más común en la naturaleza. Son principalmente polímeros heterogéneos de azúcares neutros de pentosas como D-xilosa y L-arabinosa y de hexosas como D-manosa, D-glucosa y D-galactosa (**Figura I.1.4**). Presentan una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas y monoméricas, presentando estructuras irregulares que complican la cristalización. Por lo tanto, la hemicelulosa es generalmente más flexible y soluble que la celulosa. Generalmente, las hemicelulosas tienen un peso molecular mucho más bajo que la celulosa. Pueden encontrarse varias subclases: xiloglucanos, xilanos (arabinoxilanos, glucuronoxilanos y glucuroarabinoxilanos), glucomananos y glucanos de enlace mixto (Zhang et al., 2021). Hay también hemicelulosas solubles como galactoglucomananos y arabinoxilanos con sustitución monomérica.

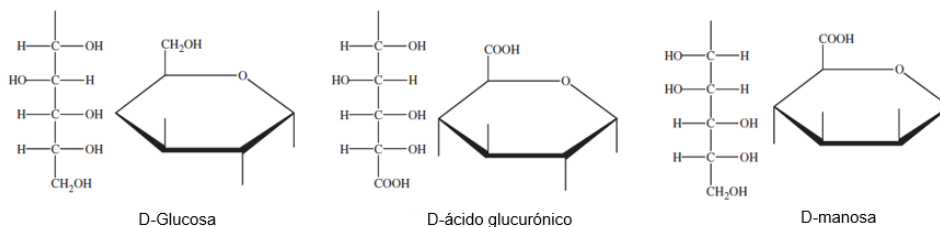


Figura I.1.4. Monómeros presentes en las hemicelulosas (Mamman et al., 2008).

Las paredes celulares pueden contener polifenoles como parte de su estructura. Por ejemplo, la lignina es un polímero hidrofóbico complejo característico de las paredes celulares secundarias y está unido a los polisacáridos de pared celular no celulósicos a través de enlaces éster y éter. Además, el ácido ferúlico y sus deshidródímeros y el ácido *p*-cumárico, que están principalmente unidos a los arabinoxilanos o pectinas, mejoran la rigidez y la resistencia de algunas paredes celulares (Vanholme et al., 2019).

La lignina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Es un polímero fenólico o polifenólico amorfo que surge de la polimerización enzimática de hidrogenación de tres monómeros fenilpropanoides: el alcohol *p*-cumárico (1), el alcohol coniferílico (2) y el alcohol sinapílico (3) (**Figura I.1.5**) (Ralph et al., 2019).

Los componentes básicos estructurales de la lignina están unidos por enlaces carbono-carbono y éter (**Figura I.1.5**). Los monómeros que están unidos entre sí representan sitios de ramificación que dan lugar a la estructura de red característica de la lignina. Por lo tanto, la lignina consta de estructuras complejas y diversas.

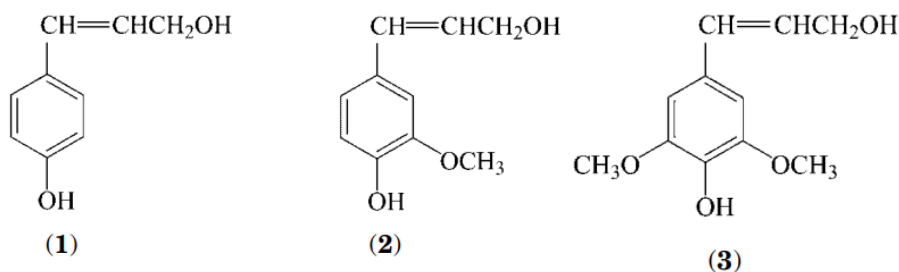


Figura I.1.5. Principales monómeros que conforman la lignina: alcohol *p*-cumárico (1), el alcohol coniferílico (2) y el alcohol sinapílico (3) (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

I.1.4. La pectina

La pectina es estructural y funcionalmente el polisacárido más complejo que se encuentra en la pared celular de las plantas, en las paredes celulares primarias y en la laminilla media (**Figura. I.1.2**). La composición de la pectina varía según la fuente vegetal de la que se extraiga. Básicamente está compuesta, aproximadamente, por un 70% de residuos de ácido D-galacturónico unidos en posiciones α -1,4 los cuales pueden estar metilesterificados o bien acetilados. Se han identificado diferentes regiones en la composición estructural de la pectina, conocidas como: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I), ramnogalacturonano II (RG-II), xilogalacturonano y apiogalacturonano (**Figura. I.1.6 A**). El HG se conoce como la región lineal de la pectina (**Figura. I.1.6 B**), mientras que el RG-I, el RG-II, el xilogalacturonano y el apiogalacturonano se conocen como las regiones ramificadas debido a la aparición de grupos de cadenas laterales (do Nascimento et al., 2018).

La pectina comercial se obtiene principalmente del orujo de manzana, las cáscaras de cítricos y, últimamente, la pulpa de la remolacha azucarera. Las cáscaras de cítricos y el orujo de manzana se obtienen en grandes cantidades como subproductos de la industria de los jugos de frutas y de los aceites esenciales, mientras que la pulpa de la remolacha azucarera es obtenida de la industria azucarera. El rendimiento de pectina y sus características fisicoquímicas dependen del método de extracción utilizado y de otros parámetros como el pH, el ácido de extracción, la temperatura, el tiempo de extracción y la relación líquido-sólido (Cho et al., 2019).

La pectina se puede extraer mediante agua, buffer, agentes quelantes, ácidos y/o bases. Cuando se utilizan sucesivamente en el orden mencionado (desde el agua hasta las bases), estos diferentes agentes químicos pueden extraer selectivamente pectina con diferente solubilidad, a partir del mismo material de partida. Se han empleado varios métodos para extraer pectina de fuentes naturales, incluido el método convencional de extracción en caliente y técnicas innovadoras que involucran ultrasonidos, microondas y enzimas. La extracción convencional en caliente requiere un tiempo prolongado de extracción, un alto aporte de energía y el uso de ácidos fuertes como el sulfúrico, clorhídrico y nítrico (Hamidon y Zaidel, 2017). Los ácidos acético y cítrico han atraído una atención significativa en la extracción de pectina. Los ácidos orgánicos poseen una menor capacidad

de hidrólisis en comparación con los ácidos minerales, siendo el ácido cítrico un agente con menor grado hidrolítico de la pectina en comparación con el ácido clorhídrico (Cho et al., 2019).

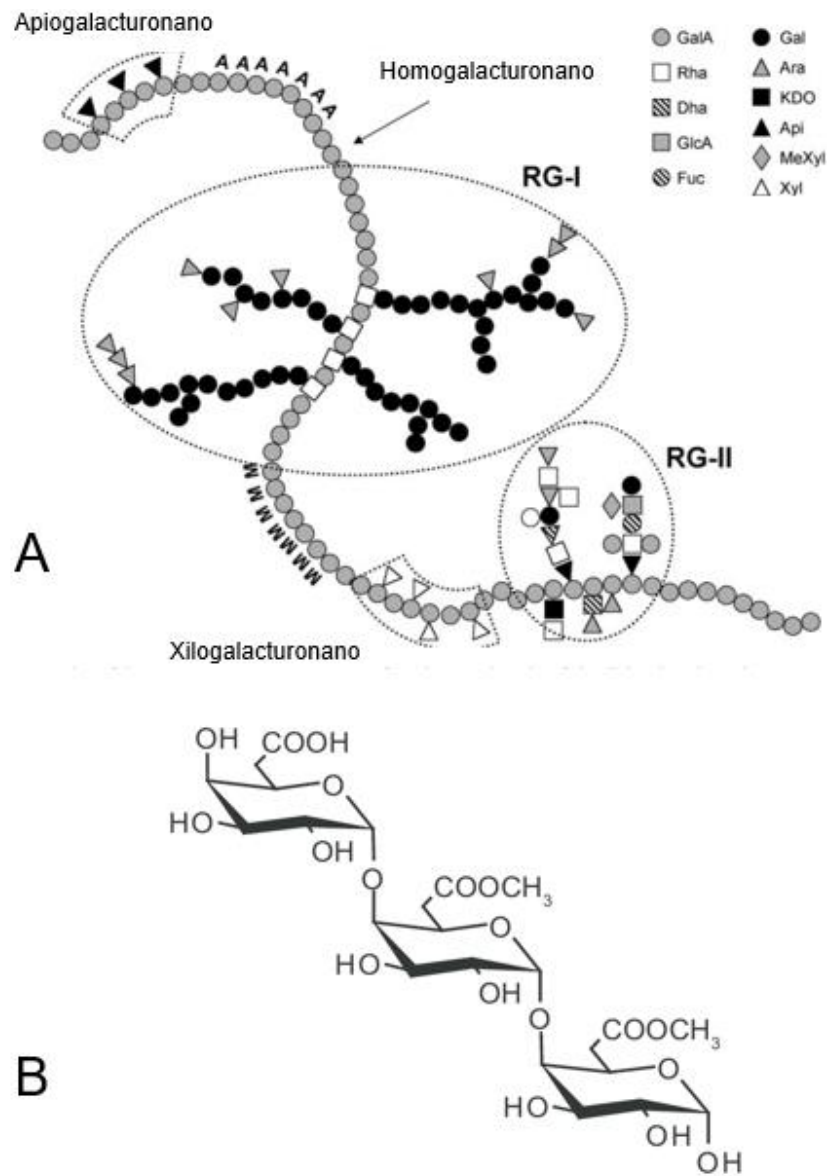


Figura I.1.6. Estructura de la pectina (A) y del homogalacturonano, metilesterificado y no metilesterificado, en detalle (B) (Perez et al., 2003).

I.1.4.1. Estructura de la pectina

La pectina se compone de hasta 17 monosacáridos diferentes (**Figura I.1.6 A**), organizados en varios polisacáridos constituyentes distintos. Juntos, estos polímeros forman la red de pectina, encontrándose tres dominios: HG, RG-I y RG-II, como se mencionó anteriormente (Zdunek et al., 2021).

El HG, un homopolímero lineal de aproximadamente 100 monómeros de ácido D-galacturónico (GalA) ligados en α -1,4 (**Figura I.1.6 B**), es la forma más abundante y constituye aproximadamente el 65% de la pectina. El HG está parcialmente metilesterificado en el carboxilo C-6 y puede acetilarse en el O-2 u O-3 de los hidroxilos (Zdunek et al., 2021).

La interrupción de las unidades repetidas GalA en el HG por la L-ramnosa, esto es, unidades alternadas de GalA y de L-ramnosa (Rha) que forman una cadena (1–4)- α -D-ácido galacturónico-(1,2)- α -L-ramnosa, es la columna vertebral del RG-I. Representa, en general, entre el 20 y 35% de la pectina que se encuentra en la pared celular. Entre el 20 y el 80% de los residuos ramnosilo en el esqueleto del RG-I tienen cadenas laterales que contienen residuos de α -L-arabinosa (Ara) y β -D-galactosa (Gal) individuales, lineales o ramificados (**Fig. I.1.7**). Las cadenas laterales incluyen galactanos y/o arabinanos que pueden llegar a tener grados de polimerización de hasta 47 unidades, y arabinogalactanos (Wang et al., 2018; Freitas et al., 2021).

El RG-II, el xilogalacturonano y el apiogalacturonano forman los galacturonanos sustituidos. La columna vertebral del RG-II, contrariamente a lo que el nombre indica, consiste en un polímero lineal de GalA (HG) sustituido, mediante enlaces α -1,4, por cadenas laterales de 11 a 12 residuos de monosacáridos (**Figura I.1.7**) con más de 20 enlaces diferentes (Freitas et al., 2021).

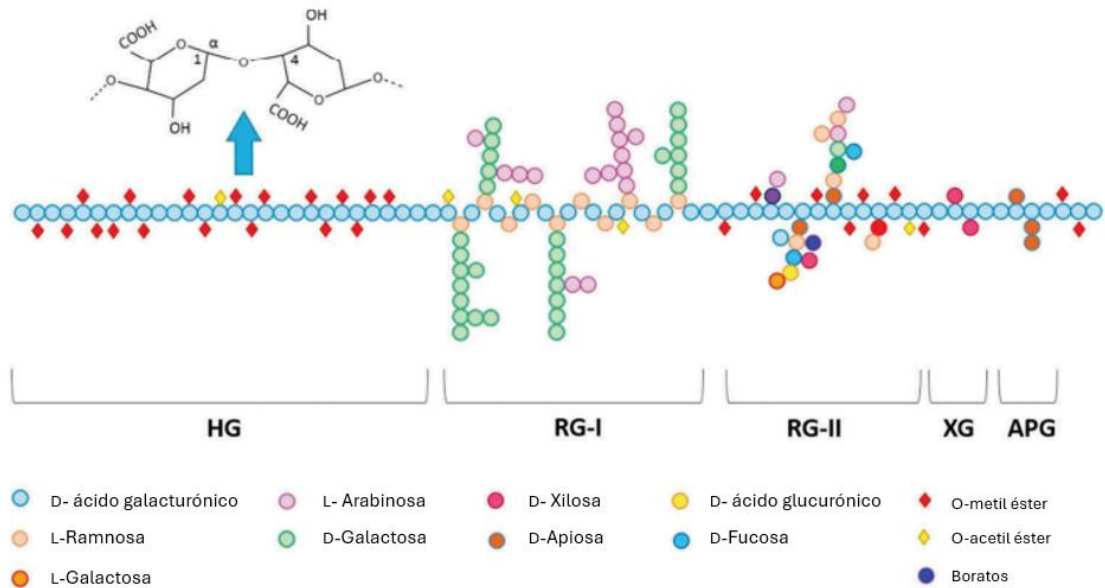


Figura I.1.7 Principales dominios presentes en la pectina (Freitas et al., 2021).

La reticulación mediante un boro entre las cadenas de RG-II de dos moléculas de pectina adyacentes aumenta la integridad de la red de pectina. Debido a la estructura, el RG-II tiene la capacidad de formar dímeros de ésteres de borato (Noreen et al., 2017; Li et al., 2019).

Para el xilogalacturonano o el apiogalacturonano, la D-xilosa o la D-apiosa pueden sustituir en el C-2 o C-3 de la columna vertebral del HG a través de un enlace β -glucósido (**Figura I.1.7**) (Freitas et al., 2021).

I.1.4.2. Caracterización de la pectina

Se han utilizado múltiples herramientas analíticas, que van desde la simple determinación espectrofotométrica hasta análisis microscópicos más complejos, para explorar las características fisicoquímicas de la pectina. Comprender los rasgos fisicoquímicos de la pectina es importante para la determinación de su funcionalidad y su interacción con otras moléculas (Lu et al., 2019).

El GalA y su HG es el principal componente de la estructura de la pectina, por lo cual es de gran importancia la determinación cuantitativa del contenido de GalA. Para lograr esto, se utiliza un análisis espectrofotométrico que involucra el ensayo con tetraborato de sodio/ácido sulfúrico y m-

hidroxidifenilo. Este método espectrofotométrico nos permite cuantificar el contenido de GalA. La determinación precisa del contenido de GalA también es crucial para evaluar la pureza de la pectina extraída. De acuerdo con el Codex Alimentario, la pectina debe tener un contenido de GalA de al menos 65% para ser considerada como tal, y así utilizada como agente gelificante, espesante, estabilizador y emulsionante, ya que el HG es responsable de estas funcionalidades (Lu et al., 2019).

La determinación del peso molecular de la pectina es importante para la evaluación de sus propiedades gelificantes. Por ejemplo, la pectina de la cáscara de pitahaya mostró baja viscosidad y esto se atribuyó a la baja masa molar de la pectina. Una menor cantidad de zonas de unión (anión carboxilato) está presente en la pectina de bajo peso molecular, lo que reduce el alcance de la reticulación con calcio, afectando la resistencia del gel (Yang et al., 2018).

I.1.4.3. Propiedades químicas de las pectinas

La pectina disuelta tiene carga negativa. La carga atrae protones y, por lo tanto, las disociaciones de los grupos ácidos individuales no son independientes. Los valores de pK_a intrínsecos de las pectinas de alto metoxilo son de 3,1 a 3,3. La solubilidad en agua está relacionada con su grado de polimerización y el número y distribución de grupos metoxilo esterificados. En general, la solubilidad aumenta con la disminución del peso molecular y el aumento de los grupos carboxilo esterificados, aunque el pH de la solución, la temperatura y la naturaleza y concentración del soluto presente tienen un efecto sobre la solubilidad (Nabilah et al., 2021).

La cadena de HG puede estar parcialmente esterificada con grupos metilo y los grupos carboxilato (aniónico) pueden estar total o parcialmente neutralizados por iones sodio, potasio, amonio. La proporción molar de GalA metilesterificado a GalA total se denomina grado de metilesterificación (DM). Las pectinas se pueden clasificar, según su grado de metilesterificación (DM) como de alto metoxilo (HM; DM > 50%) y de bajo metoxilo (LM; DM < 50%). Los valores de DM para las pectinas HM comerciales suelen oscilar entre el 60 y el 75% y los de las pectinas LM oscilan entre el 20 y el 40%. Estos dos grupos de pectina gelifican por diferentes mecanismos (Chan et al., 2017; Zdunek et al., 2021).

I.1.4.4. Propiedades reológicas de las pectinas

I.1.4.4.1. Soluciones

Las soluciones de pectina son viscosas, pero la pectina no es particularmente eficiente como espesante en comparación con otros polímeros solubles en agua. Las propiedades reológicas de las soluciones de pectina dependen mucho de la presencia de sales, en particular sales de cationes divalentes como el calcio o de metales no alcalinos similares, y del pH. Como se mencionó previamente, otros factores para considerar son las propiedades químicas de la pectina: DM y peso molecular promedio. La viscosidad de las soluciones de pectina aumenta con la concentración. Las soluciones diluidas de pectina (para algunas pectinas de alto metoxilo, hasta aproximadamente 0,5%) son casi Newtonianas y se ven poco afectadas por la presencia de calcio. La viscosidad de soluciones muy diluidas aumenta al aumentar el pH. Las pectinas con un peso molecular promedio alto son más viscosas en solución que las pectinas comparables de menor peso molecular, en las mismas circunstancias. Las soluciones con aproximadamente 1% de pectina son pseudoplásticas. Algunas pectinas, en ausencia de iones calcio, aumentan su viscosidad si el pH se reduce dentro de los rangos de aplicación típicos de pH 2,5-5,5 (Chan et al., 2017; Stublely et al., 2022).

I.1.4.4.2. Geles

La gelificación en las pectinas se ve muy afectada por parámetros intrínsecos y extrínsecos, incluyendo la distribución de carga a lo largo del HG, el peso molecular promedio de la muestra, la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la presencia de cosolutos. La propiedad más singular y destacada de las pectinas es su capacidad para formar geles ya sea en presencia de iones Ca^{2+} para las pectinas de bajo DM o en presencia de azúcar y ácido para las pectinas de alto DM. Es esta propiedad lo que las convierte en un ingrediente importante de muchos productos alimenticios. Las caracterizaciones físicas del gel son la consecuencia de la formación de una red tridimensional continua de moléculas poliméricas reticuladas (Picot-Allain et al., 2022; Stublely et al., 2022).

A nivel molecular, un gel acuoso consta de tres elementos, esto es, zonas de unión donde interaccionan las moléculas poliméricas, segmentos de interunión de polímeros que son relativamente móviles y agua de solvatación y también libre atrapada en la red de polímeros

formada. Una zona de unión puede implicar un enlace covalente simple entre dos cadenas o una combinación de enlaces puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre dos cadenas de polímeros que corren una al lado de la otra (Chan et al., 2017; Ishwarya y Nisha, 2022).

La formación de gel es causada por enlaces puente de hidrógeno entre los grupos carboxilo libres y también entre los grupos hidroxilo de macromoléculas pécticas vecinas. En una dispersión neutra o ligeramente ácida de macromoléculas de pectina, la mayoría de los grupos carboxilo no esterificados están presentes como sales (carboxilato) parcialmente ionizadas (pK_a pectina $\approx 3,5$). Los aniones carboxilato dan carga negativa a la molécula, que junto con los grupos hidroxilo hace que atraiga capas de agua. Las fuerzas de repulsión entre carboxilatos pueden ser lo suficientemente fuertes como para evitar la formación de una red de pectina. Cuando se agrega ácido, los iones carboxilato se protonan, convirtiéndose en ácido carboxílico. Esta disminución en el número de cargas negativas no sólo reduce la atracción entre la pectina y las moléculas de agua, sino que también reduce las fuerzas de repulsión entre las macromoléculas (Picot-Allain et al., 2022).

La estructura particular de la pectina impone algunas restricciones específicas. La pectina HM, a diferencia de la pectina LM, no contiene suficientes grupos carboxilato libres para gelificar o precipitar con iones de calcio. También la velocidad a la que tiene lugar la formación del gel se ve afectada por el DM. Las pectinas HM y LM tienen por ello mecanismos de gelificación diferentes, aunque las características del gel se rigen por las mismas propiedades macromoleculares como la composición, tamaño y conformación de los polímeros (Chan et al., 2017; Picot-Allain et al., 2022; Ishwarya y Nisha, 2022).

Para formar geles, la pectina HM requiere una proporción de sólidos solubles (sacarosa, por ejemplo) y un pH ácido dentro de un rango estrecho, alrededor de 3,0. Los geles son térmicamente reversibles. En general, las pectinas HM son solubles en agua caliente. Los enlaces puente de hidrógeno entre las macromoléculas de pectina se ven favorecidos por la conformación de las unidades de GalA adyacentes. Los enlaces puente de hidrógeno individuales son relativamente débiles pero el elevado número confiere una estabilidad termodinámica significativa al gel. El enlace de hidrógeno es la principal interacción que sostiene la estructura del gel (Liang et al., 2022). Los

sólidos agregados capturan el agua, estando ella menos disponible para hidratar las macromoléculas de pectina, aumentando así la interacción macromolecular, lo cual lleva a su insolubilización.

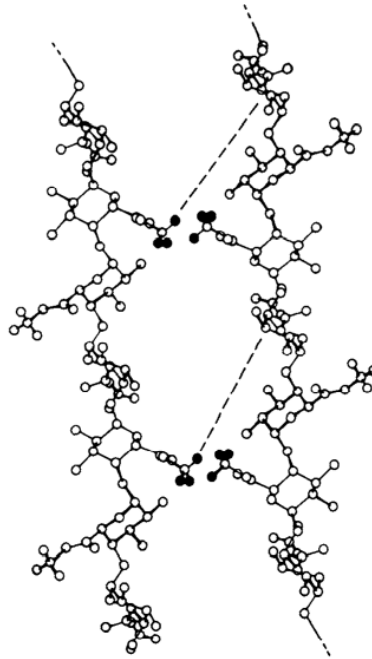


Figura I.1.8 Formación de gel de pectinas HM. Las líneas punteadas representan la interacción de puente de hidrogeno (Thakur et al., 1997).

Las pectinas LM forman geles por la complejación de un ión calcio entre dos grupos carboxilatos pertenecientes a dos cadenas de HG de macromoléculas pécticas vecinas. Este puente electrostático formado por el ión calcio constituye un entrecruzamiento que se encuentra además estabilizado por puentes de hidrógeno locales y por moléculas de agua asociadas en la unión (Braccini y Pérez, 2001). Esto se conoce como un modelo análogo a la “caja de huevos” que es verdadero y propio del alginato (Morris et al., 1982) y se caracteriza como zonas de unión formadas por asociaciones ordenadas lado a lado de HG adyacentes, en las que secuencias específicas de monómeros de GalA en cadenas adyacentes se unen intermolecularmente a través de enlaces electrostáticos de grupos carboxilato, formando estructuras como una caja de huevo (**Figura I.1.9**). Braccini y Pérez (2001) establecieron la validez del modelo de “caja de huevo” para la gelificación del alginato y presentaron nuevos aspectos estructurales para el caso de la gelificación por iones calcio de la pectina a través del HG. Por analogía, las asociaciones antiparalelas más favorables de las cadenas de galacturonato pueden ser consideradas como “cajas de huevo desplazadas”. En el

HG, a partir de la "caja de huevos", el desplazamiento de una cadena de pectina con respecto a la otra, vecina, es más pronunciado ($1,7\text{\AA}$) que en el caso del guluronato de los alginatos.

En todos los sistemas de pectina de LM, la gelificación se rige por el nivel de calcio/g GalA, el pH, el contenido de sólidos solubles y la reactividad inherente de la pectina, esto es, si hay presentes RG-I y/o RG-II, los cuales obstaculizan la interacción de los HG para formar la estructura de caja de huevos. Se requieren al menos 10 a 14 monómeros de GalA para que se forme dicha interacción con iones calcio, y así gelificar. Estos factores afectan la fuerza del gel producido por una cantidad estándar de pectina (Wan et al., 2019).

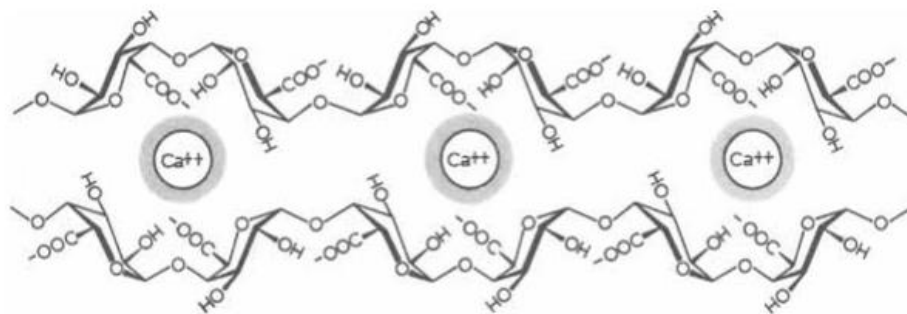


Figura I.1.9 Formación del gel de pectinas LM, con la formación de la estructura de "caja de huevo" (Rolin y De Vries, 2012).

I.1.4.4.3. Usos de las pectinas

La pectina ha sido ampliamente conocida y utilizada en la industria alimentaria durante décadas como un agente gelificante y espesante. La capacidad de las pectinas HM para formar geles en presencia de azúcares a bajos valores de pH ha sido explotada en la fabricación de productos como mermeladas, jaleas, yogures. Por otro lado, las pectinas LM, al poder gelificar en presencia de calcio, son útiles para la formulación de mermeladas, jaleas, lácteos y otros productos con reducido nivel de azúcar, es decir, productos bajos en calorías. Además, la pectina se ha convertido en un componente crucial en la encapsulación de sabores y aceites esenciales, mejorando la estabilidad y la liberación controlada. También se ha encontrado que las pectinas son

útiles en otras aplicaciones industriales, por ejemplo, funcionan como un estabilizador de emulsiones de agua y aceite (Chandel et al., 2022).

Se puede utilizar además para la creación de matrices de liberación controlada de fármacos. Su capacidad para formar hidrogeles en presencia de iones o a través de la modificación química abre una cantidad importante de oportunidades de uso como excipiente (Li et al., 2021).

Muchos estudios evidencian efectos beneficiosos del consumo de pectinas por sus efectos reductores del colesterol y de la glucosa séricos, reconocidos por la European Food Safety Authority (2010) y propiedades anticancerígenas (Li et al., 2021). Los beneficios para la salud atribuidos a la pectina derivan de su composición química y de la presencia de formaciones estructurales específicas que le confieren propiedades bioactivas. En consecuencia, la composición estructural de la pectina se encuentra intrínsecamente ligada a su capacidad como un potencial polisacárido alimentario bioactivo. Además, la pectina actúa como una sustancia profiláctica natural contra el envenenamiento por cationes tóxicos, gracias a su habilidad para quelar iones. Estudios han demostrado su eficacia en la eliminación de metales pesados como el plomo y el mercurio del tracto gastrointestinal y los órganos respiratorios. Asimismo, se ha informado que la pectina reduce el tiempo de coagulación de la sangre extraída, lo que la convierte en una herramienta útil para controlar la hemorragia o el sangrado local (Celus et al., 2018).

I.1.5. Fibra antioxidante

Cuando se extrae fibra dietaria, la misma puede poseer un contenido significativo de antioxidantes naturales. Este tipo de fibra podría utilizarse como aditivo e ingrediente alimentario funcional, capaz de prevenir la oxidación de lípidos y proteínas en los alimentos debido a la presencia de antioxidantes coextraídos (Subiria-Cueto et al., 2021). Los ácidos hidroxicinámicos, tanto monoméricos como poliméricos (taninos hidrolizables), son uno de los principales compuestos bioactivos asociados a la fibra dietaria. La formación de fibra dietaria antioxidante comprende interacciones covalentes y no covalentes entre compuestos fenólicos y fibra dietaria (Das et al., 2020).

Las principales interacciones covalentes entre los compuestos fenólicos y la fibra dietaria son a través de enlaces glucosídicos y enlaces éster entre los polisacáridos de la fibra dietaria y los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos (González Aguilar et al., 2017). Las interacciones no covalentes incluyen enlaces por puente de hidrógeno (Renard et al., 2017), fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas entre grupos hidroxilo y anillos aromáticos de la fibra dietaria y los compuestos fenólicos (Jakobek, 2015). Los compuestos fenólicos interaccionando con la fibra dietaria por unión covalente pueden ser liberados por tratamiento alcalino mientras que los asociados por puente de hidrógeno, esto es, relacionados por interacción física, son los aquí llamados “compuestos fenólicos extraíbles” (Fry, 1986).

I.1.6. Compuestos fenólicos

Los polifenoles son compuestos naturalmente sintetizados por el metabolismo secundario de las plantas, lo que ha atraído la atención de la comunidad científica debido a sus potenciales efectos terapéuticos (de Paulo Farias et al., 2020). Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente frutas y verduras, y se habrían ya identificado más de 8000 estructuras (Neto et al., 2018). En general, los compuestos fenólicos están involucrados en la defensa de las plantas contra el estrés oxidativo y la radiación ultravioleta o en atraer polinizadores y animales para dispersar las semillas (Vuolo et al., 2019). Los polifenoles naturales generalmente se presentan en forma conjugada con uno o más monómeros de azúcar del polisacárido, unido a un grupo hidroxilo.

Los polisacáridos y polifenoles de la pared celular están presentes juntos en muchos alimentos de origen vegetal, en los que sus interacciones desempeñan un papel importante en la determinación de la biodisponibilidad final de los polifenoles, así como en su capacidad de extracción en el procesamiento de alimentos. Por ejemplo, las cantidades de ácidos fenólicos y proantocianidinas que se encuentran en el vino, el jugo de manzana y el jugo de pera son generalmente más bajas de lo que se esperaría de la composición de la fruta, y difieren ampliamente entre las variedades (Shah et al 2018; de Araújo et al., 2021).

I.1.6.1. Clasificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentan uno o más grupos hidroxilos directamente unidos a un anillo aromático y se clasifican según el número de anillos fenólicos presentes en su estructura (Vuolo et al., 2019).

Los flavonoides se encuentran entre los compuestos fenólicos más comúnmente encontrados en frutas y verduras, ya que juegan un papel importante en el color y el sabor, la síntesis de enzimas y vitaminas (Vuolo et al., 2019). Su contenido en la matriz vegetal depende de varios factores, incluyendo la variedad genética de las especies, las condiciones edafoclimáticas, la parte de la planta, las condiciones de crecimiento y el grado de madurez (de la Rosa et al., 2019). Estructuralmente, los flavonoides están compuestos por un núcleo flavano con 15 átomos de carbono dispuestos en 3 anillos como C₆-C₃-C₆ los cuales tienen un esqueleto de fenilbenzopirano compuesto por dos anillos aromáticos (A y B) unidos a un anillo tetrahidropirano (C) (**Figura I.1.10**). El anillo de pirano puede presentar diferencias, lo que permite clasificar los flavonoides dentro de seis grupos, esto es, flavonoles, flavanonas, flavanoles, flavonas, antocianidinas e isoflavonas (**Figura. 1.1.11**). Dentro de cada grupo, estos compuestos presentan un patrón diferente de hidroxilación y de metilación de los anillos A y B (de la Rosa et al., 2019).

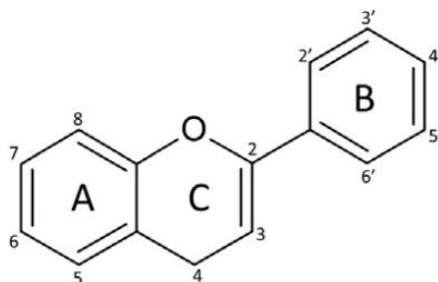


Figura I.1.10 Esqueleto principal de los flavonoides (de la Rosa et al., 2019).

Los flavonoles representan el tipo más común de flavonoides en los alimentos, siendo la miricetina, el kaempferol y la quercetina los más abundantes. En frutas y verduras, la concentración de flavonas es notablemente más baja en comparación con los flavonoles. Dentro de este grupo, destacan la tangeritina, la luteolina y la apigenina. Las flavanonas son los flavonoides principales en los cítricos, se encuentran principalmente la hesperidina en naranjas, eriodictiol en limones y

naringenina en pomelos. Estas sustancias suelen estar glicosiladas en la posición 7 por un disacárido, lo que contribuye al característico sabor amargo de la piel de algunos cítricos. En cuanto a los flavanoles, estos se presentan en forma de catequinas o proantocianidinas. Aunque las catequinas pueden encontrarse en diversas frutas, se obtienen principalmente de bebidas como el vino tinto, los jugos de frutas, el chocolate y el té verde, según de Araújo et al. (2021).

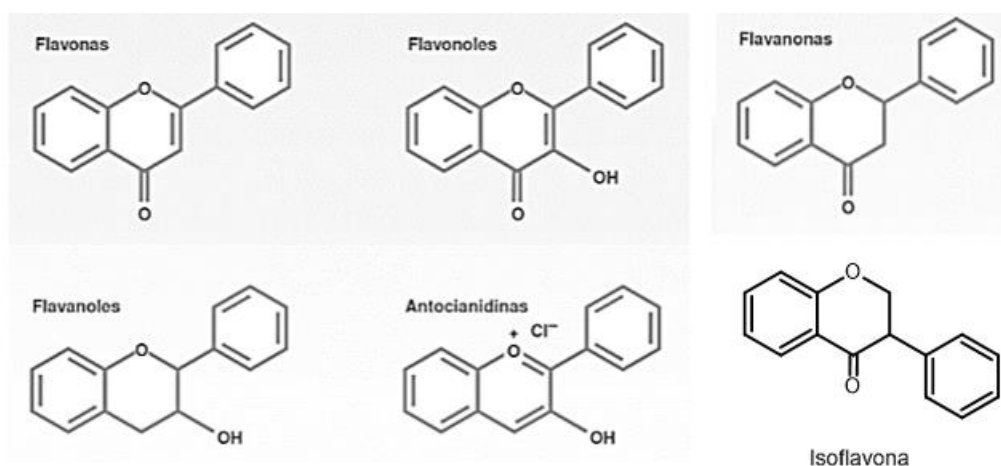


Figura I.1.11. Esqueleto principal de los diferentes tipos clasificados de los flavonoides (de la Rosa et al., 2019).

Por otro lado, las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, solubles en agua. La aglicona es la antocianidina, la parte de la molécula sin el resto de azúcar. Esta clase de compuestos fenólicos se reconoce como el grupo más importante de pigmentos en la naturaleza y contribuyen a los atractivos colores de las frutas. Las antocianinas son pigmentos disueltos en la savia vacuolar de los tejidos epidérmicos de los frutos, a los que confieren un color rosa, rojo, azul o púrpura, y existen en diferentes formas químicas, tanto coloreadas como incolores, según el pH (Khoo et al., 2017). Las diferentes antocianinas varían principalmente en varios aspectos, como la naturaleza y el número de azúcares enlazados, carboxilatos alifáticos o aromáticos unidos al azúcar en las moléculas, así como el número de grupos hidroxilados en la aglicona. Las características químicas de las antocianinas dependen de sus estructuras. Las antocianinas son abundantes en cereales, vino tinto y algunos tubérculos como cebollas, repollo, porotos, entre otros. Además, generalmente se encuentran en ciertas frutas como cerezas, frutos rojos y granadas. Comúnmente se encuentran seis tipos de antocianinas: delfinidina, cianidina, pelargonidina, malvidina, petunidina y peonidina (Albuquerque et al., 2021).

Otro tipo de moléculas que pertenecen a la familia de los compuestos fenólicos son los ácidos fenólicos, los cuales se encuentran naturalmente en frutas, verduras y hortalizas (Neto et al., 2018). Estas sustancias se dividen en dos subgrupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los hidroxicinámicos. A diferencia de otros compuestos fenólicos, los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos presentan un carácter ácido debido a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula. Los compuestos del ácido hidroxicinámico están presentes principalmente como derivados, con un esqueleto C₆-C₃, donde los más comunes son los ácidos ferúlicos, el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico, mientras que los ácidos hidroxibenzoicos (C₆-C₁) se encuentran en varias frutas y en su mayoría se presentan como ésteres, destacándose el ácido gálico, vanílico, eláxico y siríngico (Figura I.1.12) (Albuquerque et al., 2021).

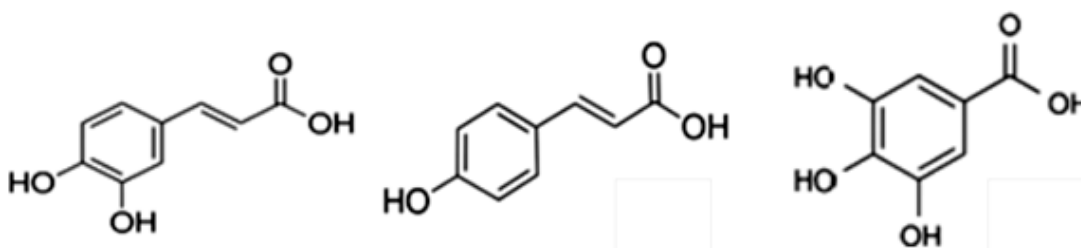


Figura I.12 De izquierda a derecha, ejemplos de ácidos hidroxicinámicos: ácido cafeico y ácido cumárico; de ácidos hidroxibenzoicos: ácido gálico (Albuquerque et al., 2021).

Los ácidos ferúlicos rara vez se encuentran en su forma libre. Comúnmente aparecen glicosilados, unidos a pequeños ácidos orgánicos (quínico, maleico o tartárico) o unidos a componentes estructurales de las células vegetales (pectinas, celulosa, proteínas o lignina). La hidrólisis ácida o alcalina de los tejidos vegetales libera una serie de ácidos fenólicos, los cuales están asociados con la lignina combinada como grupos éster. Alternativamente, pueden estar presentes en la fracción soluble en alcohol, unida simplemente como glucósidos (Albuquerque et al., 2021).

I.1.6.2. Métodos de cuantificación de polifenoles

El papel de los compuestos fenólicos en los alimentos, especialmente en las frutas, ha llamado la atención de investigadores de todo el mundo. La investigación se centra principalmente en la determinación del contenido total de compuestos fenólicos y de su composición cualitativa, la evaluación de diferentes tipos de extracción, la investigación de la actividad biológica de los polifenoles frente a enfermedades y microorganismos, la evaluación de su capacidad antioxidante total usando varios métodos químicos diferentes y la cuantificación e identificación de polifenoles por métodos espectrofotométricos y cromatografía líquida de alta performance (HPLC) usando diferentes detectores como UV-Vis, MS, entre otros) (Cutrim y Cortez, 2018).

Ya se han descrito varios métodos para la cuantificación de polifenoles en plantas y alimentos. Antes del proceso de cuantificación propiamente dicho, es necesario realizar un paso de extracción de los compuestos fenólicos. Generalmente, este proceso consiste en su liberación del material vegetal. Por lo que se refiere a los compuestos solubles, el primer paso suele consistir en la utilización de un disolvente orgánico acuoso para la extracción. Sin embargo, también existen complejos de polifenoles unidos insolubles que se acoplan a polímeros de la pared celular a través de enlaces éster y glucosídicos, que no son extraíbles por disolventes orgánicos. Los ácidos fenólicos (ferulato, diferulato, *p*-cumarato) unidos covalentemente generalmente se liberan por hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida o ambas (Haminiuk et al., 2012).

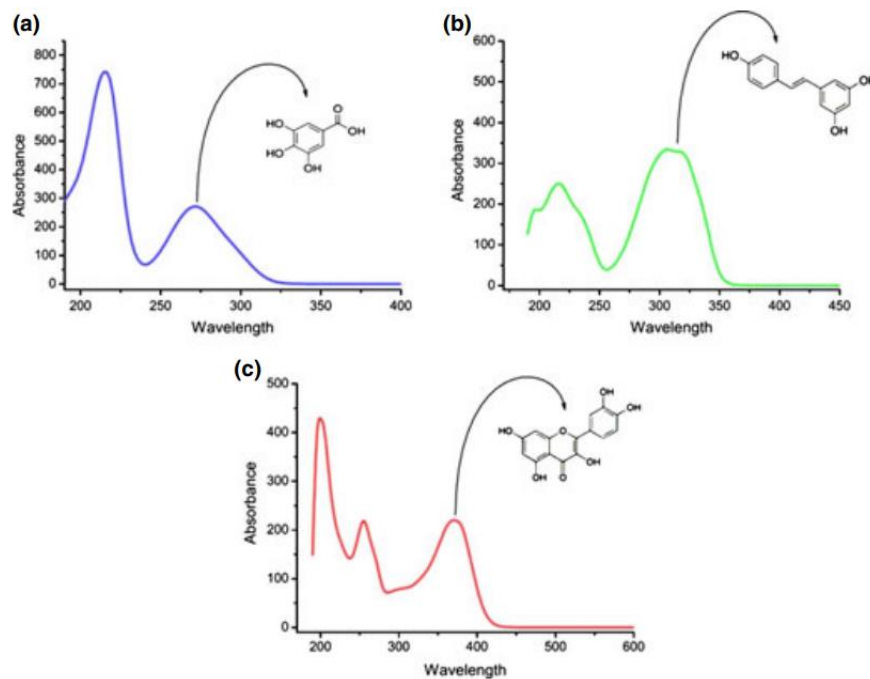


Figura I.1.13 Espectro de absorción UV para **a)** ácido gálico (λ_{max} 271nm), **b)** resveratrol (λ_{max} 306.2nm) y **c)** quercetina (λ_{max} 370.6nm) (Haminiuk et al., 2012).

Las principales metodologías utilizadas para cuantificar los compuestos bioactivos en frutas, ampliamente descritas en la literatura, son las que incluyen el método colorimétrico. La cuantificación de compuestos fenólicos se realiza principalmente mediante análisis espectrofotométrico. Generalmente, la región visible del espectro se utiliza para cuantificar fenoles totales, flavonoides y taninos, entre otras sustancias. Los polifenoles tienen una absorbancia máxima en las regiones ultravioleta o visible y, por lo tanto, la determinación de la absorbancia óptima para cada sustancia juega un papel importante en la identificación, cuantificación y precisión del análisis. Los compuestos fenólicos son todos aromáticos, por lo que todos muestran una absorción intensa en la región UV del espectro (Alara et al., 2021).

I.1.6.3. Beneficios para la salud de los compuestos fenólicos

Se ha especulado que los compuestos fenólicos, especialmente el grupo de los flavonoides, contribuyen a disminuir la incidencia de las enfermedades. Sus efectos biológicos se atribuyen principalmente a la capacidad de secuestrar o inhibir especies oxígeno reactivas (ROS) y nitrógeno

reactivas (RNS), transferir electrones a los radicales libres, además de activar enzimas antioxidantes, mejorando la respuesta al estrés oxidativo y la inflamación, demostrando efectos prometedores en la prevención de diversas enfermedades como diabetes, obesidad, cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas, entre otras (de Araújo et al., 2021). Sin embargo, las propiedades biológicas de estos compuestos dependen de varios factores, entre ellos su concentración en los alimentos, la bioaccesibilidad tras la ingestión, su interacción con otras moléculas, el grado de polimerización, entre otros. Además de sus propiedades biológicas, los compuestos fenólicos también tienen un gran potencial para ser utilizados en aplicaciones comerciales relacionadas con colorantes alimentarios, envases bioactivos, productos cosméticos, producción de pinturas, fertilizantes, tensioactivos, textiles, caucho, plásticos y agentes de curado (Mendoza et al., 2018). A pesar del gran potencial tecnológico, pocos estudios han abordado el desarrollo de nuevos productos que utilicen estos compuestos.

El potencial biológico de los ácidos fenólicos es tan amplio como su diversidad estructural ya que pueden actuar como antidepresivos, antihipertensivos, antiinflamatorios, neuroprotectores, antihiper glucémicos (Agunloye et al., 2019). Simultáneamente, los ensayos preclínicos han reportado la acción de las antocianinas contra algunas patologías como el cáncer, la inflamación, las enfermedades cardiovasculares y la obesidad (Saulite et al., 2019).

Originalmente se pensaba que el principal mecanismo de acción de los polifenoles radicaba en sus efectos antioxidantes directos. Sin embargo, estos efectos ya no se consideran tan relevantes *in vivo*, ya que en la mayoría de los tejidos estos compuestos no alcanzan concentraciones que sean lo suficientemente altas como para tener un efecto significativo en términos de eliminación de los radicales libres. Una consideración relevante son las cantidades de estos compuestos que deben consumirse para proporcionar efectos positivos para la salud. Cuando las cantidades de polifenoles necesarias para producir beneficios para la salud están dentro de los rangos presentes en los alimentos de consumo común, es posible concluir que existe una ausencia de peligro toxicológico. Un segundo nivel es cuando los efectos potenciales se observan a niveles que requieren un aumento en el consumo de alimentos que sea tolerable dentro de límites razonables (Fraga et al., 2019).

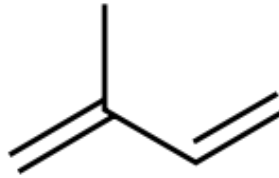
I.1.6.4. Propiedad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o inhibir la oxidación de lípidos u otras moléculas al inhibir el inicio o la propagación de reacciones en cadena oxidantes. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que pueden desempeñar un papel importante en la adsorción y neutralización de los radicales libres, la extinción del oxígeno singlete y triplete o la descomposición de los peróxidos. En general, existen dos categorías básicas de antioxidantes: naturales y sintéticos. Recientemente, ha aumentado considerablemente el interés por encontrar antioxidantes naturales para su uso en alimentos o materiales medicinales para reemplazar los antioxidantes sintéticos. En cuanto a sus efectos biológicos (actividades antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antitumoral y antibacteriana), se sabe que los polifenoles participan en la protección contra las acciones nocivas de las ROS. Los antioxidantes presentes en las frutas, como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos, entre otros, se han asociado frecuentemente con beneficios para la salud (Ganesan y Xu, 2017).

En general, la actividad de los polifenoles depende de la estructura de la matriz alimentaria y de las interacciones con otros ingredientes alimentarios, por ejemplo, carbohidratos, lípidos y proteínas. Los efectos sobre la salud son la prevención de la oxidación de lípidos y proteínas en el estómago (Lee et al., 2020). Además, muchos estudios recientes han demostrado que los complejos polisacárido de pared celular-polifenoles tienen un efecto positivo en el colon (Liu et al., 2020).

I.1.7. Carotenoides

Los carotenoides son una familia de compuestos pigmentados que son sintetizados por plantas y microorganismos. Las frutas y hortalizas constituyen las principales fuentes de carotenoides en la dieta humana. Los carotenoides son compuestos isoprenoides (**Figura I.1.14**) y, por ello, son moléculas extremadamente hidrofóbicas, con poca o ninguna solubilidad en agua. Por lo tanto, se espera que estén restringidos a áreas hidrofóbicas de la célula como el núcleo interno de las membranas, excepto cuando la asociación con proteínas le permite el acceso a un medio acuoso (Saini et al., 2022).



I.1.14 Estructura del isopreno.

Todos los carotenoides poseen una estructura poliisoprenoide, una larga cadena de doble enlace conjugado y una simetría casi bilateral alrededor del doble enlace central, como características químicas comunes. Los diferentes carotenoides derivan esencialmente de modificaciones en la estructura base por ciclación de los grupos finales y por la introducción de funciones de oxígeno que les dan sus colores característicos y propiedades antioxidantes. Las estructuras de algunos carotenoides comunes se muestran en la **Figura I.1.15**. Debido a la presencia de los dobles enlaces conjugados, los carotenoides pueden sufrir isomerización cis-trans (Sun et al., 2022).

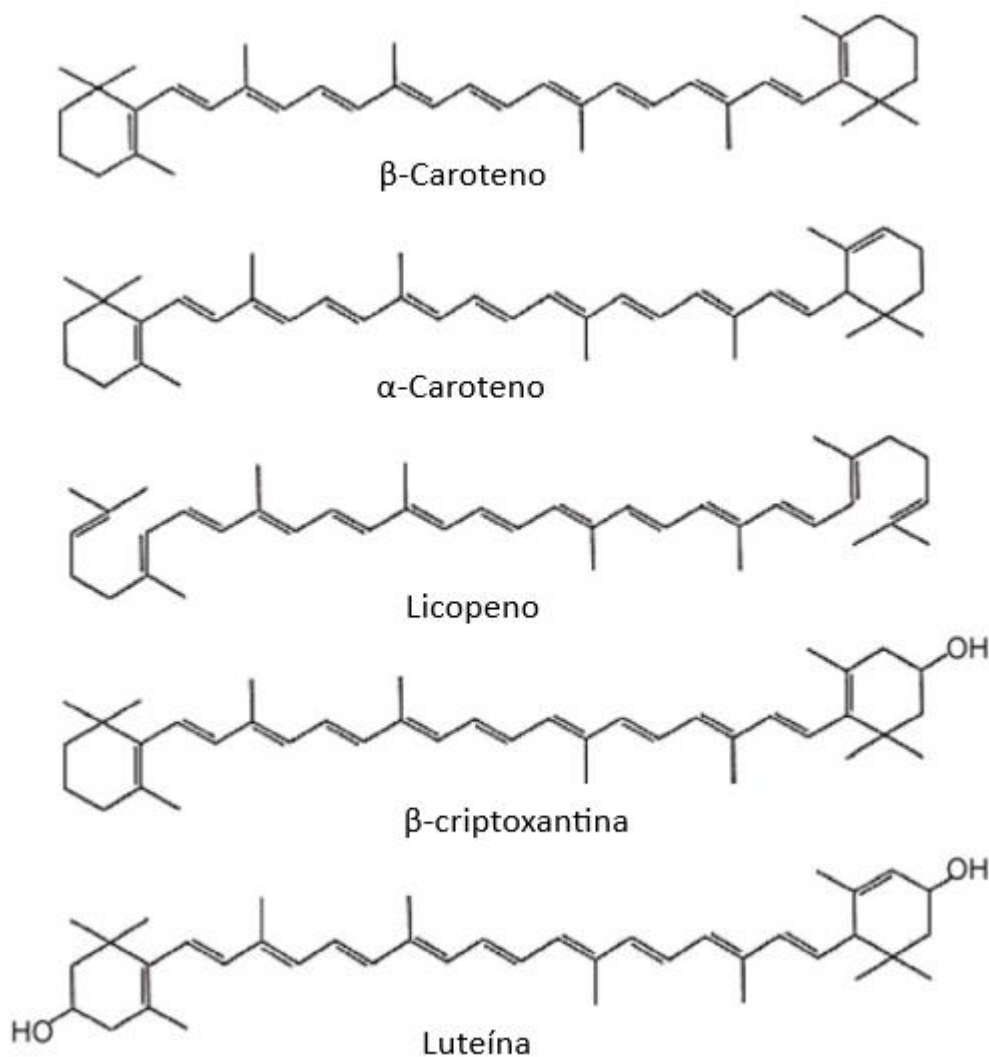


Figura I.1.15 Estructura de la mayoría de los carotenoides presentes en la dieta (Sun et al., 2022).

Se ha demostrado que los carotenos están inversamente relacionados con el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, mientras que la luteína está relacionada inversamente con los trastornos oculares. Se ha sugerido que las propiedades antioxidantes de los carotenoides son el principal mecanismo por el cual producen sus efectos beneficiosos. Por otra parte, también tienen la ventaja añadida de poder convertirse en vitamina A y su papel relacionado en el desarrollo y la prevención de enfermedades (Stahl y Sies, 2003). No es necesario establecer un límite máximo para la ingesta de frutas y verduras, ya que parece poco

probable que incluso la ingesta más alta de frutas y hortalizas pueda suponer un riesgo adverso desde el punto de vista de los carotenoides (Bohn et al., 2021).

I.1.8. La valorización de los residuos vegetales

La valorización de los residuos se refiere al proceso de aprovechar y convertir materiales o subproductos que de otra manera serían considerados desechables, en productos con valor agregado. La gestión sostenible de los recursos naturales y la reducción de los residuos se ha convertido en una preocupación para las industrias, las cuales deben buscar soluciones sostenibles para el cuidado del ambiente. Uno de los enfoques más prometedores en este contexto es la valorización avanzada de los residuos vegetales a través de la extracción de biocompuestos (Freitas et al., 2021).

Estos biocompuestos incluyen polisacáridos, polifenoles, aceites esenciales, pigmentos, proteínas, enzimas, fibra dietaria y otros compuestos de valor en la industria alimentaria, farmacéutica y/o cosmética por sus características funcionales, antimicrobianas o antioxidantes. Los residuos agroindustriales pueden ser sometidos a procesos de extracción para la obtención de dichos compuestos. La eficiencia del proceso de extracción dependerá de las condiciones de este como la preparación del sólido, el tamaño de la partícula, la temperatura de operación, el tipo de solvente, el tiempo de extracción, la velocidad de agitación, entre otras. Se investigan las condiciones óptimas de extracción para obtener un mejor rendimiento (Jiménez-Moreno et al., 2020).

La extracción de estos compuestos a partir de residuos vegetales se ha convertido en un área de investigación, con el desarrollo de técnicas avanzadas más amigables con el ambiente como la extracción con solventes alternativos, la extracción asistida por ultrasonido y la extracción con enzimas que permiten una recuperación eficiente de los biocompuestos. Es así como la valorización de residuos vegetales no sólo contribuye a la sostenibilidad y a la reducción de residuos, sino que también puede generar beneficios económicos y promover prácticas más amigables con el ambiente (Freitas et al., 2021; Kumar et al., 2023).

Al momento de seleccionar la alternativa más apropiada para el aprovechamiento y posterior tratamiento de un residuo agroindustrial específico es necesario conocer su composición, la calidad de sus componentes, la cantidad que se genera y tener en cuenta que este proceso produce un nuevo residuo más agotado que puede tener otra aplicación o convertirse en un desecho. A su vez, es necesario conservar las propiedades de los residuos agroindustriales para obtener resultados deseados en el desarrollo posterior de productos. Es por esto por lo que los residuos orgánicos deben ser secados o deshidratados con el fin de extraer por medios físicos el agua contenida hasta que su nivel sea adecuado para la conservación del residuo por largos períodos (Corredor y Pérez, 2018) e, inclusive, hacer más eficiente y ambientalmente sostenible la extracción al utilizar mucho menor volumen del solvente elegido (Idrovo Encalada et al., 2019a).

La pectina es uno de los polisacáridos comunes, nutricional y económicamente importantes, presentes en residuos o subproductos de origen vegetal. La recuperación de pectina a partir de estos residuos representa una estrategia prometedora para el desarrollo industrial. Como se mencionó anteriormente, las propiedades estructurales y moleculares de la pectina, son factores importantes para sus aplicaciones industriales. Por lo tanto, se ha visto un aumento en el número de estudios que informan métodos alternativos para la extracción de pectina mediante tecnologías amigables con el ambiente. Además, dichos estudios han descubierto el potencial de los residuos vegetales como fuentes renovables y disponibles de pectina para así obtener productos con valor agregado (Zema et al., 2018; Kumar et al., 2023).

Dentro de la industria de procesamiento del mango se tiene a la cáscara como un subproducto que representa el 12-15% de los residuos generados. La misma contiene alrededor de 20 a 35% de pectina, la cual, cuando se la extrae con el método tradicional mediante una solución ácida seguida de tratamiento con etanol, puede tener un rendimiento de aproximadamente 30%. Se han desarrollado métodos más eficientes y rápidos, como extracciones asistidas con enzimas, ultrasonido o solventes alternativos, para extraer pectina de la cáscara del mango. Por ejemplo, en un estudio realizado por Torres-Gallo et al. (2022) mediante un método de ultrasonido de alta intensidad se extrajeron pectinas de las cáscaras del mango. Para ello utilizaron una solución de ácido clorhídrico a pH 1,5 en relación muestra/medio de 1:10. Las muestras fueron colocadas en el baño de ultrasonido de alta intensidad a diferentes frecuencias (37kHz y 80kHz) y tiempos de

extracción (20min, 25min y 30min), utilizando agua destilada como medio de transmisión. Obtuvieron rendimientos entre 13 y 30% de pectina, donde el mayor se lo obtuvo al mayor tiempo de exposición (30min) a la frecuencia más baja (37kHz). Estos métodos son más eficientes para el aprovechamiento de la pectina de la cáscara del mango ya que las condiciones de extracción requieren temperaturas más suaves y tiempos más cortos, lo cuales ayudan al reducir el consumo de energía, además de la menor cantidad de ácidos minerales utilizados para las extracciones (do Nascimento et al., 2018).

La cáscara del melón contiene una alta proporción de pectina, aproximadamente 30%. La recuperación de pectina de las cáscaras del melón utilizando diversas técnicas, como la hidrólisis ácida utilizando ácido cítrico o ácido nítrico, la extracción asistida por microondas en medio acuoso y la aplicación de solventes eutécticos (ej. acetato de sodio/urea). En un estudio llevado a cabo por Golbargi et al. (2021), emplearon extracciones asistidas por microondas para la obtención de pectina a partir de las cáscaras del melón. Durante el proceso, se variaron la relación agua:sólido (10-30mL/g), la potencia de microondas (180-540W) y el tiempo de irradiación (5-15min), manteniendo una temperatura constante de 75°C. La máxima eficiencia de extracción de pectinas se logró con una relación agua:sólido de 20,94mL/g , una potencia de microondas de 414,4W y un tiempo de irradiación de 12,75min, donde obtuvieron un rendimiento del 32,81%, ofreciendo ventajas sobre los métodos tradicionales al tener rendimientos altos en tiempos bajos de extracción. La cáscara de melón posee un elevado contenido de pectina, destacándose por su capacidad de retención de agua, y estabilidad térmica. Estas características la convierten en una materia prima prometedora para la producción de pectina, con un potencial significativo para aplicaciones comerciales en la industria alimentaria (Güzel y Akpınar, 2019).

La cáscara que se origina como subproducto de la industrialización y del consumo de plátanos contiene una cantidad significativa de pectina, entre 16% y 24%, dependiendo del tipo y la variedad de plátano. Se han empleado diversas técnicas, tanto convencionales como avanzadas, para extraer pectina de la cáscara (Kamble et al., 2017). Algunos estudios han demostrado que la extracción de pectina puede realizarse con eficacia utilizando ácido cítrico. Además, la extracción asistida por ultrasonido en combinación con ácido cítrico ha demostrado ser un método efectivo para obtener pectina de la cáscara del plátano. Khamsucharit et al. (2018) realizaron un estudio donde extrajeron

pectina de las cáscaras de plátano pertenecientes a cinco variedades distintas, así como de cáscaras de cítricos y orujo de manzana. Se utilizó una solución de ácido cítrico al 6% p/p, en relación sólido:líquido de 1:20 p/v. Los rendimientos de extracción fueron entre 10,91% y 24,08%. La de cáscara de plátano de la variedad Kluai Leb Mu Nang dio el rendimiento más elevado 24,08%. Las cáscaras de plátano de las cinco variedades tuvieron rendimientos de extracción comparables a las fuentes convencionales de pectina (cáscara de cítricos y el orujo de manzana). Además, las pectinas extraídas se clasificaron como de alto metoxilo, similar a las de las cáscaras de cítricos y orujo de manzana. En términos de pureza, las pectinas extraídas presentaron altos contenidos de ácido urónico, cumpliendo con los criterios para su uso como aditivo alimentario. Esto sugiere el potencial de la cáscara de plátano, especialmente, como una fuente alternativa viable para la producción comercial de pectina.

La cáscara de la granada es un subproducto de la producción de jugos. Es rica en pectina (20-25%), compuestos fenólicos (10-20%) y azúcares (30-35%). Múltiples estudios han investigado métodos de extracción de su pectina, incluyendo tanto métodos convencionales ácidos como alternativas más sostenibles como es el uso de ácidos orgánicos, particularmente ácido cítrico. Los métodos alternativos, como el uso de ultrasonido, han demostrado mayor eficiencia en la extracción de pectina con menor consumo de energía y de solventes en comparación con los métodos convencionales. Estos avances buscan reducir el impacto ambiental negativo asociado con la producción de pectina a partir de la cáscara de la granada (Yang et al., 2022).

Nateghi et al. (2022) llevaron a cabo extracciones de pectina utilizando polvo deshidratado de cáscaras de granadas. Se empleó una solución de ácido cítrico con diferentes valores de pH (1, 2, 3) y una relación sólido:líquido de 1:30 p/v. La mezcla se agitó mediante un agitador magnético en agua a distintas temperaturas (35, 65, 95°C) y por diversos tiempos de extracción (40, 120, 200 minutos). Los resultados revelaron un rendimiento de entre el 6,96% y el 8,65%, con un contenido de GalA entre 60,31 y 84,64%. La optimización de las condiciones de extracción para maximizar tanto el rendimiento como el contenido de GalA dio una temperatura de 94,39°C, un tiempo de 200 minutos y un pH de 1,24 como las condiciones óptimas. La pectina extraída de las cáscaras de granada representa un recurso novedoso y económico, con potencial aplicación en productos alimenticios. Moorthy et al. (2015) llevaron a cabo la extracción de pectina de la cáscara

de granada mediante el uso de ultrasonidos, logrando un rendimiento máximo de pectina del 23,87%. Este resultado se obtuvo bajo las siguientes condiciones experimentales: una relación sólido:líquido de 1:18g/mL, utilizando una solución de ácido cítrico como solvente con un pH de 1,27, un tiempo de extracción de 28 minutos y una temperatura de 61,90°C.

Es posible que se lleven a cabo más investigaciones sobre la optimización de las variables de extracción de la pectina a partir de diversos residuos de la elaboración de productos agroalimentarios y alimentarios. La utilización de residuos o subproductos del procesamiento de frutas y hortalizas para la extracción de pectina es un enfoque sostenible hacia la adición de valor y la protección del medio ambiente (Kumar et al., 2023).

I.1.9. Residuos de la cosecha y el procesamiento de la berenjena (*Solanum melongena* L.)

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es un vegetal de la familia Solanaceae a la cual pertenecen también la papa, el tomate y el morrón. Es una planta de estación cálida, originaria de India y China. Progresivamente, su cultivo se extendió a toda la cuenca mediterránea, Europa Central, África y luego América; actualmente se cultiva a nivel mundial (Frary et al., 2007). La fruta de la berenjena es una baya alargada o globosa con colores que van desde el blanco, verde, pasando por grados de pigmento púrpura hasta un color casi negro (**Figura I.1.16**). En la cáscara del fruto se han identificado antocianinas que le confieren la coloración. La pulpa es consistente, de textura esponjosa, de color blanco, tiene cierto sabor amargo y presenta pequeñas semillas de color amarillo (Agricultural Marketing Resource Center, 2021).

Se encuentra disponible en el mercado durante todo el año ya que generalmente se cultiva dos o tres veces al año. Es además muy nutritiva, siendo utilizada con fines medicinales (Naeem y Ugur, 2019). La composición básica del fruto se presenta en la **Tabla I.1.1**. Es una de las hortalizas con más alto contenido de polifenoles, los cuales tienen efectos reductores del nivel de colesterol en sangre e inhibe los radicales libres, como se mencionó previamente. Posee propiedades antidiabéticas y cardioprotectoras. El fruto de la berenjena tiene muy pocas calorías y un buen contenido de minerales (hierro, calcio, potasio y magnesio) que son de gran ayuda para la salud. A su vez, posee una gran diversidad de vitaminas y de compuestos fitoquímicos importantes de los

cuales se destacan compuestos fenólicos como el ácido cafeico, ácidos clorogénicos, delphinidina y nasunina (Bhaskar y Ramesh Kumar, 2015).



Figura I.1.16. Berenjena y su fruto (*Solanum melongena* L.).

Además de ser una rica fuente de diversos compuestos fenólicos, la berenjena también contiene carotenoides y glicoalcaloides con propiedades anticancerígenas demostradas. Estos fitocompuestos protegen las membranas celulares y potencian la función de la memoria en el cerebro, manteniendo la salud cerebral a través de la protección de sus células frente al efecto dañino de los radicales libres. Además, el contenido de fibra ayuda también en la digestión al eliminar toxinas y sustancias nocivas en el estómago (Fraikue, 2016).

Tabla I.1.1 Composición química de la berenjena (Naeem y Ugur 2019).

Componentes	
Energía	(1%) 100 – 104kJ
Carbohidratos	(4%) 4,70 – 5,88g
Azúcares	2,35 - 3,53g
Fibra dietaria	(9%) 2,80 – 3,40g
Grasas	0,18 - 0,20g
Proteínas	(2%) 2,80 – 1,01g
Energía	(1%) 100 – 104kJ

La producción mundial de berenjena, conforme a datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2021), se ubica en los 58,65 millones de toneladas, donde el 90% de la producción se concentra en Asia principalmente en China e India, seguida por Egipto, Turquía, Irán e Indonesia.

La producción de berenjena en Argentina, si bien se trata de un cultivo menor, está disponible a lo largo de todo el año en el mercado local. No se dispone de datos actualizados, pero según se reporta para el Censo Nacional Agropecuario del año 2002, Argentina cuenta con una superficie cultivada de 1254,3 hectáreas a campo y 28,9 bajo cubierta. Esto permite estimar una producción superior a las 30.000 toneladas anuales. Las principales provincias productoras son Buenos Aires 23%, Santa Fe 17%, Salta 17,5%, Córdoba 7,5%, Jujuy 6,8%, Mendoza 6,8% y Formosa 4,3%. Su cultivo se extiende también al resto de las provincias, aunque en menor medida (SAGPyA, 2007).

Las berenjenas se cosechan a mano. En ocasiones se utilizan guantes de tela de algodón. Se puede desprender de la planta cortando el pedúnculo alrededor de media a una pulgada sobre el cáliz de la fruta. Al ser cosechadas se deben cumplir ciertos parámetros de clasificación, descartando las frutas consideradas como no comerciables por no cumplir con las exigencias mínimas de calidad del mercado, bien sea por madurez excesiva, deformidades u otros tipos de daños o defectos severos, o por descomposición. La clasificación inicial durante la cosecha también es importante para las frutas que se van a llevar a un centro de clasificación y empaque, para reducir la cantidad de frutas transportadas que luego tendrían que ser descartadas en dicho lugar como frutas no comerciales, generando así una cantidad importante de residuos vegetales desechados (Martínez et al., 2006).

I.1.10. Residuos de la cosecha y del procesamiento del maíz (*Zea mays* L.): aprovechamiento de las brácteas (chalias)

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta gramínea alta, anual. Es originario de Mesoamérica y existe diversidad de la especie a lo largo de la cordillera de los Andes, desde México hasta la Región Andina de América del Sur.

El maíz es una fuente de alimento esencial, en particular en zonas rurales, donde el acceso a la tecnología y variedades mejoradas es limitado. A fines del siglo XV el maíz fue introducido en Europa, donde se convirtió en un factor clave de la alimentación humana y animal. Debido a su gran productividad y adaptabilidad, se extendió rápidamente en todo el planeta, y hoy se desarrolla en todos los continentes, donde ocupa la tercera posición en cuanto a producción total de cereales, detrás del arroz y del trigo. Además, se ha ubicado en la base fundamental de la producción agropecuaria y de sus subproductos (Ullah et al., 2022).



Figura I.1.17 Maíz (*Zea mays L*)

En la **Tabla I.1.2** puede verse su composición. Posee un alto valor nutritivo, contiene aproximadamente un 72% de almidón, un 10% de proteína y un 4% de grasa, lo que proporciona una densidad energética de 365Kcal/100g. El maíz proporciona muchas de las vitaminas B y minerales esenciales junto con la fibra y es, en general, una fuente pobre de calcio, ácido fólico y hierro. Los componentes bioactivos presentes son diversos e incluyen carotenoides con efectos antioxidantes como la luteína y la criptoxantina y, además, fitoesteroles con efectos hipocolesterolemiantes como el β -sitoesterol, y componentes con efectos fisiológicos o nutricionales contrapuestos, como el ácido fítico (Ullah et al., 2022).

Tabla I.1.2 Concentración de componentes mayoritarios de la parte comestible del maíz (Rouf Shah et al., 2016).

Componentes	Cada 100g	Componentes	Concentración (mg/100g)
Humedad	10,23g	Carotenoides	
Hidratos de carbono	71,88g	Caroteno	2,2
Proteínas	8,84g	Xantófilas	2,07
Grasas	4,57g	Luteína	1,5
Fibra	2,15g	Zeaxantina	0,57
Cenizas	2,33g	Compuestos fenólicos	
Minerales	1,50g	Ácidos ferúlicos	174
Fósforo	348mg	Antocianinas	141,7
Sodio	15,9mg	Fitoesteroles	14,83
Azufre	114mg	Sitosterol	9,91
Calcio	10mg	Estigmasterol	1,52
Hierro	2,3mg	Campesterol	3,4
Potasio	286mg		
Magnesio	139mg		
Cobre	0,14mg		
Tiamina	0,42mg		
Vitamina C	0,12mg		
Riboflavina	0,10mg		

Actualmente, la producción total mundial de maíz es de aproximadamente 1099,6 millones de toneladas, donde Estados Unidos, China, México, Francia, Brasil, Ucrania, India, Argentina, Canadá, Sudáfrica, Italia e Indonesia producen el 79%. En todo el mundo, entre el 60 y el 70% de la producción de maíz se utiliza comercialmente como alimento para animales y el otro 30-40% se utiliza para la producción de alimentos para el consumo humano (Saeed et al., 2021).

El maíz en Argentina se cultiva principalmente en el norte y sureste de la provincia de Buenos Aires, sur de Santa Fe, sur de Córdoba y norte de La Pampa. Cabe señalar que, dado el avance tecnológico sobre la genética del maíz en las últimas décadas, se logró que éste sea el cultivo con mayor aumento del rendimiento en los últimos 30 años. La gran variedad de insumos utilizados en su producción, contribuyen a que sus rendimientos continúen en constante incremento (**Figura I.1.18**) (Presello et al., 2022).

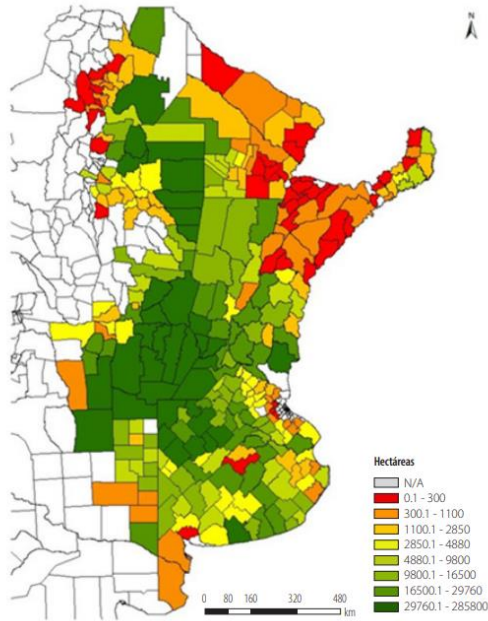


Figura I.1.18 Mapa de cultivos de maíz en Argentina (Presello et al., 2022).

A partir de la gran cantidad de biomasa que se produce mediante el cultivo del maíz, aproximadamente el 50% de la misma es cosechada para su consumo en forma de grano. El residuo corresponde a diversas partes de la planta tales como las brácteas, cuya proporción dependerá primordialmente de la variedad, nivel de fertilización y tipo de cultivar.

Se considera que un cultivo de maíz de grano destinado a la molienda produce entre 20 a 35 toneladas de residuos agroindustriales por hectárea, mientras que el cultivo de maíz dulce para consumo directo genera entre 16 a 25 toneladas de residuos agroindustriales por hectárea (Ruiz Diaz et al., 2008), lo que resulta en un gran volumen de residuos tras la remoción de los granos, estimándose 75 millones de toneladas por año, a nivel mundial.

Los residuos postcosecha presentan dos problemas fundamentales: la considerable cantidad de desechos generados y la consiguiente contaminación ambiental, lo que resulta en la pérdida significativa de compuestos valiosos para la industria. Además, la disposición y eliminación de estos residuos representan costos elevados para los productores. El aprovechamiento de estos desechos con el fin de obtener productos de valor, como las fibras dietarias y los compuestos antioxidantes, se presenta como una alternativa de gran interés para productores, industrias y consumidores.

I.2. Objetivos de la tesis

Objetivo principal

Cada año existe una gran generación de residuos postcosecha que provienen de la producción del maíz y de la berenjena, los cuales poseen compuestos químicos de interés, por lo cual se plantea como objetivo general de esta tesis:

- El aprovechamiento de los residuos obtenidos del maíz, en particular las brácteas, y del cáliz, cáscara y pulpa de la berenjena para la obtención de biocompuestos funcionales útiles como aditivos en la formulación de alimentos.

Capítulo I

Objetivos principales

- Obtención de polvos a partir de la cáscara, cáliz y de la pulpa de los frutos de la berenjena desechados por no cumplir los parámetros para su comercialización.
- Obtención de polvo a partir de las brácteas del maíz, las cuales son desechos que genera su consumo.

Objetivos secundarios

- Evaluar las propiedades físicas y la composición química del polvo de la cáscara y del cáliz de la berenjena.
- Evaluar las propiedades físicas y composición química del polvo de la pulpa de la berenjena.
- Evaluar propiedades físicas y composición química del polvo de las brácteas del maíz.

Capítulo II

Objetivos principales

- Extracción de pectinas a partir de los polvos obtenidos de las brácteas del maíz, mediante técnicas amigables con el ambiente.
- Extracción de pectinas a partir de los polvos obtenidos de la cáscara, cáliz y pulpa de los frutos de la berenjena, mediante técnicas amigables con el ambiente.

Objetivos secundarios

- Desarrollar una técnica de extracción de pectinas que involucre el uso de ultrasonido de alta potencia (US) como pretratamiento para desintegrar la microestructura de la pared celular, en combinación con una posterior extracción adecuada según la composición química de cada tejido.
- Evaluar como posterior extracción el uso de solución acuosa de carbonato de sodio (1M) como extractante de la pectina de la cáscara, cáliz y pulpa de frutos de berenjena.
- Evaluar como posterior extracción el uso de solución acuosa de hidróxido de sodio (0,1M) seguido de hidrólisis enzimática con celulasa para obtener la pectina de las brácteas del maíz.
- Determinar el rendimiento de los procedimientos aplicados.
- Caracterizar químicamente y determinar los pesos moleculares de las fracciones pécticas aisladas.
- Caracterizar el comportamiento reológico de las fracciones pécticas aisladas.
- Evaluar la capacidad antioxidante y el perfil de compuestos antioxidantes coextraídos en las fracciones pécticas obtenidas de los polvos de la berenjena.

Capítulo III

Objetivo principal

- Evaluar la funcionalidad de los polvos y de las pectinas obtenidos de la berenjena como aditivos antioxidantes y modificadores de la textura en alimentos.

Objetivos secundarios

- Desarrollar un queso vegano untable de castañas de cajú utilizando los polvos de la berenjena como aditivos, evaluando los cambios en las propiedades reológicas y la eficiencia antioxidante durante el almacenamiento (30 días).
- Evaluar las pectinas extraídas de la berenjena como aditivo antioxidante en leche fluida entera mediante su exposición a la radiación UV-C.

Polvos de fibras a partir de residuos vegetales: Brácteas de maíz y berenjenas

I.3. Materiales y Métodos

I.3.1. Reactivos

Los reactivos fueron de grado analítico marca Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE.UU.) y Merck Química (Argentina). Los estándares de α -caroteno y β -caroteno, luteína; α -, β - y γ -tocoferoles, retinol, seroalbúmina bovina (BSA Protein Standard) y ácido D-galacturónico fueron marca Sigma-Aldrich (EE.UU.). El etanol y metanol grado HPLC y grado analítico fueron provistos por Sintorgan (Argentina). Se usó agua desionizada (Milli-QTM, EE. UU.).

I.3.2. Preparación de la muestra

En el presente trabajo se utilizaron brácteas de maíz (*Zea mays*) y frutos de berenjenas (*Solanum melongena*) provistos por verdulerías locales.

Las brácteas del maíz fueron lavadas con agua potable, luego fueron cortadas y secadas sobre bandejas de acero inoxidable, en una estufa con convección forzada de aire a 55°C durante 4h con el fin de lograr un secado completo.

Las berenjenas enteras fueron lavadas con detergente y enjuagadas con agua potable, luego se separaron el cáliz y la cáscara del fruto, obteniéndose el resto de la berenjena (pulpa), la cual fue cortada longitudinalmente en fetas delgadas. El secado de todos estos tejidos se realizó separadamente sobre bandejas de acero inoxidable cubiertas con tul sintético, en una estufa con convección forzada de aire a 40°C durante 4h con el fin de lograr un secado completo.

I.3.3. Obtención de los polvos

I.3.3.1. Obtención del polvo de las brácteas del maíz (RIA-PB)

Las brácteas secas, quebradizas, del maíz fueron cortadas transversalmente con tijera en tiras de no más de 2cm de ancho, aproximadamente, y luego molidas empleando un molino de corte de alto rendimiento (SM 300, Retsch, Alemania) provisto de un tamiz con malla de 500 μ m. El polvo resultante fue fraccionado por tamaño de partícula. Para ello se utilizó una serie de tamices con mallas ASTM de 840, 420, 210, 105, 53 y 25 μ m ajustados sobre un soporte vibratorio (Retsch, Alemania). Cada fracción recuperada fue colocada en bolsas de Cryovac herméticamente selladas al vacío y al resguardo de la luz, utilizando para este trabajo la fracción del polvo que quedó retenida entre los 210 μ m (PB).

Posteriormente se obtuvo el residuo insoluble en alcohol (RIA) según Bernhardt et al. (2019). Para ello, una masa conocida de PB fue extraída con agua desionizada en una proporción de 1:100 (p/v) a temperatura ambiente (20°C) por 24h con agitación magnética. Luego, se filtró, se recuperó el sobrenadante y el precipitado, separado y secado fue luego pesado para calcular la pérdida de sustancias solubles en agua. Este precipitado deshidratado fue seguidamente extraído con etanol 80% v/v en una proporción de 1:9 (p/v), para lo cual se llevó la mezcla a ebullición durante 30min con agitación magnética bajo campana. Luego se filtró y se repitió el mismo procedimiento una vez más. A continuación, el residuo sólido finalmente obtenido fue lavado tres veces con abundante etanol (95% v/v) y se lo dejó secar bajo campana por 24h para la evaporación total del etanol. Posteriormente fue congelado en freezer (-20°C) y luego se agregó nitrógeno líquido al momento de entrar al liofilizador (Christ, Alemania; bomba de vacío Pfeiffer, Alemania). El polvo obtenido fue pesado y denominado RIA-PB, el cual fue envasado en bolsa de Cryovac y sellada al vacío, manteniéndolo al resguardo de la luz.

I.3.3.2. Obtención del polvo de la cáscara y cáliz de la berenjena (P-CC)

Los trozos secos de la cáscara y los cálices deshidratados de la berenjena fueron molidos conjuntamente en un procesador de alimentos (Moulinex FR6001, 700W, Argentina). El polvo

obtenido fue homogenizado, siendo entonces denominado P-CC, el cual fue envasado en bolsa de Cryovac y sellada al vacío, manteniéndolo al abrigo de la luz a -20°C hasta su uso.

Para determinar la distribución del tamaño de partícula, un peso dado de P-CC fue fraccionado mediante una serie de tamices con mallas ASTM de 840, 420, 210, 105, 53 y 25µm ajustadas sobre un soporte vibratorio (Retsch, Alemania). Se pesó la cantidad de polvo retenida entre dos mallas sucesivas, calculando luego el porcentaje.

I.3.3.3. Obtención del polvo de Pulpa de berenjena (P-P)

Las fetas deshidratadas, quebradizas, de la pulpa de la berenjena fueron molidas en un procesador de alimentos (Moulinex FR6001, 700W, Argentina). El material obtenido fue denominado P-P, el cual fue envasado en bolsa de Cryovac y sellada al vacío, manteniéndolo al abrigo de la luz a -20°C hasta su uso.

Para determinar la distribución del tamaño de partícula, un peso dado de P-CC fue fraccionado mediante una serie de tamices con mallas ASTM de 840, 420, 210, 105, 53 y 25µm ajustadas sobre un soporte vibratorio (Retsch, Alemania). Se pesó la cantidad de polvo retenida entre dos mallas sucesivas, calculando luego el porcentaje.

I.3.4. Propiedades de Hidratación

I.3.4.1. Capacidad de hinchamiento (SC) y de atrapamiento de agua (WHC)

Para determinar la capacidad de hinchamiento (*Swelling Capacity*, SC), se pesaron aproximadamente 0,0800g del polvo (RIA-PB, P-CC o P-P) en balanza analítica y se lo colocó en un tubo de ensayo graduado de 10mL. A continuación, se agregaron 4mL de agua desionizada, utilizando una pipeta automática (Eppendorf, Alemania), cuidando de que se hidratara la totalidad del polvo, siempre en exceso de agua. Se tapó cada tubo con Parafilm (Bemis Co., EE.UU.) y se lo dejó en reposo por 18h a 25°C. Al cabo de este período, se leyó el volumen ocupado por la fibra

hidratada (mL) (Robertson et al., 2000; Raghavendra et al., 2004). Esto permitió calcular la SC mediante la siguiente ecuación:

$$SC \left(\frac{mL}{g} \right) = \frac{V_h}{ms} \quad (\text{Ecuación I.1.1})$$

Donde V_h es el volumen ocupado por la fibra hidratada y ms es el peso de la muestra seca.

Para la determinación de la capacidad de absorción de agua (*Water holding capacity*, WHC), el sobrenadante fue removido por decantación y filtración sobre filtro de fibra de vidrio (Schleicher & Schuell, Alemania). Se registró el peso del residuo sólido hidratado (HRW) y posteriormente se lo liofilizó para poder obtener el peso del residuo seco (Robertson et al., 2000). Esto permitió calcular la WHC según la siguiente ecuación.

$$WHC \left(\frac{g_{agua}}{g_{muestra\ seca}} \right) = \frac{HRW - DRW}{DRW} \quad (\text{Ecuación I.1.2})$$

Donde HRW son los gramos del residuo hidratado y DRW son los gramos del residuo seco.

I.3.4.2. Capacidad de retención de agua (WRC)

Se realizó el mismo proceso utilizado para la determinación de SC. Luego de transcurridas 18h a 25°C, se centrifugó a 2000rpm por 30 minutos. El sobrenadante fue separado y el residuo hidratado fue entonces pesado (W_2) y luego, liofilizado y pesado nuevamente (R) (Robertson et al., 2000; Raghavendra et al., 2004). Se calculó así la WRC según la siguiente ecuación:

$$WRC \left(\frac{g_{agua}}{g_{muestra\ seca}} \right) = \frac{W_2 - R}{R} \quad (\text{Ecuación I.1.3})$$

Donde W_2 representa los gramos de agua retenida y R los gramos de residuo seco.

I.3.5. Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) de los polvos (RIA-PB, P-CC y P-P) fue evaluada por triplicado a 25°C en un higrómetro Decagon AquaLab (Serie 3, EE.UU.). La actividad de agua real (a_w°) fue determinada por extrapolación de la curva de calibración previamente realizada en el equipo, midiendo para ello la actividad de agua de soluciones saturadas de a_w conocida: LiCl ($a_w^\circ=0,110$), $MgCl_2$ ($a_w^\circ= 0,333$) y NaBr ($a_w^\circ=0,577$) a 25°C (Greenspan, 1977).

I.3.6. Determinación del color:

El color de los polvos (RIA-PB, P-CC y P-P) fue medido con un colorímetro (CM-600D, Minolta Co, Japón), usando una apertura de 1,5cm de diámetro, iluminante D65 y 2° de ángulo de observador. Las muestras fueron colocadas en un recipiente cilíndrico (2,5cm de diámetro y 1cm de altura) para evitar efectos de borde. Se registraron los valores de los parámetros o coordenadas de color en el espacio CIELab, esto es, L^* , a^* y b^* , donde L^* indica la luminosidad (entre 0%, negro, y 100%, blanco), a^* indica la cromaticidad sobre el eje horizontal que va del rojo (+) al verde (-) y b^* indica la cromaticidad sobre el eje horizontal que va desde el amarillo (+) hasta el azul (-). Las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

I.3.7. Microscopia del tejido fresco

Se cortaron muestras de aproximadamente 1 - 2mm³ de exocarpio (cáscara) de la berenjena y tejidos del mesocarpio (resto del fruto, sin cáliz ni cáscara). Se fijaron en 2,5% de glutaraldehído en solución tampón de fosfato 0,2M (pH 7,2) y post fijados en 1,5% p/p de OsO₄ en la misma solución buffer, seguido por fijación y contraste en 5% p/p de acetato de uranilo en agua destilada. La deshidratación se realizó en una serie de soluciones de acetona antes de ser incrustada en resina Durcupan (epoxi). A continuación, se cortaron secciones ultrafinas de 0,5 micras en un micrótopo Reichert Jung Ultracut E (Leica, Alemania) y se las tiñó con azul de toluidina para su observación en el microscopio óptico (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Alemania; Cámara digital Q-Color 5, Olympus, Japón; Software QCapture Pro, EE.UU.).

I.3.8. Caracterización química del Polvo

Para todas las determinaciones espectrofotométricas realizadas se utilizó un equipo Shimadzu UV-1800 (Japón).

I.3.8.1. Ácidos urónicos

Se pesaron cantidades de los polvos obtenidos (RIA-PB, P-CC o P-P) individualmente en vasos de precipitado y se les añadió ácido sulfúrico al 72% (p/p) con la ayuda de una varilla de vidrio. Luego, se ajustó la concentración a 1M de ácido sulfúrico mediante la adición de agua desionizada. La mezcla se homogeneizó con la varilla de vidrio y se la sometió a hidrólisis a 100°C durante 2,5 horas, siguiendo la metodología de Ng et al. (1998). Las suspensiones resultantes se enfriaron y el residuo obtenido fue separado por centrifugación a 8000rpm durante 10 minutos a 6,0°C utilizando una centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R, Alemania), mientras que, el sobrenadante fue neutralizado hasta alcanzar un pH de 5-7.

El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar el contenido de ácidos urónicos. El contenido de ácidos urónicos se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991). Para ello, se tomó una alícuota de sobrenadante y se mezcló con agua desionizada. Se añadió una solución de ácido sulfámico-sulfamato de potasio 4M (pH 1,6), seguido de la adición H₂SO₄ concentrado (98%) con Na₂B₄O₇·10H₂O 0,075M. La solución resultante se calentó a 100°C durante 20 minutos en un baño de agua con los tubos tapados. Posteriormente, los tubos se colocaron en un baño de hielo para enfriar rápidamente y se añadió m-hidroxidifenilo al 0,15% (p/v) disuelto en NaOH al 0,5% (p/v). La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex y se midió la absorbancia a 525nm. Para la cuantificación se realizó la curva de calibración utilizando ácido D-galacturónico como estándar.

Por otro lado, al residuo obtenido se le realizaron lavados sucesivos mediante la re-suspensión del residuo en un mínimo volumen de agua desionizada, seguido de agitación con un vórtex (IKA, Alemania) y centrifugación, hasta alcanzar un pH entre 5 y 7. El residuo resultante luego del último lavado fue recuperado, congelado y luego liofilizado. El residuo seco fue entonces pesado para así calcular el contenido de **celulosa + lignina** en cada polvo.

I.3.8.2. Hidratos de carbono no celulósicos

Se siguió la misma metodología utilizada en la **sección I.3.8.1**. En el sobrenadante final neutralizado, el cual contiene las pectinas y las hemicelulosas hidrolizadas, se realizó la determinación del contenido total de polisacáridos no celulósicos por el método colorimétrico del fenol-sulfúrico según la técnica de Dubois et al. (1956). Para ello, se tomó una alícuota del sobrenadante y se lo mezcló con agua desionizada. Se añadió una solución de fenol (80% p/p), se la homogeneizó y luego se añadió solución concentrada de H₂SO₄ (98%). La solución fue dejada hasta que se enfriara a temperatura ambiente y se la homogeneizó nuevamente. Finalmente se midió la absorbancia a 490nm. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración utilizando D-glucosa como estándar.

I.3.8.3. Lignina

Para realizar esta determinación, se siguió el procedimiento previamente mencionado (**sección I.3.8.1**) pero con la variación de que cada polvo (RIA-PB, P-CC y P-P) fue sometido a hidrólisis inicial mediante la adición de ácido sulfúrico al 72% (p/p), homogenizando la mezcla con una varilla de vidrio y dejando en contacto durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, se añadió agua desionizada en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 1M de ácido sulfúrico, agitando la mezcla con la varilla de vidrio. Inmediatamente después, la suspensión resultante fue calentada en un baño de agua a 100°C durante 2,5 horas, siguiendo el procedimiento detallado en la **sección I.3.8.1** (Ng et al., 1998).

El sobrenadante obtenido al final del proceso fue ajustado a un pH de 5-7 y se tomó una alícuota para someterla al método colorimétrico de Dubois et al. (1956) y así determinar el contenido total de polisacáridos hidrolizados disueltos (**carbohidratos totales**). El residuo obtenido después de varios lavados hasta alcanzar un pH de 5-7, fue liofilizado, pesado y corresponde al contenido de **lignina** de la fracción analizada. Restando este contenido de **lignina** (expresado en %) al contenido de **celulosa + lignina** (expresado en %) obtenido al pesar el residuo en la **sección I.3.8.1**, se determinó el contenido (%) de **celulosa** en cada polvo.

I.3.8.4. Determinación de Proteínas

El contenido de proteínas en cada polvo (RIA-PB, P-CC y P-P) fue determinado mediante el método de Lowry et al. (1951). Para esta determinación, se empleó seroalbúmina bovina (BSA Protein Standard; Sigma-Aldrich, EE. UU.) como proteína patrón, la cual se disolvió en solución salina. A partir de esta solución, se preparó una curva de calibración utilizando diversas alícuotas. Para las muestras, se mezcló una alícuota de la solución sobrenadante de la hidrólisis obtenida durante la determinación de lignina (**sección I.3.8.3**) con agua y el Reactivo A (Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1N; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en H_2O ; $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 1% en H_2O en relación 10:0,1:0,1). La mezcla se agitó mediante un vórtex y se la dejó durante 20 minutos a 37°C . Posteriormente, se añadió el Reactivo B (solución de Folin-Ciocalteu en agua en una proporción de 1:1), agitando nuevamente en vórtex. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 660nm. Los resultados se expresaron en porcentaje (g de proteína por cada 100g de polvo).

I.3.8.5. Azúcares Reductores

El contenido de azúcares reductores se determinó mediante el método colorimétrico de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944). Para ello, a una alícuota del extracto acuoso de cada uno de los polvos (RIA-PB, P-CC y P-P) se le añadió el reactivo de Somogyi, (solución saturada de Na_2CO_3 anhidro, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, CuSO_4 , NaHCO_3 y Na_2SO_4 anhidro en agua desionizada). Los tubos se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 15 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se incorporó el reactivo de Nelson (solución de molibdato de amonio, arsenito de sodio y H_2SO_4 en agua desionizada). La mezcla se agitó en vórtex y se la diluyó con agua desionizada. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 540nm. La cantidad de carbohidratos solubles reductores presentes fue determinada por dos curvas de calibración realizadas con una solución de D-galactosa (1mg/mL) y con una solución de D-glucosa (1mg/mL). Los resultados se expresaron como g de galactosa o de glucosa /100g de polvo.

I.3.8.6. Determinación del grado de metilación (DM)

El DM de los ácidos urónicos contenidos en cada polvo (RIA-PB, P-CC y P-P) fue determinado evaluando primero el contenido de metanol según el método colorimétrico reportado por Wood y Siddiqui (1971). Para ello, se realizó una saponificación inicial de una masa pesada del polvo con NaOH 1,5N en tubo de hemólisis con tapa a rosca, vortexeando. Simultáneamente, se preparó un blanco de muestra con igual volumen de NaOH 1,5N. Luego de 1h, cada muestra contenida en su tubo respectivo y el blanco fueron acidificados agregando H₂SO₄ 5,5N, tapado con la tapa a rosca y homogenizando con vórtex. A cada tubo se le agregó solución de KMnO₄ 2% (p/v) y, a continuación, las muestras fueron agitadas en vórtex y enfriadas en un baño de agua con hielo durante 15 minutos. Luego se agregó una alícuota de una solución de AsO₃Na₃ (arsenito de sodio) 0,5M en ácido sulfúrico 0,12N, seguido del agregado de agua desionizada; se agitó en vórtex y se dejó reaccionar durante 1h a temperatura ambiente. Luego de este tiempo se agregó solución de 2,4-pentadiona 0,02M disuelta en solución buffer de acetato de amonio. Para la reacción colorimétrica, se utilizó un estándar de metanol en H₂SO₄ 1N. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412nm. El DM fue calculado como la relación porcentual entre el número de moles de metanol y el número de moles de ácidos urónicos contenidos (sección I.3.8.1) en cada polvo.

I.3.8.7. Determinación del grado de acetilación (DA)

El contenido de acetilos de cada polvo (RIA-PB, P-CC y P-P) fue determinado según el método colorimétrico reportado por Naumenko y Phillipov (1992). Cada polvo, individualmente, fue tratado con una mezcla 1:1 de clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl) 0,125M e NaOH 0,25M, agitándolo durante 1 hora. A una alícuota de la solución resultante se le añadió HNO₃ 0,125M y Fe(NO₃)₃ 0,01M, mezclándose por agitación. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 10 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 6000 x g para separar cualquier gel que pudiera haberse formado de la solución. Se midió la absorbancia de la solución coloreada finalmente obtenida a 495nm. Para la curva de calibración se utilizó como estándar pentaacetato de glucosa. El DA fue calculado como la relación porcentual del número de moles de acetilo y el número de moles de ácidos urónicos contenidos en cada polvo (**sección I.3.8.1**).

I.3.9. Capacidad Antioxidante de los polvos de P-P y P-CC

I.3.9.1. Ensayo del FRAP

La capacidad de la muestra para reducir al Fe(III) fue determinada mediante el método FRAP. Para cada polvo de berenjena (P-CC y P-P), se agregó metanol y se mantuvo en agitación constante durante 30min, en baño de agua a 37°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 5000rpm durante 20 minutos a 6,0°C, utilizando una centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R, Alemania). Se agregó el reactivo de FRAP al sobrenadante metanólico separado y se midió el aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 595nm después de 30 minutos de iniciada la reacción. La curva de calibración se elaboró utilizando una solución de ácido L-(+)-ascórbico (AA) en metanol. Los resultados se expresaron en miligramos de AA por cada 100 gramos de polvo.

I.3.9.2. Ensayo del DPPH

Se determinó la capacidad para capturar radicales libres de cada polvo de berenjena (P-CC y P-P), mediante el uso del reactivo DPPH. Se realizó la extracción en las muestras igual que en la sección **I.3.9.1** y se agregó una solución de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) en metanol. Se mantuvieron los tubos en agitación constante durante 30min en baño de agua a 37°C y se midió la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 517nm. La curva de calibración se elaboró utilizando una solución de AA en metanol. Los resultados se expresaron en miligramos de AA por cada 100 gramos de polvo.

I.3.10. Determinación de carotenoides y tocoferoles en los polvos de berenjena P-CC y P-P

Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo iluminación tenue y a una temperatura ambiente de 20°C para prevenir la degradación de los carotenoides y tocoferoles. Inicialmente, se llevó a cabo una saponificación de la muestra, para lo cual se pesaron individualmente los polvos de berenjena (P-CC y P-P) y se colocaron en tubos de vidrio. Posteriormente, se añadió una solución buffer de fosfato de sodio pH 7,7 y se agitó con un ultraturrax hasta obtener una solución homogénea. A esta solución se le agregó una solución de pirogalol al 1% en etanol absoluto de

grado HPLC. Los tubos fueron tapados, agitados en vórtex y luego incubados a 70°C durante 2min; una vez finalizado este paso, se colocaron en un baño de hielo y se añadió una solución de KOH 12N. Seguidamente, se colocaron en un baño de agua a 70°C durante 30min con agitación constante. Posteriormente, los tubos se enfriaron en un baño de agua con hielo, se les agregó agua desionizada y hexano de grado HPLC, y se agitaron en vórtex durante 5min.

La separación y cuantificación se realizó por HPLC en fase reversa. El sistema HPLC (Thermo Separation Products, EE.UU.) estaba equipado con una bomba cuaternaria (modelo P4000), un desgasificador de membrana al vacío y un auto muestreador (AS4000), con un inyector con *loop* de 100µL conectado a una columna Alltima C18 (250mm x 4,6mm), de tamaño de partícula de 5µm (Alltech, EE.UU.). Se usó un detector de arreglo de diodos (UV6000LP Spectrasystem; Thermo Separation Products, EE.UU.) a 325 y 445nm para la detección de carotenoides. La determinación de los tocoferoles se llevó a cabo mediante un detector de fluorescencia (FL 3000, EE.UU.) a 296nm (excitación) y 330nm (emisión). La fase móvil consistió en una mezcla isocrática de etanol:metanol (60:40) con un flujo de 1mL/min. Las curvas de calibración se realizaron con estándares externos preparados en el momento, en etanol absoluto grado HPLC.

I.3.11. Determinación del contenido de polifenoles en los polvos de berenjena P-CC y P-P

I.3.11.1. Extracción y cuantificación de polifenoles extraíbles mediante HPLC-DAD

Para determinar el contenido de polifenoles extraíbles de cada polvo (P-CC y P-P) se sonicaron (Baño ultrasónico TESLA, Argentina) separadamente P-P o de P-CC durante 15min en una solución de acetona/agua/ácido acético, 70/29,5/0,5 (v/v/v). Cada solución fue centrifugada a 1765 x *g* durante 10min. Luego la acetona fue evaporada a 35°C bajo vacío. El residuo acuoso se filtró a través de un cartucho de extracción en fase sólida activado Sep-Pack C18 (Waters, Milford, MA, EE.UU.). Se lavó luego la columna repetidamente por elución de agua y los compuestos fenólicos retenidos fueron posteriormente eluidos por agregado de metanol. Este extracto metanólico eluido fue filtrado luego a través de una membrana de nylon de 0,45µm e inyectado manualmente (inyector Rheodyne de 20µL., EE.UU.) en un equipo HPLC Waters 1525 (Milford, EE.UU.) provisto

de un sistema de bombas binarias (modelo M09DG2 455M, Waters, Milford, EE.UU.), un desgasificador (modelo M09DG2 455M, Waters, Milford, EE.UU.) y un detector de arreglo de diodos (DAD) (modelo A10998 660A, Waters, Singapur). Se utilizó una columna Luna C18 (250x4mm, 5µm de tamaño de partícula, Phenomenex, Torrance, EE.UU.). Como fase móvil se utilizó una solución acuosa de ácido fórmico al 1% v/v (A) y metanol puro (B), usando un flujo de 0,8mL/min. Se usó un gradiente lineal, comenzando con un 10% de B hasta alcanzar el 70% en 75min. Los espectros fueron registrados en el intervalo de 280 - 560nm y se analizó a 280, 320, 360 y 520nm de longitud de onda correspondientes a los máximos de absorción de los polifenoles.

I.3.11.2. Identificación de fenoles mediante HPLC-ESI-microTOF/MS y HPLC-PAD

Los análisis HPLC-ESI-microTOF/MS y HPLC-PAD fueron realizados con un equipo Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, Wilmington, EE. UU.). Los datos espectrales de todos los picos se acumularon en el rango de 200 a 800nm. El equipo de HPLC se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución Bruker microTOF-QII (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EE. UU.) con fuente de ionización por electrospray (ESI). Los datos se adquirieron y procesaron utilizando un Bruker Compass Data Analysis (versión 4.2, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EE. UU.). Se utilizó una columna YMC-Triart C18 (150mm x 2mm, tamaño de partícula 3µm, YMC, Japón), con una fase móvil de ácido fórmico al 1% v/v en agua (A) y metanol puro (B), 0,14mL/min de caudal y un volumen de inyección de 20µL. Se utilizó un gradiente lineal, comenzando con 10% de B hasta llegar a 20% después de 260min. Los picos se identificaron por medio de espectros UV, por los cromatogramas de iones extraídos de la corriente de iones en valores m/z correspondientes a los iones $[M - H]^+$ de los compuestos individuales investigados y por su fragmentación.

I.3.11.3. Cuantificación de Compuestos fenólicos unidos covalentemente mediante HPLC-DAD

Los compuestos fenólicos esterificados fueron determinados siguiendo el método descrito por Vaidyanathan y Bunzel (2012). Se liberaron por hidrólisis de cada polvo de berenjena (P-P y P-CC) con NaOH 2M mediante agitación al vacío en la oscuridad, a 4°C durante 2h, los compuestos fenólicos esterificados. Luego, la muestra fue ajustada a pH 1,5 por el agregado de suficiente

volumen de HCl 6M. A continuación, se realizaron tres extracciones empleando acetato de etilo cada vez. Se reunieron las fases orgánicas y se evaporó el acetato de etilo hasta sequedad bajo presión reducida. Finalmente, el residuo fue reconstituido en metanol y filtrado a través de una membrana de 0,45 micrones de poro para luego ser analizado utilizando HPLC-DAD de fase reversa y HPLC-ESI-MS/MS, con un flujo de 0,5mL/min y un gradiente lineal entre ácido fórmico 1% v/v en agua (A) y metanol puro (B), el cual aumentó durante 90min del 10% al 82% de metanol (B). Los espectros UV se registraron en el rango de longitud de onda de 200 - 800nm. La cuantificación se realizó utilizando ácido ferúlico como estándar externo. Estos análisis se realizaron por triplicado.

I.3.12. Evaluación de los efectos citotóxicos de los extractos polifenólicos de P-P y P-CC en células HepG2

I.3.12.1. Cultivo celular y condiciones de incubación

La línea celular derivada de hepatoblastoma humano (HepG2) fue cultivada en el medio Eagle modificado por Dulbecco y bajo en glucosa (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10%, 100UI/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomycin, y se mantuvo en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.

Para el ensayo de citotoxicidad, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo. Para las condiciones de incubación celular, se disolvieron 1,690mg de fenoles extraíbles de P-CC (sección I.3.11.1) con 250µL de DMSO y luego se diluyeron a una concentración de 0,676mg/mL con agua. Para el caso de los compuestos fenólicos extraíbles de P-P (sección I.3.11.1), se disolvieron 0,684mg con agua hasta una concentración final de 0,2736mg/mL.

Las células se incubaron durante 24h con diferentes concentraciones (5 - 500ppm) de ambas soluciones del extracto de P-CC o de P-P diluidos en agua.

I.3.12.2. Ensayo del MTT

La citotoxicidad de los compuestos fenólicos extraíbles de P-CC y de P-P (sección I.3.11.1) fue evaluada mediante el ensayo del MTT. Células HepG2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 24h. Luego, se incubaron con dosis que oscilaron entre 5 y 500ppm de los compuestos fenólicos mencionados (P-CC y P-P). Después de 24h, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con solución salina tamponada de fosfato (PBS). Luego, las células se incubaron durante 3 horas a 37°C con una solución madre de MTT (5mg/mL en PBS) por 100µL de medio en cada pocillo. Después de retirar 90µL de medio, se añadió un volumen de 100µL de ácido - isopropanol y se mezcló para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se midió en un lector de placas ELISA de microtitulación a 595nm. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de viabilidad de las células tratadas en comparación con el control negativo (células no tratadas). Esto se evaluó en tres ensayos independientes y se construyeron curvas de concentración-efecto para determinar la concentración que produce un 50% de citotoxicidad (CC₅₀).

I.3.13. Evaluación del efecto del ultrasonido sobre los polvos de berenjena (P-P y P-CC)

Para los tratamientos con US de los polvos de berenjena (P-P y P-CC) se empleó un procesador ultrasónico de alta potencia (Vibra-Cell VCX 750, salida de potencia neta: 750W, Sonics Materials Inc, EE. UU.) acoplado a una sonda de titanio con una punta plana de 13mm de diámetro. El equipo funciona a una frecuencia constante de 20kHz y se utilizó una amplitud del 80%. Se utilizó un vaso de precipitado de 250mL (vidrio de borosilicato, IVA, Argentina) de 70mm de diámetro interno y 95mm de altura que contenía 200mL de agua desionizada y 5,00g de polvo (P-CC o P-P). El líquido contenido en el vaso de vidrio alcanzó una altura de 58mm, mientras que la sonda fue sumergida hasta 20mm desde la superficie libre. Los tratamientos se realizaron por separado en P-CC y P-P durante 20min, trabajando con pulsos ultrasónicos de 5s "on" y 5s "off". El vaso fue colocado dentro de un recipiente de Telgopor para eliminar la dispersión del calor hacia el ambiente. La temperatura fue registrada a través de una termocupla de teflón conectada al dispositivo de US y fue ubicada a un lado de la pared del vaso de vidrio. Se registraron los valores de energía y de potencia mostrados por el equipo. La potencia (Ecuación I.3.4) y la energía realmente proporcionada (Ecuación I.3.5) fueron calculadas según las ecuaciones I.1.4 y I.3.5. Se calcularon luego la

intensidad de potencia (UI ; ecuación I.3.6) y la densidad de potencia (AED ; ecuación I.3.7) realmente provistas en el proceso, las cuales fueron respectivamente expresadas en W por unidad de área de la superficie emisora o sonda (W/cm^2) y en W por unidad de volumen de la muestra sonicada (W/cm^3).

$$P = m \cdot c_p \cdot \frac{dT}{dt} \quad \text{Ecuación (I.3.4)}$$

Donde:

P es la potencia (W), m es la masa de la muestra (g), c_p ($Jg^{-1}C^{-1}$) es la capacidad calorífica del solvente a presión constante, T es la temperatura ($^{\circ}C$) registrada a tiempo t (s) de la sonicación efectiva, y dT/dt es la velocidad de cambio de temperatura.

$$E = m \cdot c_p \cdot dT \quad \text{Ecuación (I.3.5)}$$

Donde:

E es la energía (J), m es la masa sonicada (g), c_p ($J.g^{-1}.C^{-1}$) es la capacidad calorífica del agua, dT es el diferencial de temperatura ($^{\circ}C$) registrada a tiempo t (s) de la sonicación efectiva.

$$UI = \frac{P}{A} \quad \text{Ecuación (I.3.6)}$$

$$AED = \frac{P}{V} \quad \text{Ecuación (I.3.7)}$$

Donde:

P es la potencia en (W), A es el área del transductor (m^2), V es el volumen de la muestra (cm^3).

I.3.14. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los polvos de berenjena (P-P y P-CC)

Para los controles sin tratamiento de US, se colocó cada polvo (P-P o P-CC) en agua (5g de polvo:200mL agua) con agitación magnética durante 20min, se filtró la solución, el residuo fue separado, congelado y liofilizado (Christ, Alemania; bomba de vacío Pfeiffer, Alemania). Para los polvos luego del tratamiento con US de la sección I.3.13, se centrifugó y se separó el residuo obtenido, se lo congeló y liofilizó (Christ, Alemania; bomba de vacío Pfeiffer, Alemania).

Para la caracterización morfológica, las muestras resultantes fueron colocadas en un soporte metálico circular y recubiertas con oro en una cámara a alto vacío. Posteriormente las muestras fueron colocadas en la cámara del FEI Quanta 250 FEG Scanning Electron Microscope (Thermo Fischer Scientific, EE.UU.). Las imágenes fueron adquiridas a alto vacío, a un voltaje de aceleración de 3kV y utilizando un detector ETD para electrones secundarios.

I.3.15. Análisis estadístico de los resultados

Los experimentos y las determinaciones químicas fueron realizados por triplicado. Los resultados se expresan como la media y el desvío estándar DS de n replicados. Las comparaciones de los resultados se realizaron por la prueba de ANOVA seguida del test de LSD (mínimas diferencias significativas) para las comparaciones múltiples. Los valores de CC_{50} se calcularon a partir de las curvas dosis – respuesta (concentración – efecto) obtenidas luego de la transformación logarítmica de las concentraciones y posterior regresión lineal. En los análisis se utilizó el software GraphPad Prism (versión 7, 2017, EE.UU.).

I.4. Resultados y Discusión

I.4.1. Tamaño de partícula de los polvos

La distribución de tamaños de partícula promedio para el polvo RIA-PB que se obtuvo a partir de las brácteas del maíz (PB) con etanol se puede observar en la **Figura I.4.1**. Se obtuvo una fracción mayoritaria de 52,5% p/p correspondiente a 210 μ m de diámetro medio, seguido de 29,6% p/p para 420 μ m de diámetro medio. Para los ensayos siguientes en esta investigación, se trabajó con la fracción de polvo de 210 μ m por ser la fracción más abundante y, además, para tener datos comparables con los resultados obtenidos por Bernhardt et al. (2019).

Por otro lado, los frutos de la berenjena que fueron descartados debido a su tamaño o imperfecciones fueron deshidratados a polvos constituidos por la cáscara y los cálices (P-CC) y por el resto del fruto (P-P), que incluía mesocarpio, placenta y núcleo. La distribución de tamaños de partícula promedio de los polvos obtenidos se puede observar en la **Figura I.4.2**. Se obtuvo una fracción mayoritaria de 29,6% p/p para P-CC correspondiente a 210 μ m de diámetro medio, seguido de 25,1% p/p para 105 μ m de diámetro medio y 23,6% p/p para 420 μ m de diámetro medio. Para P-P se obtuvo una fracción mayoritaria de 34,87% p/p correspondiente a 105 μ m, seguido de 29,0% p/p para 420 μ m y de 26,7% p/p para 210 μ m de diámetros medios. Ya que se observó una distribución proporcional del tamaño de partícula en las fracciones de los polvos entre 25% y 34%, se utilizaron los polvos enteros de P-CC y P-P para todo el trabajo.

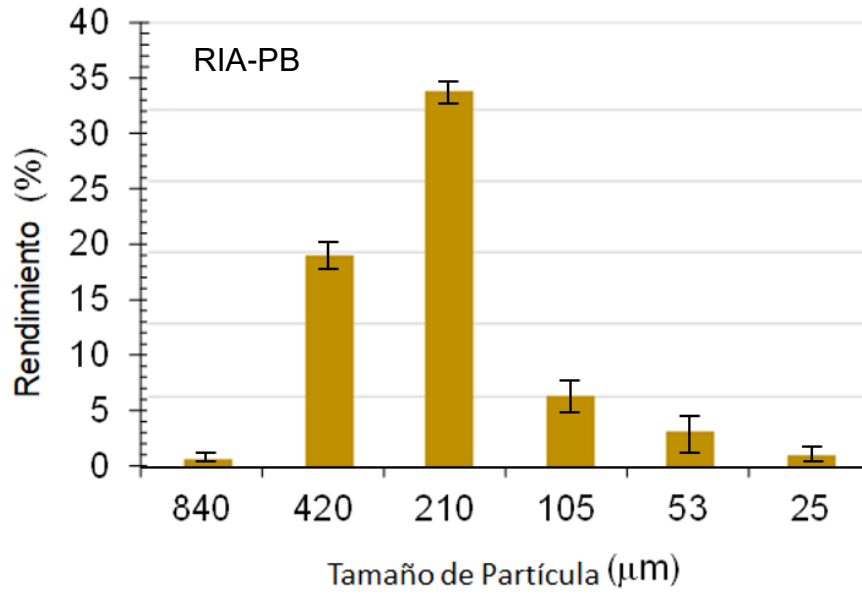


Figura I.4.1. Composición en tamaño de partícula promedio del polvo RIA-PB (residuo insoluble en etanol) obtenido de las brácteas del maíz. Las barras de error corresponden al desvío estándar ($n=3$).

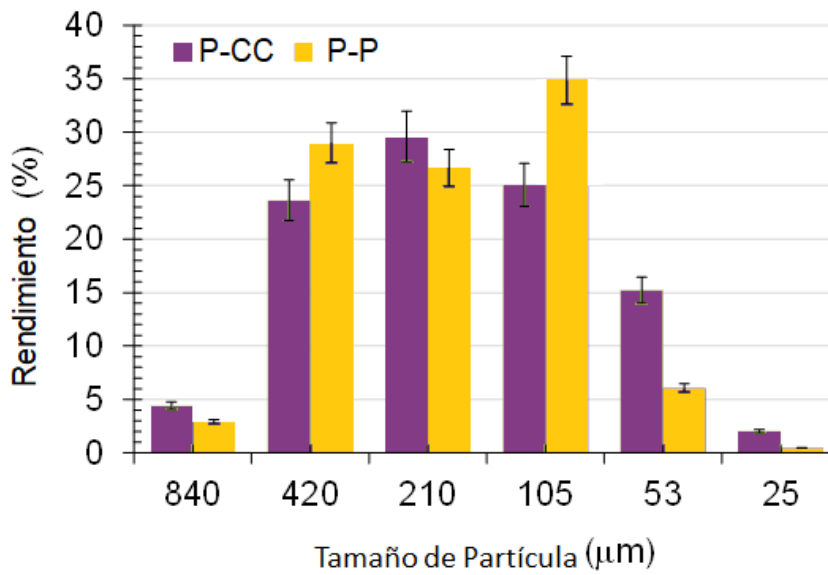


Figura I.4.2. Composición en tamaño de partícula promedio de los polvos obtenidos de la mezcla de cáscara y cáliz (P-CC) y del resto del fruto de la berenjena (P-P). Las barras de error corresponden al desvío estándar ($n=3$).

I.4.2. Color

Los parámetros de color L^* , a^* , b^* en la escala CIE-Lab indican la coordenada vertical de luminosidad, la coordenada rojo(+)/verde(-) y la coordenada amarillo(+)/azul(-), respectivamente.

RIA-PB presentó una luminosidad alta, del 77%, con valores de $a^* = -2,56$ y de $b^* = +26,7$ (Tabla I.4.1), correspondiendo a un color amarillo-verdoso (Figura I.4.3 A). En el caso de P-CC presentó una luminosidad neutra, del 52,7%, con valores de $a^* = -0,7$ y de $b^* = +13$ (Tabla I.4.1), correspondiendo a un color gris-verdoso (Figura I.4.3 B), mientras que P-P presentó una luminosidad ligeramente alta de $L^* 64\%$, con valores de $a^* = +4,1$ y $b^* = +24,7$, correspondiendo a un color ocre claro (Figura I.4.3 C).

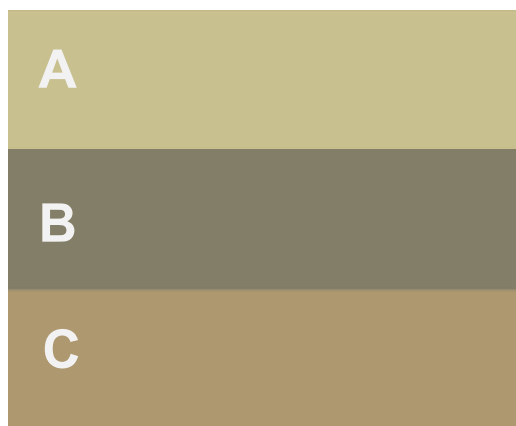


Figura I.4.3. Color según los parámetros de CIE-Lab obtenidos: (A) RIA-PB, (B) P-CC, (C) P-P.

I.4.3. Actividad de agua (a_w°)

La actividad de agua (a_w°) de RIA-PB fue de 0,287. Por otro lado, P-CC mostró una actividad de agua de 0,319, mientras que para P-P fue de 0,272. (Tabla I.4.1). Por lo tanto, estos polvos resultarán estables durante el almacenamiento a temperatura ambiente ya que los valores obtenidos son suficientemente bajos, y así evitan el crecimiento microbiano, la hidrólisis química, la actividad enzimática y las reacciones de pardeamiento (Vilgis, 2015).

Tabla I.4.1. Rendimiento^a, actividad de agua^b, parámetros de color CIE-Lab^b y composición química^b de los polvos obtenidos de cáscara y cálices (P-CC) y pulpa (P-P) de berenjena, así como de las brácteas del maíz, luego de secadas, molidas y extraídas con etanol (RIA-PB).

	P-CC^b	P-P^b	RIA-PB^b
Rendimiento ^a (%)	9,5 ± 0,6 ^A	7,1 ± 0,5 ^B	67,0 ± 0,3 ^C
Actividad de agua (a_w) ^o	0,319 ± 0,007 ^A	0,272 ± 0,003 ^B	0,287 ± 0,005 ^C
L^* (%)	52,7 ± 0,9 ^A	64±2 ^B	77±0,7 ^C
a^*	-0,7 ± 0,1 ^A	+4,1±0,3 ^B	-2,56±0,5 ^C
b^*	+13 ± 1 ^A	+24,7 ± 0,3 ^B	26,7±0,2 ^C
	g/100 g polvo		
Proteínas	9,3 ± 0,6 ^A	6,2 ± 0,5 ^B	13,2 ± 0,6 ^C
Azúcares reductores ^c	12,9 ± 0,8 ^A	21 ± 3 ^B	ND
Carbohidratos totales ^c	77 ± 3 ^A	72 ± 4 ^B	66,0 ± 0,6 ^C
Azúcares Neutros (NS) ^d	13 ± 2 ^A	30,1 ± 1 ^B	31,7± 0,3 ^C
Ácidos Urónicos (AU) ^e	23,9 ± 0,6 ^A	14,1 ± 0,7 ^B	4,5 ± 0,3 ^C
DM (% , molar)	27,2 ± 0,3 ^A	32,3 ± 0,4 ^B	8,6 ± 0,6 ^C
DA (% , molar)	18 ± 1 ^A	10,5 ± 0,7 ^B	ND
Celulosa	27,2 ± 0,3 ^A	6,8 ± 0,3 ^B	29,8 ± 0,6 ^C
Lignina	9,7 ± 0,6 ^A	12,1 ± 0,1 ^B	19,7 ± 0,3 ^C

^a El rendimiento para P-CC y P-P está reportado como g polvo /100g materia fresca, mientras que el rendimiento de RIA-PB está reportado como g de RIA-PB / 100g de brácteas secas y molidas.

^b Se informan las medias y el desvío estándar para n=3 (o n=10 para los parámetros de color). Mismas letras mayúsculas de superíndice, en una misma fila, indican resultados con diferencias no significativas ($p < 0,05$).

^c Expresado como D-glucosa.

^d Los NS se calculan como: NS = Carbohidratos totales - (ácidos urónicos + azúcares reductores)

^e Expresado como ácido D-galacturónico (peso molecular del ácido D-galacturónico menos un mol de agua = 176g/mol).

DM: grado de metilesterificación.

DA: grado de acetilación.

I.4.4. Composición química

Los rendimientos y la composición química de los polvos se resumen en la **Tabla I.4.1**. El residuo insoluble remanente de la extracción acuosa del polvo obtenido de las brácteas del maíz, una vez liofilizado, fue tratado con etanol 80% (v/v) hirviendo (**sección I.3.3.1**), obteniéndose de esta manera el RIA-PB con un rendimiento del 67% (g RIA-PB/100g PB). Dado que RIA-PB es el residuo insoluble en etanol obtenido de las brácteas secas del maíz, este polvo está compuesto por los polímeros de la pared celular, principalmente polisacáridos (66g/100g de RIA-PB) y, en menor proporción, proteínas (13,2g/100g de RIA-PB). Entre los polisacáridos se incluyen una baja proporción de pectinas, reveladas por el contenido de ácidos urónicos (AU) (4,5% respecto a RIA-PB), con un muy bajo grado de metilesterificación (8,6% en base molar) y, por otro lado, se observa un importante contenido de celulosa (29,8%). Dado el alto contenido de carbohidratos totales (66%) de RIA-PB (**Tabla I.4.1**), ello significa que un 31,7% corresponde a azúcares neutros (NS), principalmente de las hemicelulosas y en menor proporción del RG-I y RG-II de las pectinas. Bernhardt et al. (2019) determinó la composición de las hemicelulosas de pared celular de las brácteas del maíz, siendo mayoritariamente arabinoxilanos (26%) entrecruzados por ácido ferúlico (18,6mg/100g MPH) esterificado.

Otro componente encontrado en significativa proporción en RIA-PB es la lignina (19,7%; **Tabla I.4.1**), polímero polifenólico hidrofóbico, que constituye la pared celular secundaria de células vasculares y también sintetizado como respuesta de defensa.

Por otro lado, por deshidratación directa de los tejidos de la berenjena, se obtuvieron los polvos P-CC y P-P con un rendimiento del 9,5g y 7,1g de polvo por cada 100g de tejido fresco, respectivamente (**Tabla I.4.1**), por lo cual se detectaron azúcares reductores (12,9 y 21% en P-CC y P-P, respectivamente), esto es, azúcares simples provenientes del citoplasma celular. Estos componentes están entonces incluidos en el alto contenido de carbohidratos totales determinados en P-CC y P-P, de 77 y 72%, respectivamente. En consecuencia, por diferencia matemática, alrededor de 64,1 y 51%, respectivamente, corresponderían principalmente a los carbohidratos totales de los polisacáridos componentes de la pared celular que abarcan los ácidos urónicos de las pectinas, los azúcares neutros de los RG-I y RG-II y de las hemicelulosas, y la celulosa disuelta (**Tabla I.4.1**).

Se observó un mayor contenido de ácidos urónicos (AU) en P-CC, con 23,9g por cada 100g de polvo, en comparación con P-P, que tenía 14,1g por cada 100g de polvo. Estos ácidos urónicos corresponden a las cadenas de HGs, los cuales presentaron un bajo DM (27% y 32% molar para P-CC y P-P, respectivamente), al igual que un bajo DA (18% y 10% molar para P-CC y P-P, respectivamente). Mientras tanto, el contenido de azúcares neutros fue significativamente menor en P-CC, con 13g/100g de polvo, en comparación con P-P, que tenía 35g/100g de polvo.

El contenido de celulosa fue significativamente mayor ($p<0,05$) en P-CC, con un 27,2%, en comparación con P-P, que tenía un 6,8% (**Tabla I.4.1**). Además, el contenido de lignina fue ligeramente menor en P-CC, con un 9,7%, en comparación con P-P, que tenía un 12,1%. Esto sugiere que P-CC contiene una mayor proporción de polímeros hidrofílicos como pectinas y celulosa, mientras que en P-P está incluida la llamada placenta con las pequeñas semillas, lo que resultó en un mayor contenido de lignina (**Tabla I.4.1**). Estos resultados incidirán en las propiedades de hidratación de estos polvos, P-CC y P-P.

El contenido de proteínas fue de 9,3 y 6,2g/100g polvo P-CC y P-P, respectivamente (**Tabla I.4.1**). Parte de las proteínas determinadas, junto con los azúcares reductores encontrados (**Tabla I.4.1**), son de origen intracelular.

I.4.5. Propiedades de hidratación

Las propiedades de hidratación son características que se evalúan en los polisacáridos insolubles. La Capacidad de Hinchamiento (SC) se determina después de sumergir la matriz de fibra seca en exceso de agua y esperar 18h para alcanzar el equilibrio, lo que indica cuánto se expande la matriz polimérica o fibra al absorber toda el agua posible. La Capacidad de Atrapamiento de Agua (WHC) se define como la cantidad de agua retenida por las fibras sin aplicar fuerzas externas, excluyendo la influencia de la gravedad y la presión atmosférica. Este parámetro también abarca la proporción de agua débilmente asociada a la fibra. La Capacidad de Retención de Agua (WRC) se refiere a la cantidad de agua que permanece en la fibra después de aplicar una fuerza externa como la centrifuga. Esta capacidad está relacionada con el agua fuertemente unida (Raghavendra et al., 2004).

Se determinaron las propiedades de hidratación de P-CC y P-P. Los resultados se muestran en la **Figura I.4.4**. La SC del polvo de fibra después de 18h de equilibración en exceso de agua fue de 8,1 y 10,6mL por gramo de P-P y P-CC, respectivamente (**Figura I.4.4**). Bernhardt et al. (2019) reportó que la SC del polvo RIA-PB fue de 12,5mL por gramo de polvo. Estos valores son menores en comparación con los obtenidos a partir de tejidos vegetales con mayores proporciones de pectinas y bajos contenidos de lignina como el polvo de zanahoria, con valores de SC entre 27 y 36mL/g (Idrovo Encalada et al., 2016) y las fibras de cereza dulce con una SC de 16,6mL/g (Aramburu et al., 2020).

Los valores de WHC obtenidos fueron de 8 y 10,2g de agua/g de P-P y P-CC respectivamente, mientras que los valores de WRC fueron de 5,4 y 8,8g de agua/g de P-P y P-CC, respectivamente (**Figura I.4.4**).

Se puede observar que P-CC tuvo valores significativamente ($p<0,05$) mayores de SC, WHC y WRC que los de P-P. Esto es coherente con la mayor proporción de polímeros hidrofílicos determinada en P-CC, que incluye un menor contenido de lignina (**Tabla I.4.1**). Además, se destaca que en P-P, el WHC fue significativamente mayor que el WRC ($p<0,05$), mientras que en P-CC, se observó una diferencia no significativa entre estos valores (**Figura I.4.4**).

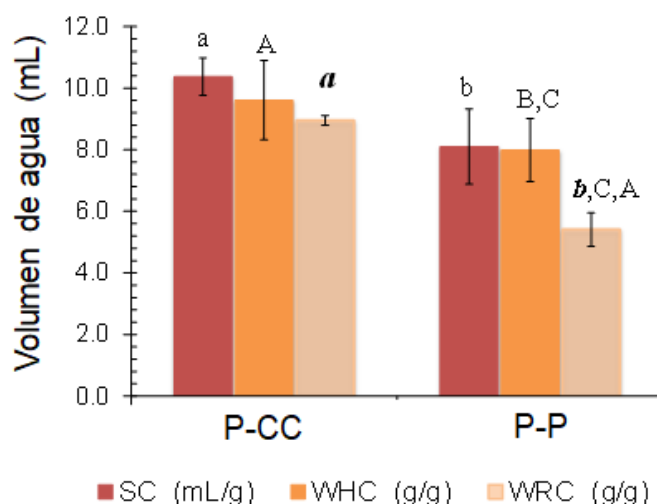


Figura I.4.4. Propiedades de hidratación de los polvos obtenidos de la mezcla de cáscara y cáliz (P-CC) y del resto del fruto (P-P) de la berenjena: capacidad de hinchamiento (SC), capacidad de atrapamiento de agua (WHC) y capacidad de retención de agua (WRC). Las barras de error son el desvío estándar (n=3).

Las propiedades de hidratación desempeñan un papel fundamental al evaluar el comportamiento funcional de una muestra en su uso como aditivo o ingrediente en la industria alimentaria. Además, estos parámetros ofrecen información sobre la cantidad de agua necesaria para la hidratación de la muestra, lo que resulta ser un factor esencial para el proceso extractivo y el proceso de ultrasonido en particular ya que la SC me indica la mínima relación solvente:sólido que se podría utilizar, en función de la capacidad de hinchamiento del polvo de fibra (Idrovo Encalada et al., 2016).

I.4.6. Microscopia óptica del tejido fresco

Al examinar las imágenes obtenidas en el microscopio óptico del exocarpio (cáscara) (**Figura I.4.5 A**) y del mesocarpio (pulpa) (**Figura I.4.5 B**) de los frutos de la berenjena cruda, se puede apreciar que las células, tanto grandes como pequeñas, remarcadas por las paredes celulares teñidas con azul de toluidina, muestran la presencia de vacuolas que están adheridas a la membrana celular y ocupan prácticamente todo el volumen intracelular (**Figura I.4.5; flechas grises**). Estas vacuolas contienen diversos compuestos disueltos, como azúcares simples y reductores (**Tabla I.4.1**), proteínas específicas (**Tabla I.4.1**), aminoácidos, ácidos orgánicos, iones y otros metabolitos secundarios (Tan et al., 2019). El azul de toluidina tiene una alta afinidad por los componentes tisulares ácidos y tiñe los ácidos nucleicos de azul, mientras que los polisacáridos son teñidos de color púrpura (Cerri et al., 2019), y es este último color el que se observa en las paredes celulares en las imágenes tomadas con el microscopio óptico (**Figura I.4.5**).

En la **Figura I.4.5 A** se puede notar una delgada capa de células epidérmicas seguida por 4-5 capas de células alargadas. A medida que avanzamos, el tamaño de las células aumenta, con capas de células muy grandes. Por otro lado, en la **Figura I.4.5 B**, en el mesocarpio, se observan células de mayor tamaño, con un alto contenido de agua en la vacuola intracelular, que rodean a un grupo de células vasculares de pequeño tamaño.

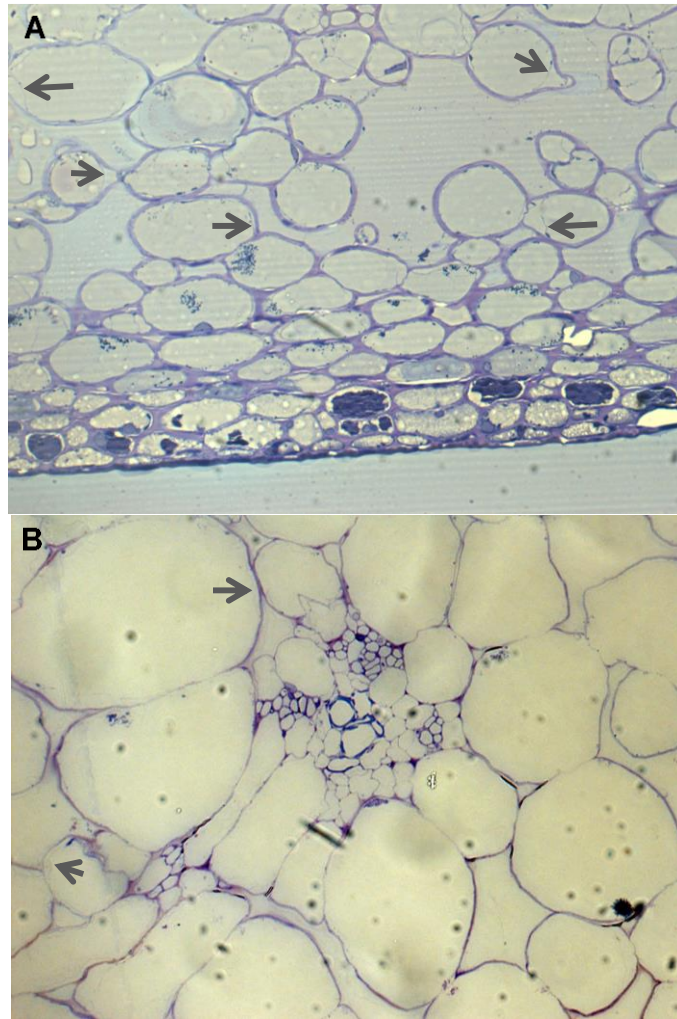


Figura I.4.5. Imágenes tomadas en el microscopio óptico de los tejidos frescos del exocarpio (cáscara) en 40X (A) y del mesocarpio en 20X (B) de frutos de berenjena.

I.4.7. Contenido de Carotenoides y tocoferoles

Se determinó el perfil de antioxidantes lipofílicos de los polvos de berenjena P-CC y P-P, cuyos resultados se muestran en la **Tabla I.4.2**. La mayor concentración se observó para el α -tocoferol en ambos polvos, siendo principalmente alto en P-CC ($2100\mu\text{g}/100\text{g}$), seguido de una cantidad similar de luteína, mientras que para P-P el contenido de luteína fue bajo ($210\mu\text{g}/100\text{g}$). El contenido de β -caroteno también fue mayor en P-CC ($490\mu\text{g}/100\text{g}$) pero bajo en P-P ($37\mu\text{g}/100\text{g}$). El isómero γ -tocoferol se encontró en cantidades similares en P-CC y P-P.

Rosa-Martínez et al. (2021) estudiaron los carotenos presentes en la berenjena en la etapa de madurez comercial. Los frutos recolectados fueron lavados, cortados, molidos y liofilizados. Del polvo obtenido se realizaron extracciones con etanol:hexano y se cuantificó el β -caroteno mediante espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 452nm y 510nm, obteniendo una concentración de 480 μ g/100g de fruto fresco. Por otra parte, en un estudio realizado por Kalogeropoulos et al. (2007), se determinó, mediante HPLC, la concentración de tocoferoles presentes en la berenjena, previamente liofilizada. Se le realizaron extracciones con hexano, obteniendo una concentración de α -tocoferol de 180 μ g/100g de fruto fresco.

Los niveles de carotenoides se ven afectados por varios factores, como la etapa de desarrollo de la planta, condiciones de estrés, condiciones postcosecha o tratamientos de cocción. Los niveles de carotenoides son más altos en las primeras etapas de la madurez del fruto de la berenjena, disminuyendo luego durante la maduración (Gürbüz et al., 2018).

Tabla I.4.2. Composición en antioxidantes lipofílicos que se encuentran en los polvos de la berenjena P-CC y P-P.^a

	P-CC (μ g/100g polvo)	P-P (μ g/100g polvo)
α -tocoferol	2100 \pm 400 ^A	500 \pm 90 ^B
γ -tocoferol	230 \pm 40 ^A	249 \pm 2 ^A
β -caroteno	490 \pm 50 ^A	37 \pm 2 ^B
Luteína	1800 \pm 200 ^A	210 \pm 40 ^B

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 3$. Las mismas letras mayúsculas como superíndice en una fila dada significan diferencias no significativas ($p < 0,05$).

En el caso de las brácteas del maíz, Bernhardt et al. (2019) reportó una concentración de β -caroteno para la fracción PB de 4,09mg/100g mientras que para la fracción RIA-PB obtuvo una concentración de 1,22mg/100g. Esta disminución del contenido de carotenos se la atribuyó a la extracción etanólica en caliente realizada al polvo PB para la obtención de RIA-PB.

I.4.8. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentes en los polvos de berenjena P-P y P-CC fueron analizados mediante técnicas cromatográficas HPLC-DAD y HPLC-ESI-EM. Así se determinó el perfil de compuestos fenólicos extraíbles mediante acetona/agua/ácido acético (**sección 1.3.11.1**). El análisis cromatográfico fue determinado en el rango 280 - 560nm. Se observaron picos a longitudes de onda de 280nm, 320nm y 520nm (**Figura I.4.6**). Los resultados se resumen en la **Tabla I.4.3** donde se lograron identificar nueve compuestos fenólicos, de los cuales ocho pertenecen a la familia de los ácidos hidroxicinámicos y una antocianina, esta última, en P-CC. Las estructuras químicas se muestran en la **Figura I.4.7**.

El polvo P-CC mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles (140,5mg/100g P-CC), cuyo principal componente fue una antocianina, identificada como delphinidina-3-rutinósido (71mg/100g P-CC), tal como se observa en el cromatograma (**pico 8; Figura I.4.6; Tabla I.4.3**), la cual mostró una longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{max}) a 525nm y el ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 611,1607 con un fragmento característico de masa MS^2 a m/z 465,1048, que se forma por la pérdida de ramnosa del disacárido rutina, y un fragmento de masa MS^2 a m/z 303,0508 formado por la pérdida subsiguiente de glucosa que se encuentra unida en la posición 3 de la delphinidina, como se muestra en la **Figura I.4.8**.

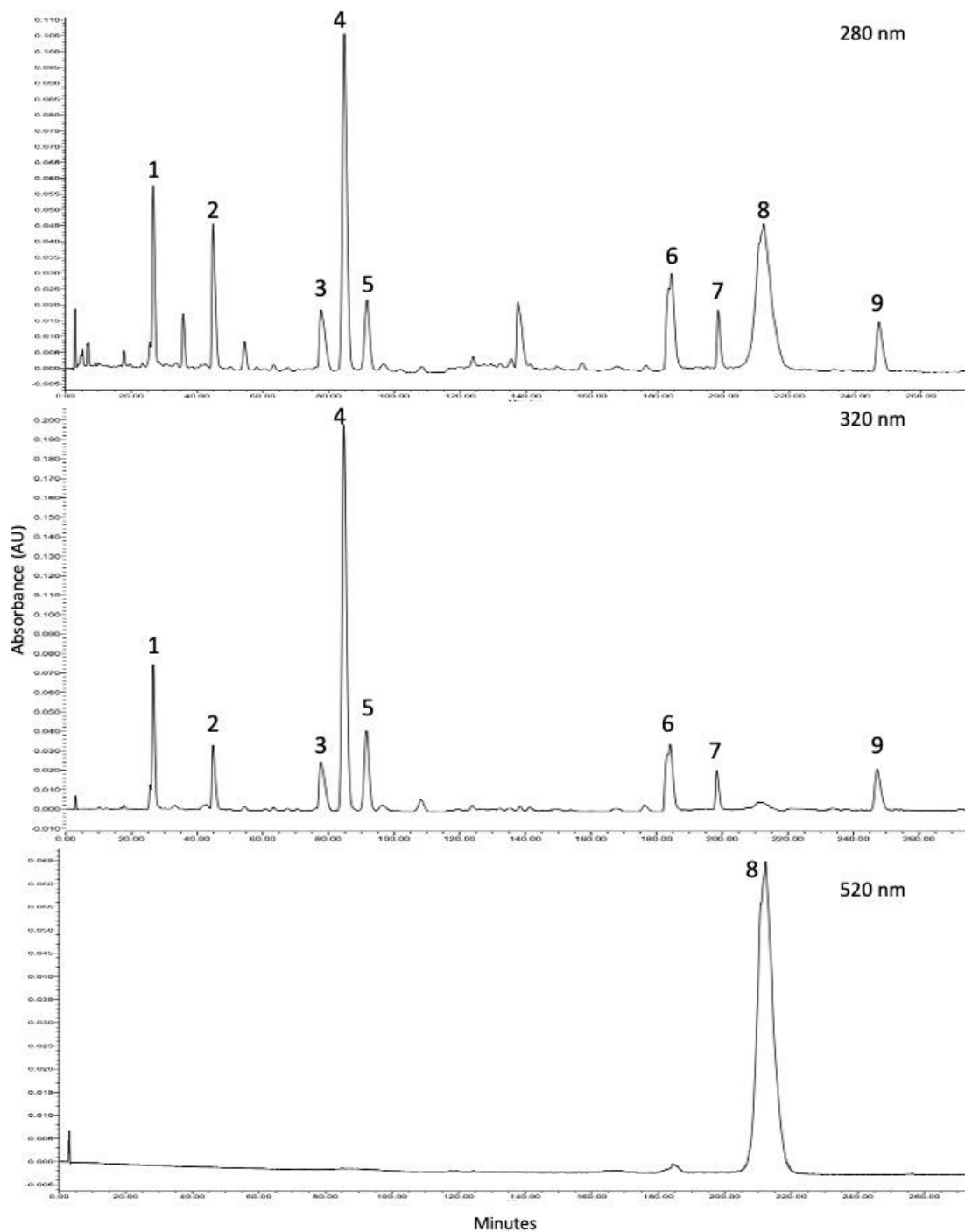


Figura I.4.6. Cromatogramas HPLC-DAD obtenidos a 280, 320 y 520nm para los compuestos fenólicos extraídos del polvo de berenjena P-CC. Picos: **1**, N-cafeoil putrescina; **2**, *p*-cumaroil putrescina; **3**, *O*-metil-N-cafeoil putrescina; **4**, ácido cafeoilquinico; **5**, isómero del ácido cafeoilquinico; **6**, N-cafeoil-N-dihydrocafeoil espermidina; **7**, isómero de N-cafeoil-N-dihydrocafeoil espermidina; **8**, delfinidina-3-rutinósido; **9**, N,N-dicafeoil espermidina.

Tabla I.4.3. Resultados obtenidos por HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS de los compuestos fenólicos extraíbles de los polvos de berenjena de cáliz+exocarpio (P-CC) y del resto del fruto (P-P). Hidroxicinamatos expresados como ácido clorogénico y antocianinas como cianidina 3-glucósido^a

Compuesto fenólico	Número de pico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	MS[M-H] ⁺ (m/z)	MS/MS [M-H] ⁺ (m/z)	Ion (fórmula)	P-CC (mg/100g polvo)	P-P (mg/100g polvo)
Hidroxicinamatos								
N-cafeoilputrescina	1	26,65	317 / 292	251,139	234,1132 / 163,0408 / 145,0296 / 135,0441	C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₃	4,88±0,05 ^A	2,37±0,03 ^B
<i>p</i> -coumaroilputrescina	2	44,8	291/310	235,1451	218,1173 / 147,0446	C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₂	5,13±0,08	-----
O-metil-N-cafeoilputrescina	3	77,88	315 / 292	265,1547	248,1286 / 177,0568 / 145,0315	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ₃	6,12±0,95 ^A	2,50±0,06 ^B
Ácido cafeoilquínico	4	84,71	324	355,1024	163,0354 / 145,0252	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	27,0±1,5 ^A	50,12±1,2 ^B
Isómero del ácido cafeoilquínico	5	91,62	324	355,1024	163,0354 / 145,0252	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	10,2±0,68 ^A	6,54±0,68 ^B
N-cafeoil-N-dihidrocafeoil espermidina	6	184,1	320 / 287	472,2747	310,2305 / 220,1096 / 163,0484	C ₂₅ H ₃₄ N ₃ O ₆	5,58±0,28 ^A	2,49±0,11 ^B
Isómero de la N-cafeoil-N-dihidrocafeoil espermidina	7	198,3	318 / 287	472,3253	310,2660 / 222,1501 / 163,0666	C ₂₅ H ₃₄ N ₃ O ₆	3,48±0,18 ^A	1,54±0,07 ^B
N,N-Dicafeoil espermidina	9	247,19	317 / 293	470,2264	308,1931 / 220,0950 / 163,0369	C ₂₅ H ₃₂ N ₃ O ₆	7,09±0,72 ^A	6,18±0,31 ^B
Antocianinas								
Delfinidina-3-rutinósido	8	212,3	525 / 345 / 276	611,1607	465,1048 / 303,0508	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	71±1	-----
Contenido total de fenólicos							140,5	71,7

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para *n* = 3. Mismas letras mayúsculas como superíndice en una fila dada indican diferencias no significativas (*p*<0,05).

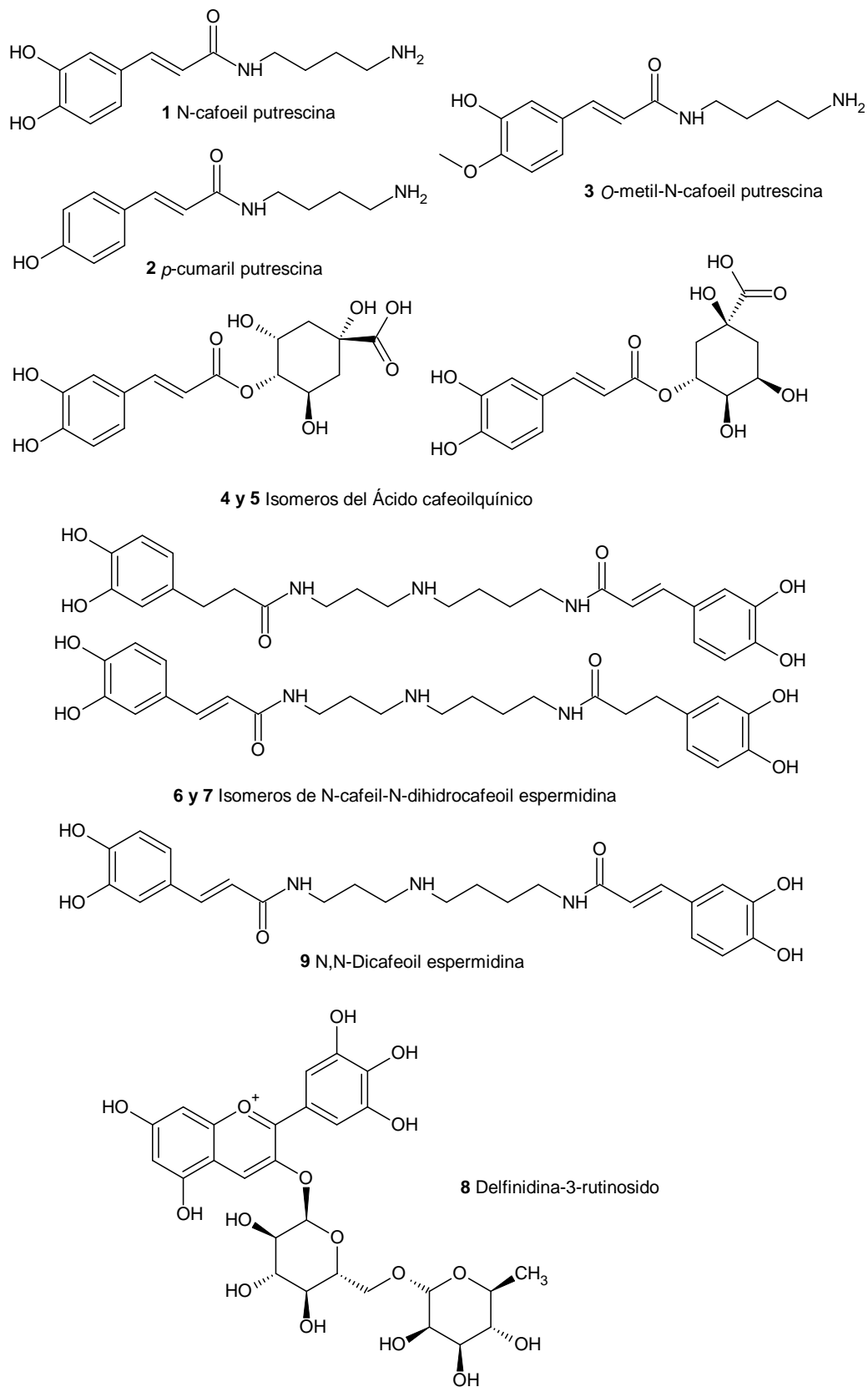


Figura I.4.7. Polifenoles identificados en los polvos de berenjena P-CC y P-P.

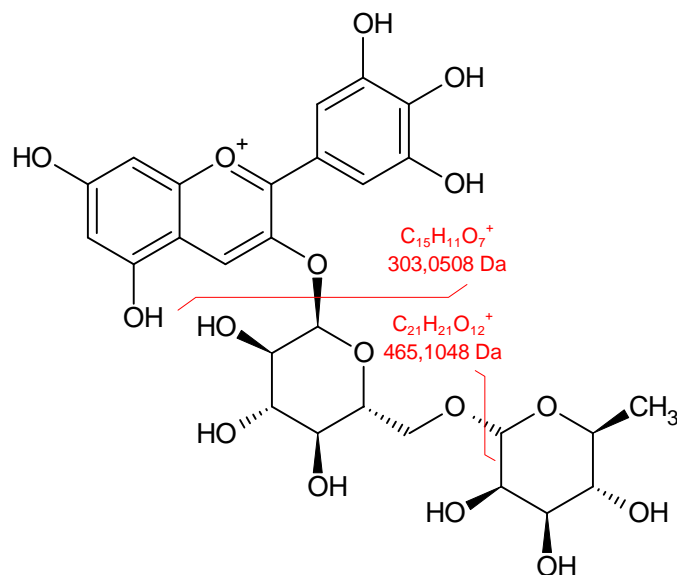


Figura I.4.8. Principales fragmentos obtenidos de la delphinidina 3-rutinósido.

Los colores de los pigmentos de las flores o frutos, por ejemplo, se determinan en función de los colores de las antocianinas. En este sentido, la delphinidina, en la que los grupos hidroxilo están unidos en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B (aromático), tiene un color azul-púrpura intenso (Iwashina, 2015), similar al del exocarpio del fruto de la berenjena.

En el análisis de antocianinas de cultivares de berenjena se han informado otros derivados de la delphinidina como antocianina principal. En un estudio analizaron el contenido de antocianinas de la berenjena búlgara y encontraron como compuesto principal a la delphinidina 3-rutinósido y pequeñas cantidades de delphinidina-3-rutinósido-5-glucósido (Tanchev et al., 1970), mientras que en otro estudio se identificaron antocianinas de berenjena de los Estados Unidos, específicamente cuatro derivados de la delphinidina, incluidos delphinidina 3-rutinósido, delphinidina 3-rutinósido-5-glucósido, delphinidina-3-glucósido y por primera vez delphinidina-3-rutinósido-5-galactósido (Wu y Prior, 2005).

En el presente trabajo, también se identificaron isómeros del ácido cafeoilquínico (27mg/100g P-CC y 10,2mg/100g P-CC). Se observaron en el cromatograma los **picos 4 y 5 (Figura I.4.9; Tabla I.4.3)** con un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 355,1024, con absorbancia máxima a 324nm y un fragmento característico de MS^2 a m/z 163,0354 que se forma por pérdida del ácido quínico, tal como se muestra en la **Figura I.4.9**. Los isómeros estructurales, moléculas que tienen la misma

fórmula química, pero con átomos unidos en diferente posición, son difíciles de identificar mediante espectrometría de masas. Exhiben espectros de masas indistinguibles cuando son ionizados por electrones (Alharbi et al., 2018). Debido a esto no se puede discernir entre los diferentes isómeros del ácido cafeoilquínico.

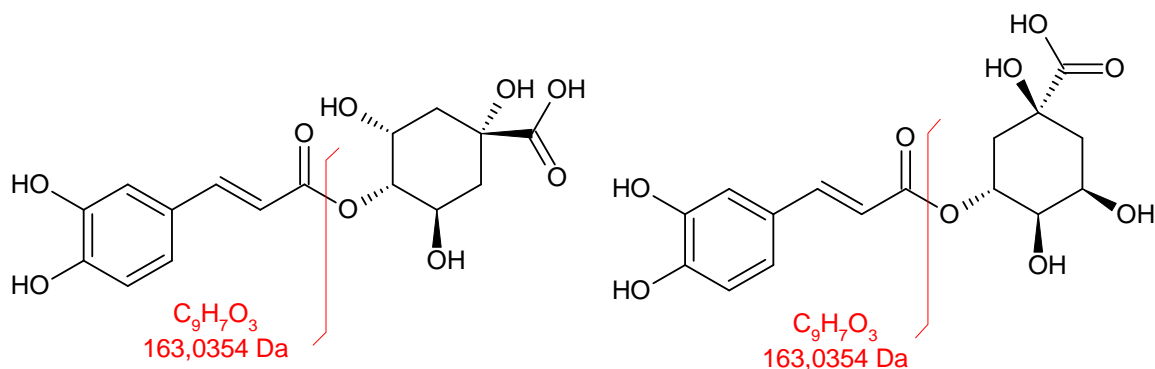


Figura I.4.9. Principales fragmentos obtenidos para los dos isómeros del ácido cafeoilquínico.

Por otro lado, el contenido de los compuestos fenólicos extraíbles del tipo ácidos hidroxicinámicos determinados en P-P fueron de 71,7mg/100g y no se detectaron antocianinas. El componente mayoritario identificado fue el ácido cafeoilquínico (50,1mg/100g P-P), que se encuentra en mayor proporción que en P-CC (**Tabla I.4.3**).

Los ácidos fenólicos se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Dentro de los ácidos hidroxicinámicos más comunes en el reino vegetal se tiene al ácido cafeico y al ácido ferúlico, mientras que los ácidos *p*-cumárico, sinápico y cinámico son menos comunes (Scalbert y Williamson, 2000; Robbins, 2003). Estos compuestos no suelen encontrarse en su forma libre y generalmente forman ésteres, siendo el ácido clorogénico (ácido 5-cafeoilquínico) el éster de ácido fenólico más ampliamente distribuido en la berenjena, mientras que sus isómeros, el ácido criptoclorogénico (ácido 4-cafeoilquínico) y el ácido neoclorogénico (ácido 3-cafeoilquínico), se encuentran en menor proporción (Clifford, 1999; Clifford, 2000a; Clifford, 2000b).

Un estudio cuantitativo por HPLC de ácidos hidroxicinámicos en berenjena determinó el contenido de ésteres y glucósidos de ácidos fenólicos en cultivares italianos y españoles,

encontrándose una cantidad de 63 y 57mg /100g de ácido 4-cafeoilquínico, respectivamente, para cada cultivar, que representó alrededor del 96% del total de ácidos fenólicos, mientras que reportaron trazas de los isómeros de los ácidos 4-cafeoilquínico y 3-cafeoilquínico (Winter y Herrmann, 1986). El contenido total de compuestos fenólicos en frutos de berenjena depende fuertemente del cultivo. Los compuestos fenólicos solubles (extraíbles) totales variaron de 1350 a 2049mg de equivalentes de ácido clorogénico por 100g para un cultivar chino y un cultivar tailandés, respectivamente (Sharma y Kaushik, 2021).

Otros compuestos fenólicos extraíbles identificados en menor proporción en el polvo P-CC fue N-cafeoil putrescina; se la observó en el cromatograma como el **pico 1 (Figura I.4.6)** con un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 251,139 y fragmentos MS^2 a m/z 234,1132 que se forma a partir de la pérdida del grupo amino terminal, y a m/z 163,0408 proveniente de la pérdida de putrescina, como se muestra en la **Figura I.4.10**.

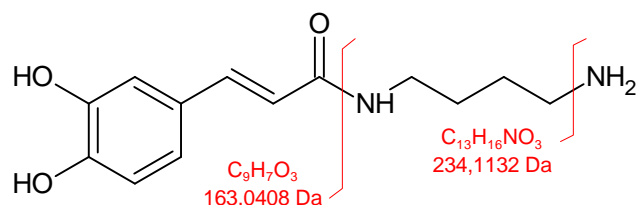


Figura I.4.10. Principales fragmentos obtenidos para la N-cafeoil putrescina.

La *p*-cumaroil putrescina también fue identificada en el **pico 2 (Figura I.4.6)**, con un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 235,1451 y un fragmento MS^2 a m/z 147,0446, correspondiente a la pérdida de putrescina (**Figura I.4.11**). Por otro lado, la *O*-metil-N-cafeoil putrescina fue identificada en el **pico 3 (Figura I.4.6)**, con un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 265,1286 y con MS^2 a m/z 177,0568, correspondiente a la pérdida de putrescina y a m/z 145,0315 por la pérdida del grupo metoxilo, tal como se muestra en la **Figura I.4.11**.

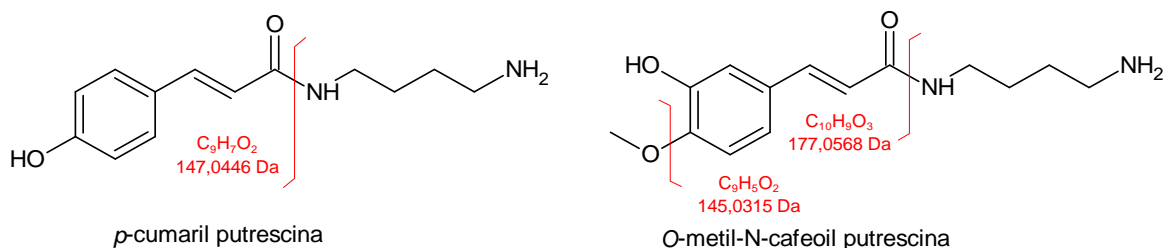


Figura I.4.11. Principales fragmentos obtenidos de *p*-cumaroil putrescina y *O*-metil-*N*-cafeoil putrescina.

Asimismo, la *N,N*-dicafeolespermidina se identificó como el **pico 9** en el cromatograma mostrado en la **Figura I.4.6**, presentando un ión $[M+H]^+$ a m/z 470,2264 y una serie de fragmentos MS^2 a m/z 308,1913; 220,0950 y 163,0369, formados por la pérdida de una molécula de ácido cafeico, la ruptura de una parte de la molécula de espermidina y la molécula de ácido cafeico simple, respectivamente, como se muestra en la **Figura I.4.12**. Sinanoglou et al. (2019) lograron identificar *N,N*-dicafeolespermidina en frutos de berenjena cultivados en invernaderos con calefacción convencional. Este entorno pareció estimular la biosíntesis de este compuesto.

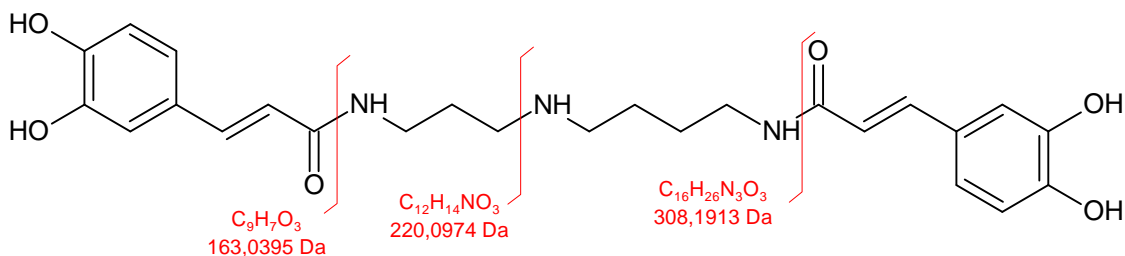


Figura I.4.12 Principales fragmentos obtenidos para la *N,N*-dicafeolespermidina

También se identificaron *N*-cafeoil-*N'*-dihidrocafeoil espermidina y su isómero como los **picos 6 y 7** en el cromatograma mostrado en la **Figura I.4.6** con un ion molecular $[M+H]^+$ a m/z 472,2747 con fragmentos de MS^2 a m/z 310,2660; 222,1131 y 163,0369, formados a partir de la pérdida de ácido cafeico y de fracciones de la molécula de espermidina, tal como se muestra en la **Figura I.4.13**. Wu et al. (2013) encontraron previamente *N*-cafeoil-*N'*-dihidrocafeoil espermidina en especies de berenjena, con máximos de absorción a 320nm y iones a m/z 472,2441 y fórmula de iones de $C_{25}H_{34}N_3O_6$ igual que los reportados en este estudio (**Tabla I.4.3**).

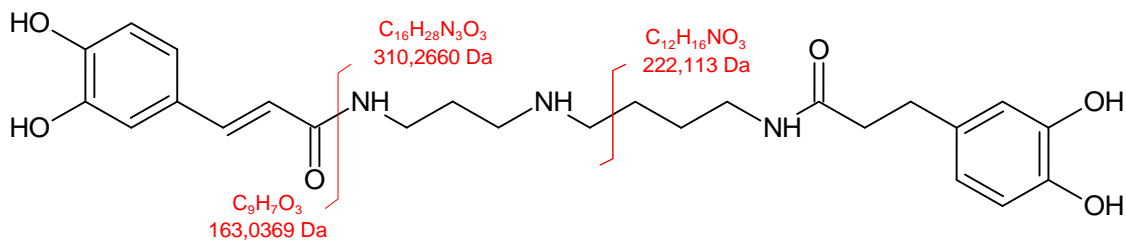


Figura I.4.13. Principales fragmentos obtenidos para la N-caffeoil-N-dihidrocaffeoil espermidina.

Los compuestos N-caffeoil-N-dihidrocaffeoil espermidina y su isómero, N,N-dicaffeoilespermidina, N-caffeoilputrescina y los del derivado de O-metil-N-caffeoilputrescina también fueron identificados y cuantificados en niveles más bajos en el polvo P-P (**Tabla I.4.3**). El compuesto del **pico 2**, *p*-cumaroil putrescina (**Figura I.4.6**), no se encuentra presente en P-P ya que es un compuesto que solamente se encuentra en la cáscara de la berenjena (Sulli et al., 2021) (**Figura I.4.14**).

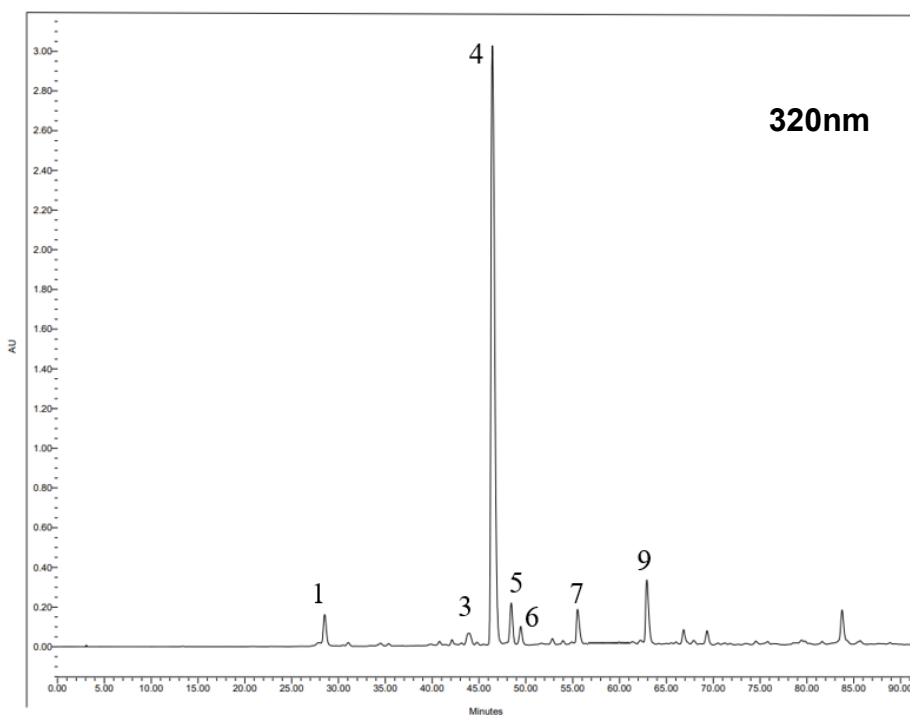
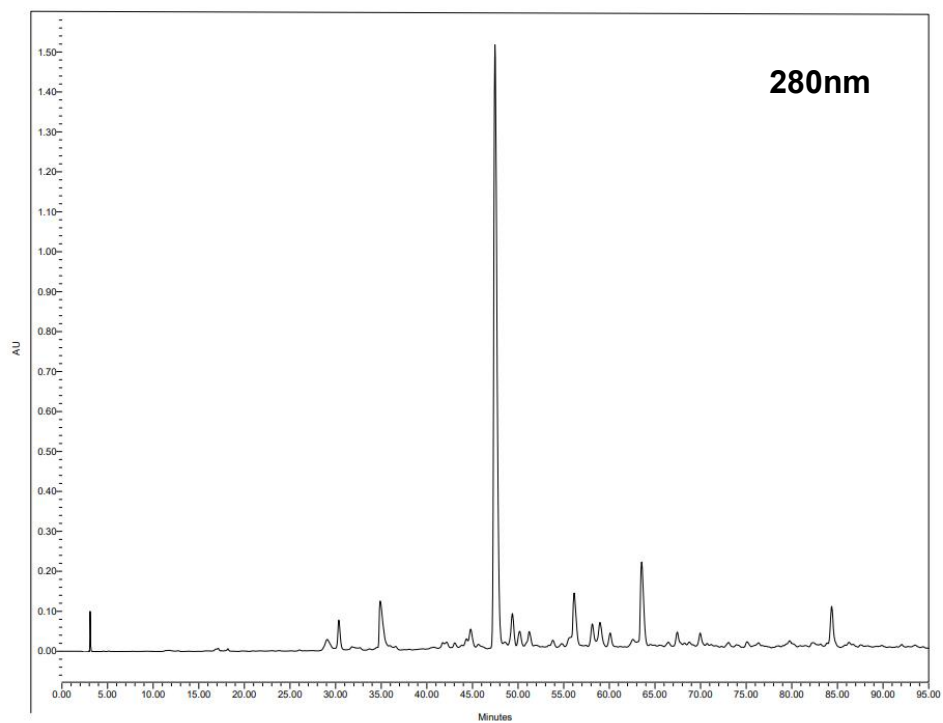


Figura I.4.14. Cromatogramas HPLC-DAD obtenidos 280nm y 320nm para los compuestos fenólicos extraídos del polvo de berenjena P-P. Picos: **1**, N-cafeoil putrescina; **3**, O-metil-N-cafeoil putrescina; **4**, ácido cafeoil quínico; **5**, isómero del ácido cafeoil quínico; **6**, N-cafeoil-N-dihidrocafeoil espermidina; **7**, isómero N-cafeoil-N-dihidrocafeoil espermidina; **9**, N,N-dicafeoil espermidina.

Estos derivados de la putrescina y de la espermidina, denominados fenolamidas, fenilamidas o aminos del ácido hidroxicinámico, se han encontrado previamente en los frutos de berenjena y son el resultado de la amidación de al menos un ácido hidroxicinámico por una monoamina aromática o una poliamina alifática como la putrescina y la espermidina. Las fenolamidas se puede encontrar en todos los órganos de las plantas, especialmente en la superficie de los granos de polen y semillas o en tejidos dañados (Roumani et al., 2020).

Sulli et al. (2021) realizaron un estudio a la cáscara y pulpa de berenjenas mediante una extracción con metanol 75%, donde lograron identificar, mediante HPLC-MS, una variedad de metabolitos secundarios de los cuales se destacan las fenolamidas (N,N'-dicafeoil espermidina, N-cafeoil putrescina, N-dihidrocafeoil-N'-cafeoil espermidina y *p*-cumaroil putrescina).

También los derivados N,N'-dicafeoil espermidina, N-cafeoil putrescina y *O*-metil-N-cafeoil putrescina fueron identificados previamente en algunos cultivares de berenjena cultivados en ambientes orgánicos y convencionales, así como en berenjenas cultivadas en diferentes estaciones climáticas (García-Salas et al., 2014). Las fenolamidas se están estudiando recientemente en sus efectos farmacológicos y en la salud. Además, han demostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas, así como efectos protectores contra el síndrome metabólico y enfermedades neurodegenerativas. La *p*-cumaroilputrescina actúa sobre la α -glucosidasa controlando el nivel de glucosa en sangre (Roumani et al., 2020).

Colak et al. (2022) analizaron los compuestos fenólicos en berenjenas negras (variedad Aydin Siyahi), moradas (variedad Kadife Kemer) y blancas (variedad Trabzon Kadife) cultivadas en Turquía. La variedad negra tiene un aspecto similar a la berenjena utilizada en el presente trabajo de tesis, que es la variedad más comercializada en Argentina. En extractos crudos obtenidos de la cáscara y la pulpa de esta variedad se determinaron los contenidos de fenoles totales (17193 y 6552mg equivalentes de ácido gálico/kg fruto fresco), de flavonoides (3019 y 1160 equivalentes de quercetina/kg fruto fresco) y de antocianinas (1686 y 6167g equivalentes de delphinidina-3-*O*-glucósido/kg fruto fresco). En la variedad negra, estos autores identificaron ácido cafeico en forma de glucósido (611,9mg/kg) y niveles muy bajos de ácido clorogénico (7,82mg/kg). Además,

encontraron delfinidina-3-O-rutinósido en la cáscara de la berenjena negra, y en una concentración promedio de 1162mg/kg.

Bernhardt et al. (2019) logró cuantificar los compuestos fenólicos extraíbles presentes en el polvo de brácteas de maíz deshidratadas (PB), de los cuales tres pertenecían al grupo de los ácidos cumáricos y nueve al grupo de los ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos cumáricos estuvieron presentes en menor proporción con una concentración de 2,803mg/100g, expresados como ácido *p*-cumárico, mientras que los ácidos cinámicos, se presentaron en una mayor proporción con una concentración de 10,980mg/100g expresados como ácido clorogénico. Por otro lado, se pudo identificar al ácido cafeoil-dimetoxi-cinamoilquinico como el compuesto mayoritario, con una concentración de 7,452mg/100g. De acuerdo con lo reportado, se calculó un contenido total de compuestos fenólicos extraíbles en el polvo de las brácteas del maíz (RIA-PB) de 13,782mg/100g.

Los hidroxicinamatos son constituyentes menores de las paredes celulares de las plantas. Mientras que el ácido *p*-cumárico se une principalmente a la lignina, con sólo cantidades más bajas unidas a polisacáridos, el ferulato está principalmente unido como ésteres a polisacáridos de la pared celular tales como arabinosilanos y pectinas. Los hidroxicinamatos, especialmente los ferulatos, forman dímeros y oligómeros (Dobberstein y Bunzel 2010). Estos compuestos fenólicos fueron liberados en el presente trabajo de tesis por hidrólisis alcalina (sección I.3.11.3), para luego extraerlos y cuantificarlos. Sus cromatogramas se muestran en la **Figura I.4.15** y se reportan los resultados en la **Tabla I.4.4**. Considerando la longitud de onda UV de absorción y los iones obtenidos y analizados a través de HPLC-ESI-MS, principalmente se liberó ácido ferúlico (**pico 1**), con una concentración de 185mg/100g de P-CC y 101mg/100g de P-P. También se cuantificaron dímeros y trímeros de ferulato en menor proporción para P-CC y P-P, siendo la concentración total de ferulato esterificado de 202mg/100g de P-CC y de 114mg/100g de P-P (**Tabla I.4.4**).

Para el polvo de brácteas del maíz, RIA-PB, Bernhardt et al. (2019) reportó un contenido total de ácido ferúlico esterificado a los polisacáridos de la pared celular de 18,64mg/100g polvo, de los cuales, 8,102mg/100g polvo correspondieron a un dímero de ferulato y 6,139mg/100g polvo correspondieron a monómeros de ferulato, mientras que se encontraron trímeros en menor proporción.

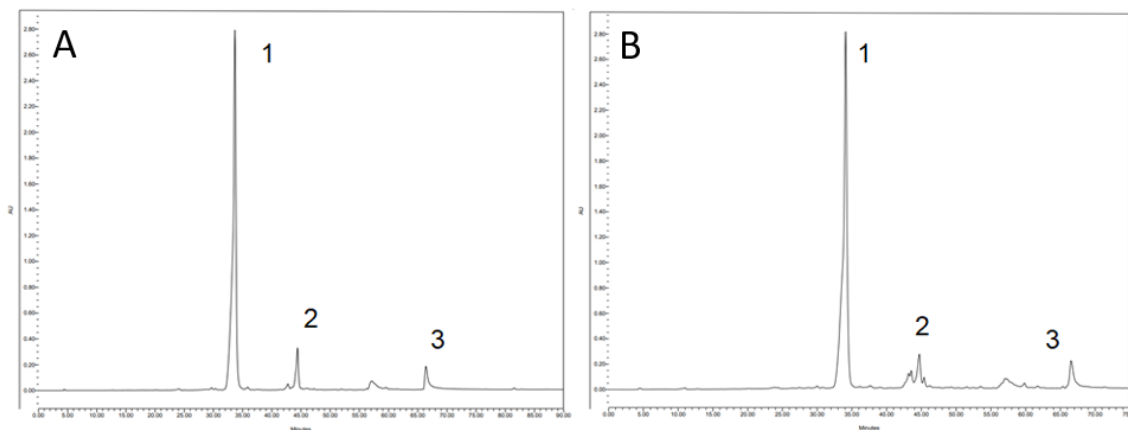


Figura I.4.15. Cromatogramas HPLC-DAD obtenidos a 320nm para los compuestos fenólicos esterificados presentes en los polvos de berenjena (A) P-CC y (B) P-P.

Tabla I.4.4 Compuestos de ácido ferúlico esterificado^{a,b} determinados en los polvos de berenjena P-CC y P-P.

Ácido Ferulico	t _R (min) P-CC	t _R (min) P-P	λ _{max} (nm)	λ _{max} (nm)	MS [M-H] ⁺ (m/z)	P-CC (mg/100g)	P-P (mg/100g)
Monómero	33,6	34,1	321,2	321,2	195	185 ± 1 ^A	101 ± 5 ^B
Dímero	44,4	44,7	323,6	322,4	387	12,85 ± 0,5 ^A	6,7 ± 0,5 ^B
Trímero	66,4	66,5	327,2	327,2	565	4,3 ± 0,7 ^A	6,4 ± 0,6 ^B
Total						202,15	114,1

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 3$. Las mismas letras mayúsculas como superíndice en una fila dada significan diferencias no significativas ($p < 0,05$).

^b Concentraciones expresadas como ácido ferúlico (mg/100g de polvo), utilizado como estándar para la cuantificación

I.4.9. Capacidad Antioxidante

El ácido L-(+)-ascórbico y los compuestos fenólicos son conocidos como antioxidantes hidrofílicos mientras que los carotenoides lo son como antioxidantes lipofílicos. Tal como se mencionó previamente, la berenjena es conocida por ser una buena fuente de antioxidantes naturales, incluidos los carotenoides, vitaminas, compuestos fenólicos y flavonoides.

La capacidad antioxidante de los polvos de berenjena se determinó como la capacidad secuestrante de radicales DPPH y el poder antioxidante reductor del ión férrico (FRAP). Ambos fueron expresados en base al ácido L-(+)-ascórbico (AA) y los resultados se muestran en la **Tabla I.4.5**. La actividad de eliminación de radicales DPPH fue equivalente a la de 920mg de AA por 100g de P-CC y a la de 190mg de AA por 100g de P-P, mientras que la actividad reductora de iones Fe(III) fue equivalente a la de 955,4 y 177mg de AA por 100g de P-CC y P-P, respectivamente. La capacidad antioxidante fue alta, especialmente para el polvo de cáscara y cálices (P-CC). El mismo presentó una mayor concentración de compuestos fenólicos en comparación con el polvo P-P (**Tabla I.4.3**), en particular una alta concentración de la antocianina delfinidina-3-rutinósido que sólo se la encontró presente en la cáscara de la berenjena (71mg / 100g polvo). Esto podría explicar la mayor capacidad antioxidante que presenta el polvo P-CC mediante los análisis de DDPH y FRAP.

Por otro lado, Bernhardt et al. (2019) analizó la capacidad antioxidante del polvo RIA-PB obteniendo una baja actividad mediante el ensayo de DDPH y una actividad nula para el ensayo FRAP.

Tabla I.4.5. Actividad antioxidante determinada como la capacidad secuestrante de radicales DPPH^{a,b} y el poder antioxidante reductor del ión férrico (FRAP)^{a,b}.

	P-CC (mg AA/100g polvo)	P-P (mg AA/100g polvo)
DPPH	920 ± 11 ^A	190 ± 4 ^B
FRAP	955 ± 20 ^A	177 ± 6 ^B

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 3$. Las mismas letras mayúsculas como superíndice en una fila dada indican diferencias no significativas ($p < 0.05$).

^bAA: ácido L-(+)-ascórbico.

Tanto la actividad antioxidante de un flavonoide como la de una antocianina dependen del número de sustituciones por grupos hidroxilo en su estructura principal. En general, cuanto mayor es el número de grupos hidroxilo sustituyentes, más fuertes son las actividades antioxidante y prooxidante. Los flavonoides que contienen múltiples grupos hidroxilo muestran actividades anti-radicales peroxilo más fuertes que el Trolox, un análogo del α -tocoferol (Cao et al., 1997). Estudios realizados han demostrado que las antocianinas agliconas, es decir, sin ninguna sustitución de azúcares, con sólo un grupo hidroxilo ($-OH$) en el anillo B (**Figura I.1.11**), presentan menor actividad antioxidante en comparación con la de compuestos que poseen sustituciones 3',4' di-OH o sustituciones con azúcares, como los son los derivados de delfinidina y cianidina (**Figura I.4.7**). Los grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B son de gran importancia con relación a una mayor capacidad antioxidante de este tipo de moléculas (Rice-Evans et al., 1996).

Singh et al. (2009) estudiaron la capacidad antioxidante de diferentes cultivos de berenjena, en ambientes orgánicos y convencionales. Indicaron que la actividad antioxidante correlacionó directamente con el contenido de compuestos fenólicos de la berenjena. Además, observaron que la berenjena cultivada convencionalmente presentó un contenido fenólico y una actividad antioxidante mayores o iguales en comparación con la berenjena cultivada orgánicamente.

El consumo de diversas frutas constituye una buena fuente de compuestos polifenólicos capaces de impactar positivamente en la salud humana. Hay gran evidencia acerca de que los polifenoles tienen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, actividad antidiabética, y así

previenen enfermedades cardiovasculares (Cassidy, 2018). Es por esta razón que hay un gran interés en la utilización de este tipo de compuestos en la industria alimentaria (He y Giusti, 2010).

I.4.10. Citotoxicidad de compuestos fenólicos extraíbles de P-CC y P-P en células HepG2

El ensayo MTT se utilizó para medir la actividad metabólica celular como un indicador de viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad celular se calcula midiendo la absorbancia del color rosa del formazán resultante de la reducción del MTT en solución por la presencia de la deshidrogenasa mitocondrial en células viables (Nemudzivhad y Masoko, 2014).

Para los compuestos fenólicos extraíbles de P-CC, la viabilidad de la línea celular derivada de hepatoblastoma humano HepG2 no disminuyó en el rango de concentración utilizada (5 - 500 ppm) (**Figura I.4.16 A**). Por lo tanto, no se puede calcular un CC_{50} . En cambio, para los compuestos fenólicos extraíbles de P-P, la viabilidad de las células HepG2 disminuyó a medida que aumentaba la concentración de fenoles (**Figura I.4.16 B**). En consecuencia, se puede calcular la CC_{50} , siendo de 133,2 ppm ($R^2=0,9941$) lo cual demuestra citotoxicidad y, por lo tanto, un efecto antitumoral de los compuestos fenólicos extraíbles de P-P. Estos resultados son consistentes con la presencia de un 79% de ácido cafeoilquinico en el contenido total de compuestos fenólicos extraíbles de P-P (**Tabla I.4.3**). Este compuesto fenólico, en cambio, fue el 29% de los fenoles extraíbles P-CC (**Tabla I.4.3**). Yan, Liu, Hou, Yan et al., (2017) han determinado que el ácido cafeoilquinico (ácido clorogénico) fue eficaz en la prevención del carcinoma hepatocelular, uno de los cánceres más comunes, asociado con la tercera tasa de mortalidad más alta relacionada con el cáncer. El ácido cafeoilquinico inhibió la proliferación de las células HepG2 in vitro, así como la progresión del tejido xenoinjerto de HepG2 in vivo de múltiples formas, que comprendían la inactivación de ERK1/2 y la supresión de la expresión de MMP-2 y MMP-9.

A pesar de sus propiedades beneficiosas para la salud, varios estudios han indicado que los compuestos fenólicos, cuando se consumen en concentraciones elevadas, pueden actuar como prooxidantes y, en consecuencia, generar efectos perjudiciales. Estas actividades se deben a la posible producción de ROS que podrían perturbar las células. No obstante, es importante destacar que su naturaleza prooxidativa no puede definirse de manera dañina, ya que los riesgos y beneficios

dependen de la situación y de la concentración utilizada (Murakami, 2014).

Estas evidencias sugieren que el potencial toxicológico de los compuestos fenólicos depende tanto del tipo de compuesto como de la concentración utilizada. Por lo tanto, su administración debe llevarse a cabo con precaución, con el fin de evitar posibles efectos nocivos para la salud. Además, es importante destacar que se deben realizar estudios clínicos adicionales con el fin de establecer márgenes de concentración seguros para la ingestión de estos compuestos (de Araújo et al., 2021).

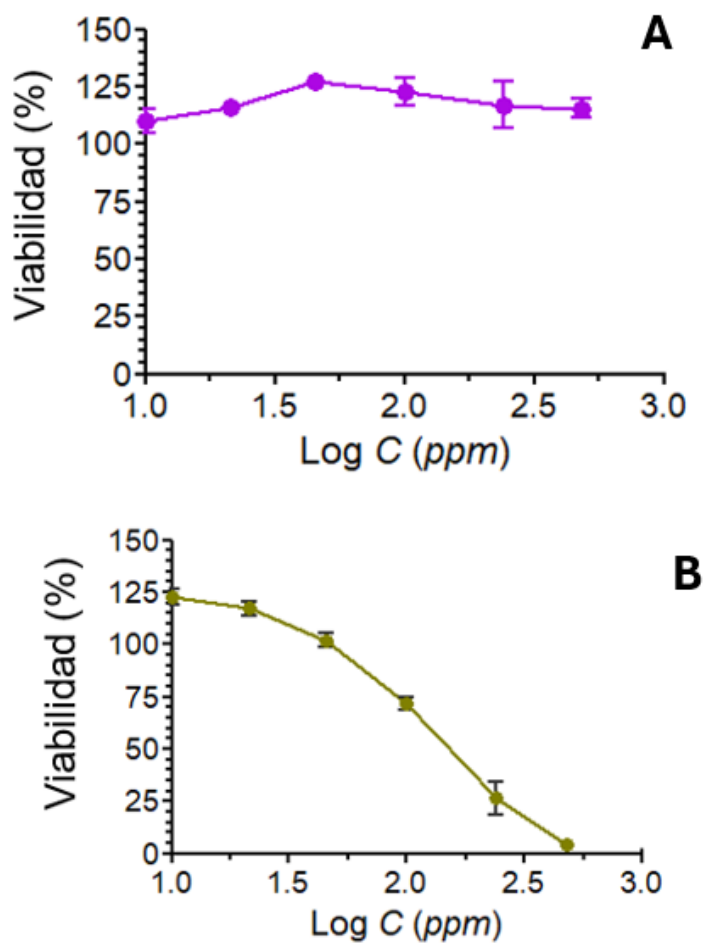


Figura I.4.16. Porcentaje de viabilidad en función de la concentración de compuestos fenólicos solubles o extraíbles de los polvos de berenjena (A) P-CC y (B) P-P.

I.4.11. Evaluación del ultrasonido de alta potencia (US) como pretratamiento: Efecto sobre el tejido de los polvos P-CC y P-P

Con el objetivo de optimizar la extracción de compuestos de interés de los polvos del fruto de la berenjena (P-CC y P-P), previamente obtenidos en este capítulo, se estudió el efecto del uso de US como pretratamiento donde se examinaron los efectos resultantes en la estructura de los polvos mediante microscopía electrónica de barrido.

Tabla I.4.6. Valores de energía y potencia mostrados por el dispositivo ultrasónico y valores calculados a partir de los registros de temperatura-tiempo determinados en las dispersiones P-CC y P-P aisladas adiabáticamente.

20kHz, 80% amplitud, 10min de procesamiento de tiempo neto	
Rango de temperatura registrado durante los ensayos (°C)	17 - 66
Rango de temperatura registrado adiabáticamente (°C)	20 - 66
Energía calculada para el tratamiento (J)	40633
Cálculo de potencia para el tratamiento(W)	67,7
Intensidad de potencia calculada (W/cm ²)	12,76
Densidad de potencia calculada (W/cm ³)	0,30
Eficiencia calculada (%)	95
Energía mostrada por el dispositivo (J)	32410
Potencia mostrada por el dispositivo (W)	64

^a 10 g polvo/200mL agua.

^b Calculado según Mamvura et al. (2018) para una sonda de punta de ultrasonido de 13mm de diámetro, y las dimensiones del contenedor de muestra reportadas, usando las temperaturas registradas a los 20min del tratamiento US total (10min de tiempo neto) en condiciones adiabáticas.

^c Calculado según Mamvura et al. (2018).

En la **Tabla I.4.6** se reportan la energía verdadera (40633J) y la potencia (67,7W) correspondiente determinadas y calculadas según lo explicado por Mamvura et al. (2018) (ecuación I.3.4 y ecuación I.3.5) para el procedimiento de US utilizado sobre los polvos de berenjena P-CC y P-P en proporción 10g:200mL polvo:agua por 20min de procesamiento neto con US. De acuerdo con la energía mostrada por el equipo de US (32410J), se puede suponer una eficiencia superior al 90%. También, considerando la sonda de titanio con una punta de 13mm de diámetro utilizada en el equipo, se calculó una intensidad de potencia de 12,76W/cm² (ecuación I.4.6 y ecuación I.4.7) para el procesamiento de US realizado, valores de intensidad de potencia cercanos y superiores a 10W/cm², los que son suficientes para formar burbujas de cavitación que funcionan como micro reactores, siendo responsables del efecto químico y mecánico de los equipos de ultrasonido de alta potencia (Santos et al., 2009).

Se evaluó el efecto del pretratamiento con ultrasonido (12,27W/cm²) en los polvos P-CC y PP dispersados en agua (5g:200mL) mediante microscopía SEM.

En la **Figura I.4.17 A**, la ultraestructura de P-CC sin tratamiento con US revela una superficie porosa con huecos originalmente ocupados por el contenido celular, así como escamas formadas por las paredes celulares. En cambio, en la **Figura I.4.17 B** se observa que el pretratamiento con US generó una superficie altamente porosa, atribuible a la destrucción de las paredes celulares y la pérdida del contenido celular. Por otro lado, en la **Figura I.4.18 A** se observa, para P-P sin tratamiento con US estructuras de escamas altamente porosas constituidas por las paredes celulares. Sin embargo, al someter el polvo P-P a ultrasonido, no se observaron cambios significativos en la estructura de la pared celular, como se muestra en la **Figura I.4.18 B**.

Umaña et al. (2022) evaluó el efecto de la aplicación de US en la microestructura de vegetales crudos con diferentes tejidos y porosidad. Los resultados indican que el US tiene diferentes efectos dependiendo de la microestructura inicial de la materia prima. La aplicación de ultrasonido estimuló la penetración del solvente en las células vegetales, aumentando su tamaño y/o rompiendo las paredes celulares. Pero este efecto fue menos apreciable en una materia prima de alta porosidad, como es el caso de la berenjena. La berenjena se considera un material altamente poroso (García-Pérez et al., 2010).

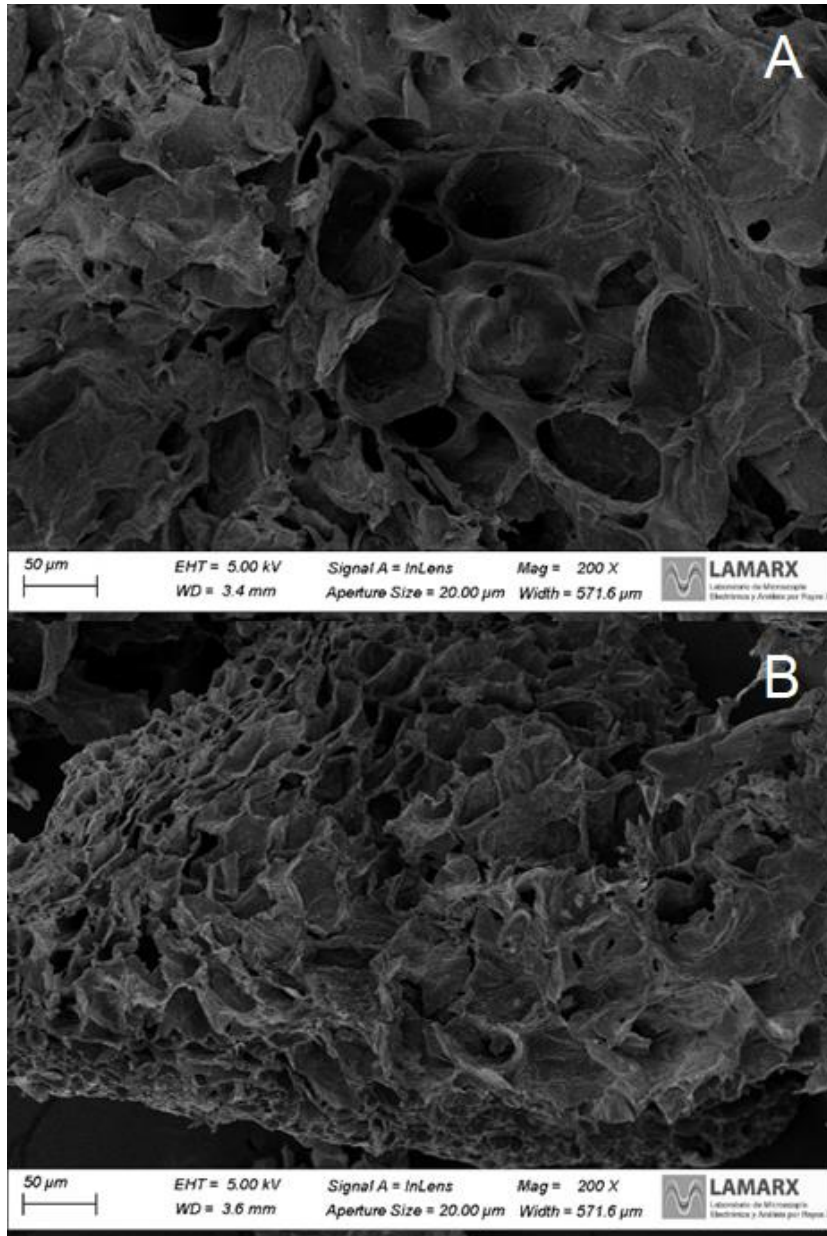


Figura I.4.17. Imágenes obtenidas por SEM del polvo de berenjena P-CC sin ultrasonido (A) y con ultrasonido (B). La barra horizontal inferior izquierda corresponde a la escala de 50µm.

Puig et al. (2012) evaluaron el efecto del US en la microestructura del tejido de berenjena deshidratado. Las imágenes de SEM mostraron que las células del endocarpio mantuvieron su individualidad y la pared celular intacta después del tratamiento de US a 45W mientras que, al aumentar la potencia del US a 90W, se observó un tejido con algunos espacios ocupados por aire. Las expansiones y contracciones alternadas, provocadas por la onda ultrasónica cuando viaja en un

medio, deberían promover no solamente la salida del agua sino también la degradación de las células del endocarpio. El efecto sobre la estructura de las células dependería de la potencia ultrasónica aplicada. Cuanto mayor sea la intensidad acústica utilizada, se producirán compresiones y expansiones más intensas producidas por el US y mayor será el efecto sobre la microestructura interna de la matriz tisular.

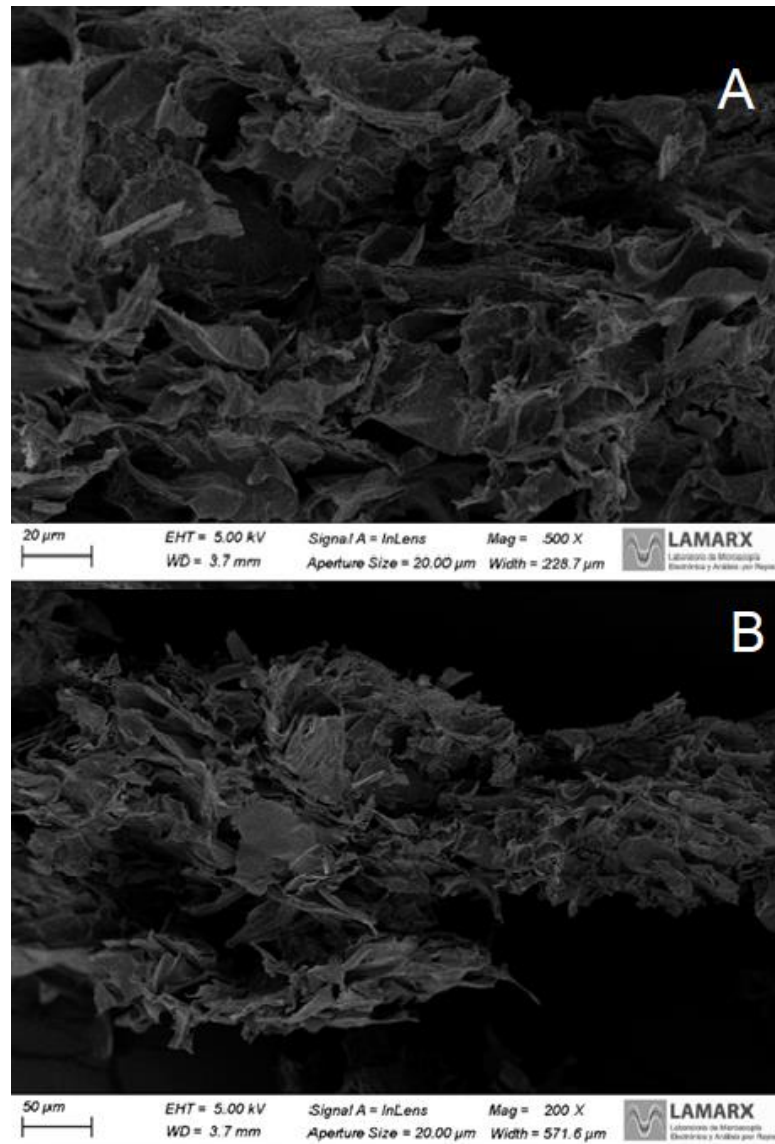


Figura I.4.18. Imágenes obtenidas por SEM del polvo de berenjena P-P sin ultrasonido (A) y con ultrasonido (B). La barra horizontal inferior izquierda corresponde a una escala de 20μm (A) y de 50μm (B).

Idrovo Encalada et al. (2019a) estudiaron el efecto del ultrasonido de alta potencia (20kHz, 750W) en la extracción de compuestos del polvo de zanahoria. Realizó una suspensión del polvo en agua (30g:200mL de agua), aplicando una intensidad de potencia de US de 10W/cm². Se determinó que el nivel de ácidos urónicos extraídos, correspondientes a la pectina liberada e índice de la destrucción de la pared celular, se incrementó con la amplitud (20% a 80%) y linealmente con el tiempo de proceso (de 5min a 25min) a amplitud constante. Al comparar los perfiles de liberación de los ácidos urónicos (pectinas), concluyeron que el daño en la pared celular aumenta con el tiempo de proceso y con la amplitud del US.

El uso de ultrasonido (US) se recomienda comúnmente como pretratamiento en la extracción de compuestos orgánicos de muestras sólidas. El uso de US como método de preparación de muestras para la extracción de sólidos-líquidos está muy extendido en muchos laboratorios y puede considerarse rápido y eficaz. Las extracciones basadas en US se emplean para aislar compuestos orgánicos débilmente unidos a partir de muestras sólidas, mostrando eficacia de extracción comparable a métodos más intensivos, pero con tiempos de extracción más rápidos y reducción del consumo de reactivos. En comparación con la digestión ácida, los procesos con US son más seguros, ya que no implican altas temperaturas ni presión durante la extracción. Además, se evita el uso de ácidos corrosivos concentrados. Este enfoque simplifica el procedimiento al requerir un menor número de operaciones, lo que minimiza los riesgos de contaminación (Filgueiras et al., 2000).

I.5. Conclusiones

- Entre los polvos de berenjenas elaborados, P-CC presentó mayores contenidos de pectina (23,9% AU) y de celulosa (27,2%) junto con menor contenido de lignina (9,7%) que P-P (14,1% AU, 6,8% celulosa, 12,1% lignina). Esta composición explica las mejores propiedades de hidratación de P-CC.
- RIA-PB, al ser el polvo obtenido por deshidratación del residuo insoluble en etanol de las brácteas del maíz, estaba formado por los polímeros de la pared celular, presentando una baja cantidad de las pectinas (4,5%) y un alto contenido de arabinosilanos (< 31,7%) y de celulosa (29,8%).
- Tanto P-CC como P-P mostraron actividades antioxidantes muy altas (capacidad de eliminación de radicales libres DPPH y de reducción del Fe³⁺ o FRAP), en particular P-CC. Estos resultados se pueden atribuir a los mayores contenidos de compuestos fenólicos extraíbles (solubles) así como de α -tocoferol, β -caroteno y luteína encontrados en P-CC.
- P-CC mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles (140,5mg/100g), cuyo principal componente identificado fue la delphinidina-3-rutinósido (71mg/100g).
- De los compuestos fenólicos extraíbles, P-P mostró mayor contenido (79% del total) de ácido cafeoilquínico (50,1mg/100g) que P-CC (27mg/100g), este último corresponde al 29% del total hallado en P-CC.
- El ferulato esterificado también estuvo presente en los polvos de berenjena, donde P-CC (185mg/100g) presentó mayor concentración que P-P (101mg/100g), encontrándose también dímeros (12,85 y 6,7mg/100g) y trímeros (4,3 y 6,4mg/100g) de ferulato entrecruzante.

Según Bernhardt et al. (2019), el residuo insoluble en etanol de las brácteas del maíz, deshidratado, RIA-PB, contiene también ácido ferúlico (18,64mg/100g polvo), de los cuales, 8,102mg/100g polvo correspondieron al dímero de ferulato y 6,139mg/100g polvo

correspondieron a monómeros de ferulato, mientras que se encontraron trímeros en menor proporción.

- En el rango de concentración de 5 – 500 ppm estudiado, los compuestos fenólicos extraíbles obtenidos de P-CC no mostraron citotoxicidad, mientras que los compuestos fenólicos extraíbles de P-P dieron una disminución de la viabilidad de células HepG2 y efecto antitumoral con un CC_{50} de 133,2 ppm. Esto podría explicarse por el alto porcentaje (79%) de ácido cafeoilquínico presente en los compuestos fenólicos extraíbles de P-P, cuya citotoxicidad se ha reportado en bibliografía en relación a su potencia anticancerígena, en comparación con un 29% de ácido cafeoilquínico presente en los compuestos fenólicos extraíbles de P-CC, que además contiene mayoritariamente delfinidina 3-rutinósido (71%), sin citotoxicidad reportada.
- Bajo el pretratamiento con ultrasonido de alta potencia (US), se observó un mayor daño en la estructura de la pared celular para el polvo P-CC que para P-P. Los mismos podrían someterse a tratamiento de US para facilitar la obtención de biocompuestos de interés, utilizando menor proporción de solvente extractivo y tiempos reducidos de extracción.
- Los polvos de la pulpa (P-P) y de las cáscaras y cálices (P-CC) de la berenjena podrían valorizarse como aditivos alimentarios naturales y como fuentes de pectinas.
- El residuo insoluble en etanol de las brácteas del maíz, deshidratado, RIA-PB, obtenido con un rendimiento del 67% a partir de las brácteas secas, podría aplicarse a recuperar las pectinas (4,5% AU) como paso previo en la extracción secuencial de los biopolímeros mayoritarios (arabinoxilanos y celulosa) para la valorización de este residuo agroindustrial.
- Debido al contenido de ácido ferúlico esterificado, tanto en P-CC, P-P como en RIA-PB, los métodos de extracción de pectinas que se apliquen en el presente trabajo de tesis deberán tener una etapa de hidrólisis alcalina de estos ésteres para liberar las respectivas pectinas, además de aquellas solubles en agua y entrecruzadas por ión calcio.

Capítulo II

Parte I. Extracción de fracciones enriquecidas en pectina a partir de las brácteas del maíz

Parte II. Extracción de fracciones enriquecidas en pectina y polifenoles a partir de los residuos del fruto de la berenjena

II.1. Introducción

Como se mencionó en el **Capítulo I**, la pectina es un componente obtenido principalmente a partir de frutas y sus subproductos del procesamiento, en particular de la cáscara y el orujo de frutas (Kumar et al., 2023). Para la extracción de la pectina desde la matriz de la pared celular, es necesario enumerar los tipos de unión química que la mantienen unida a la pared celular. Además de los enlaces mediados por iones calcio formados entre los dominios del HG de las macromoléculas de pectina vecinas, enlaces que son de naturaleza física entre cabezas aniónicas de carboxilato (fuerzas electrostáticas y puente de hidrógeno en una unión cooperativa) (Braccini y Perez, 2001), se puede encontrar un mecanismo de entrecruzamiento químico adicional. Los enlaces covalentes que se pueden encontrar en las pectinas incluyen productos de acoplamiento fenólicos, ésteres y amidas de uronoil y diésteres de borato del RG-II (Fry, 2011). Algunas especies como la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y la espinaca (*Spinacia oleracea*), de la familia *Amaranthaceae*, implican la formación, catalizada por peroxidasa, de ésteres diméricos de feruloil (puentes ferulatos) entre las cadenas laterales de la pectina (Ara y Gal del RG-I) (Moore et al., 2008). Estas uniones covalentes se concentran en la laminilla media, especialmente en las esquinas tricelulares, estabilizando las células contra la separación intercelular (Waldron et al., 1997; Jarvis et al., 2003). Esto incide en la resistencia del tejido a la cocción (Parr et al., 1997; Marry et al., 2006). Los puentes iónicos de Ca^{2+} se rompen mediante el tratamiento con agentes quelantes específicos como el CDTA y no específicos como el EDTA, oxalato. Los puentes éster de ferulato se hidrolizan mediante tratamiento alcalino (Na_2CO_3 , NaOH , KOH) (Fry, 1986) o con feruloilesterasa (Fry, 1986; Micard et al., 1994).

El proceso de extracción de pectina es continuo y comprende la hidrólisis de polisacáridos de la pared celular y/o de enlaces covalentes y físicos que relacionan distintas macromoléculas de pectina, seguido del aislamiento de la pectina del tejido vegetal por su disolución en el disolvente, mediante un procedimiento físico-químico que consta de múltiples etapas, donde factores como la temperatura, el pH, las propiedades del disolvente, las características de la fuente y la duración de la extracción influyen en la solubilización de la pectina, así como en su hidrólisis y extracción. Estas condiciones requieren altas proporciones de líquido a sólido, grandes cantidades de solventes,

tiempos largos, incluida una alta utilización de energía y de agua, todo lo cual resulta en un impacto ambiental (Kumar et al., 2023).

Se han desarrollado múltiples métodos, tanto simples como alternativos, para extraer pectina. Los métodos individuales generalmente involucran extracciones ácidas o alcalinas. Por otro lado, los métodos alternativos hacen referencia al empleo de extracción enzimática o US para mejorar el rendimiento y/o reducir el tiempo de extracción de la pectina en comparación con los métodos simples que utilizan agua y medio ácido o alcalino (Cui et al., 2021).

En el caso de los biopolímeros de gran tamaño y complejidad estructural como la pectina, los métodos de extracción ejercen una influencia significativa en la composición, las propiedades estructurales, fisicoquímicas y bioactivas de las pectinas, que determinan su aplicabilidad y valor en el mercado. Tradicionalmente, el grado de esterificación y el contenido de GalA, como ya fuera mencionado, influyen en las aplicaciones de la pectina como agente gelificante y espesante debido a su diferente influencia en el mecanismo de formación del gel de pectinas (Marić et al., 2018). Los productos comerciales de pectina como se menciono anteriormente requieren un alto contenido de GalA (mayor al 65%) y un grado específico de metilesterificación (DM), mayor o igual al 50% para las pectinas altamente metiladas (HM) y menor al 50% para las de bajo DM (LM) (Chandel et al., 2022).

II.1.1. Métodos Tradicionales de extracción

II.1.1.1. Extracción con agua

Los polisacáridos son macromoléculas polares que pueden extraerse mediante agua y otros disolventes polares. El método de agua caliente consiste en triturar las materias primas en agua caliente y extraerlas a una temperatura y por un tiempo determinados para realizar la separación de los polisacáridos solubles (Huang y Huang, 2020). Este método presenta varias ventajas, tales como su bajo costo y seguridad en la operación, así como la ausencia de contaminación con reactivos. Cabe destacar que también facilita la disolución conjunta de pigmentos, proteínas y otras sustancias, lo cual puede aumentar la dificultad en la separación si se busca obtener un producto puro. Por ello a menudo requiere múltiples extracciones y, como resultado, un tiempo de operación prolongado.

Es importante tener en cuenta que las altas temperaturas causan daños en la estructura original de los polisacáridos, especialmente, en el caso de las pectinas, incluyendo *peeling* (hidrólisis de cadenas laterales del RG-I y RG-II) y reacciones de β -eliminación (Fry, 1986). La β -eliminación química es uno de los mecanismos de degradación no enzimática de las pectinas. Esta reacción se acelera con el aumento del DM de la pectina, de la temperatura y del pH (4-6). Esta reacción de trans-eliminación entre unidades de GalA metilesterificado da como resultado la eliminación del átomo de H en C-5 y del residuo glicosídico en el C-4 del monómero de GalA, lo que lleva a la formación de un compuesto insaturado que absorbe a 235nm (Diaz et al., 2007). Por otro lado, el calentamiento a pHs menores a 4 ó 3 produce la hidrólisis de los enlaces glicosídicos que mantienen unidos los monómeros componentes del HG y del RG, disminuyendo el peso molecular de las pectinas (Ishii, 2015).

Los factores que influyen en la velocidad de extracción de los polisacáridos incluyen la temperatura de extracción, la cantidad de agua utilizada, la relación entre sólidos y líquidos (solvente extractivo), el tiempo y el número de ciclos de extracción, entre otros (Mao et al., 2019; Huang y Huang, 2020).

II.1.1.2. Extracción en medio ácido

El método de extracción ácida implica la inmersión del material vegetal en una solución de ácido mineral fuerte, en condiciones típicas que incluyen un pH de 1 a 3, una temperatura de 80-100°C y un tiempo de 0,5-6 horas con agitación continua (Khedmat et al., 2020). Este proceso tiene como objetivo destruir la pared celular de las materias primas. La elevada temperatura contribuye aún más a la alteración de la pared celular, lo que facilita la difusión del ácido y la liberación de la pectina de la matriz vegetal. En condiciones ácidas, las células vegetales se hinchan y las paredes celulares se desintegran, liberando así los polisacáridos vegetales (Cui et al., 2021).

Este método ofrece la ventaja de lograr una alta tasa de extracción. Sin embargo, presenta desventajas, como la hidrólisis del polisacárido y cambios en su estructura original. Una concentración excesiva de ácido puede romper fácilmente los enlaces glicosídicos y dañar la estructura del polisacárido. La temperatura de extracción es elevada, lo que implica requisitos

operativos exigentes, y el tiempo de extracción no debería ser excesivamente largo (Kumar et al., 2023). Como se mencionó anteriormente, la alta temperatura favorece las reacciones de β -eliminación, mientras que el medio ácido fuerte, por hidrólisis, favorece el *peeling* y también la hidrólisis de los enlaces glicosídicos del HG (Fry, 1986).

Es importante destacar que los ácidos orgánicos suelen ser menos destructivos y provocan una menor despolimerización catalizada por protones en la estructura de la pectina. En resumen, factores como el tipo de ácido, la temperatura de extracción, la relación líquido-sólido, el tiempo de extracción y la concentración de ácido (pH) influyen en el rendimiento de extracción de la pectina (Wandee et al., 2019).

II.1.1.3. Extracción en medio alcalino

La pectina también puede ser extraída de la pared celular utilizando soluciones alcalinas con un rango de pH de 9-13 y temperaturas entre 20 y 80°C, acompañadas de agitación continua (Zhang et al., 2018). Los iones hidróxido presentes en soluciones alcalinas inducen la hinchazón de la pared celular, interrumpiendo los enlaces puente de hidrógeno intermoleculares que median la interacción de la celulosa y otros polisacáridos y, además, hidrolizan los enlaces éster que conectan los polisacáridos de la pared celular entre sí y con la lignina (Wandee et al., 2019).

Los enlaces covalentes que se pueden encontrar en las pectinas (acoplamiento fenólicos, ésteres y amidas de uronoil y diésteres de borato) pueden ser hidrolizados en medio alcalino (Fry, 2011). El tratamiento alcalino en frío (< 20°C) (Na₂CO₃ 1M, NaOH 0,5M, KOH 1,5M) hidroliza sólo los enlaces éster mientras que suprime la posibilidad de que ocurra la reacción de β -eliminación y además se evita el *peeling* si es que la extracción se realiza en presencia de un agente reductor o bajo nitrógeno. En estas condiciones de temperatura, el NaOH o KOH 4M y 6M actúan además como solventes caotrópicos, rompiendo así, específicamente, los puentes de hidrógeno múltiples por los cuales interaccionan la celulosa con la hemicelulosa en la pared celular. Por el contrario, en combinación con temperaturas más altas y en presencia de aire, un medio alcalino fuerte (NaOH, KOH) no solamente hidroliza los enlaces éster, como los puentes ferulato, sino que también rompe

los enlaces físicos puente de hidrógeno e hidroliza los enlaces glicosídicos, mientras que también ocurre el efecto *peeling* (Fry, 1986; Gerschenson et al., 2021).

Bajo condiciones alcalinas, las cadenas de pectina pueden también degradarse a través de reacciones de β -eliminación que específicamente rompen los enlaces glicosídicos adyacentes a las unidades de GalA metilesterificado (Mao et al., 2019). En comparación con la extracción ácida, la extracción alcalina libera la pectina al solubilizar redes poliméricas, especialmente aquellas de materiales hemicelulósicos. Además, la pectina adsorbida en la superficie de las microfibrillas de celulosa se extrae más fácilmente, lo que mejora los rendimientos (Broxterman y Schols, 2018). Asimismo, la extracción alcalina tiende a producir pectina con un bajo grado de metoxilación, derivado de la hidrólisis de los ésteres carboxilato de metilo del HG, y conserva las cadenas laterales de azúcares neutros (Cui et al., 2021).

El método alcalino guarda similitud con el método ácido, ya que implica la destrucción de la pared celular de la planta para extraer polisacáridos, pero en condiciones alcalinas. En particular, los polisacáridos que contienen ácidos urónicos (GalA y ácido D-glucurónico) son más solubles en soluciones alcalinas. Las ventajas de la extracción alcalina incluyen condiciones de reacción suaves, altos rendimientos, un tiempo de extracción reducido, aplicabilidad a materias primas con baja viscosidad y con menor contenido de pectina en comparación con la extracción en medio ácido. Sin embargo, presenta desventajas, como la hidrólisis de los polisacáridos y la posibilidad de que una concentración excesiva de álcali a las temperaturas usualmente aplicadas ($> 20^{\circ}\text{C}$) rompa los enlaces glicosídicos, destruya la estructura de los polisacáridos, genere impurezas y aumente la viscosidad, dificultando la filtración (Cui et al., 2021; Kumar et al., 2023).

A las temperaturas usualmente aplicadas ($> 20^{\circ}\text{C}$) para la extracción, el tratamiento con KOH conduce a una menor degradación de las cadenas laterales de Ara y Gal, y la desramificación (*peeling*) de las cadenas laterales de Ara es más significativa en comparación con las cadenas laterales de Gal, lo que sugiere que los residuos de Ara son más susceptibles a las condiciones alcalinas que los residuos de Gal. La pectina extraída alcalinamente suele tener un peso molecular más bajo y su contenido de RG-I tiende a ser de 2 a 5 veces mayor en comparación con las pectinas extraídas mediante otros métodos convencionales de extracción. La reducción del peso molecular se

debe a la reacción de β -eliminación, que escinde los enlaces glicosídicos entre las unidades de GalA metilesterificado (Mao et al., 2019).

II.1.1.4. Extracción con agentes quelantes

Las extracciones de agentes quelantes se ven influenciadas por el número de enlaces iónicos presentes en la pectina del tejido vegetal, los cuales están relacionados con el contenido de Ca^{2+} y la distribución de grupos ácidos libres en el dominio HG de la pectina. Los agentes quelantes como el oxalato tienen la capacidad de solubilizar la pectina que presenta un bajo DM y un elevado peso molecular. Cuando se utilizan agentes quelantes en la extracción de pectina, estos pueden influir en la funcionalidad de la pectina, ya que pueden quedar remanentes del reactivo en la pectina extraída (Mao et al., 2019).

Cuando se desea determinar la composición original de la pared celular de un vegetal en estudio, el ácido ciclohexanodiaminotetraacético (CDTA) es el agente quelante más utilizado por ser específico para los complejos mediados por iones Ca^{2+} entre macromoléculas de pectina, es decir, si se obtuvo una fracción soluble en CDTA (temperatura $< 20^\circ\text{C}$) significa que solamente se extrajeron las pectinas originalmente entrecruzadas por Ca^{2+} . Cuando se recurre a otros agentes quelantes (ácido etilendiaminotetraacético, oxalato de sodio, hexametáfosfato) también se produce la extracción inespecífica de aquellas pectinas con interacciones iónicas diferentes a las mediadas por Ca^{2+} , y como a menudo se combinan con calentamiento ($70\text{-}120^\circ\text{C}$) y pH (3,5-7,5), los resultados no proporcionan evidencia real de pectinas interaccionantes por iones calcio, ya que el calentamiento también romperá las cadenas principales pécticas, independientemente del pH. También pueden ocurrir reacciones de β -eliminación debido a las temperaturas utilizadas combinadas con pH, afectando enlaces glicosídicos, y en menor medida hidrólisis de ésteres y ruptura de puentes de hidrógeno (Fry, 1986).

II.1.2. Métodos alternativos

II.1.2.1. Extracción con Ultrasonido de alta potencia (US)

El ultrasonido se refiere a las ondas sonoras con frecuencias superiores a 20kHz, más allá del umbral de detección auditiva humana, de 16Hz a 16kHz. Teniendo en cuenta el rango de frecuencias, las aplicaciones del ultrasonido pueden dividirse en ultrasonido de baja y alta energía.

Para el caso del ultrasonido de alta energía se utilizan frecuencias entre 20 y 100kHz y posee efectos sobre las propiedades físicas, mecánicas, químicas y/o bioquímicas del material o proceso en el que se aplican. Por esta razón posee una amplia variedad de aplicaciones tanto industriales como a nivel de laboratorio. La transmisión de ultrasonidos depende del medio en el que se propagan, ya sea sólido, líquido o gaseoso. El proceso de transmisión incluye ciclos de expansión (separación de moléculas) y compresión (unión de moléculas). En medios líquidos, se producen cavidades que se expanden y colapsan cuando la presión negativa ejercida supera la resistencia parcial a la tracción del líquido. Este fenómeno se conoce como cavitación (**Figura II.1.1**) (Bhargava et al., 2021; Picot-Allain et al., 2022).

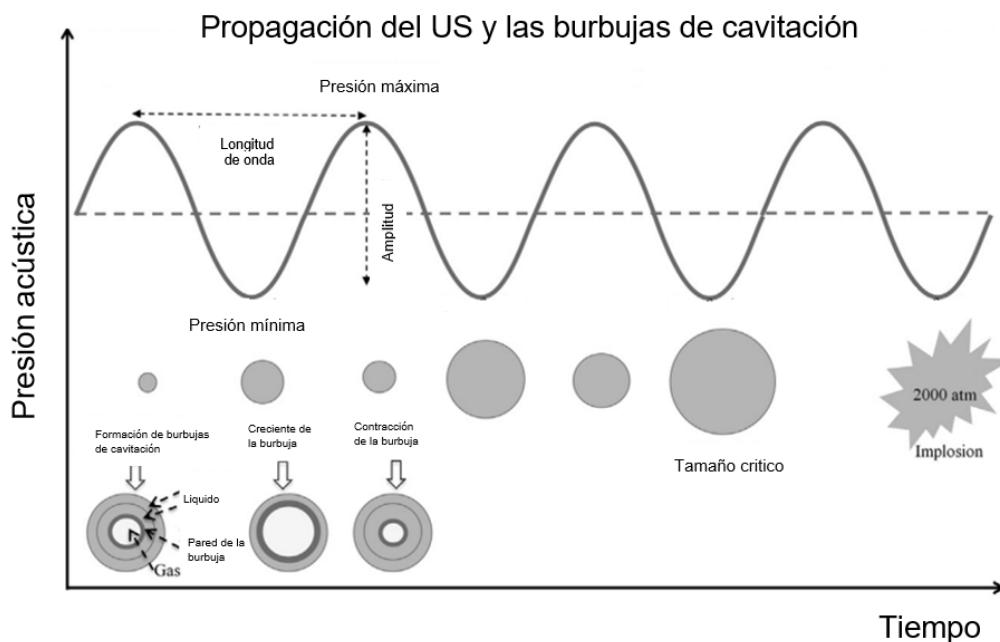


Figura II.1.1. Formación de las burbujas de cavitación (Lavilla y Bendicho, 2017).

Cuando las partículas sólidas están en el medio líquido, el colapso de las burbujas de cavitación puede ser simétrico o asimétrico, dependiendo de la proximidad de las burbujas a los sólidos. La cavitación simétrica provoca microturbulencias en las proximidades del sólido, lo que aumenta la tasa de transferencia de masa, mientras que cavitación asimétrica provoca microchorros del medio líquido hacia la superficie sólida, provocando rupturas y erosión en las superficies.

Estos efectos se ven reforzados por la presencia de defectos en el material, sólidos atrapados o incluso impurezas. La cavitación asimétrica es responsable de la disrupción de partículas y la destrucción de las paredes celulares (Bendicho y Lavilla, 2013). Además, el ultrasonido provoca una intensa agitación a nivel macroscópico que contribuye a la extracción asistida con ultrasonido.

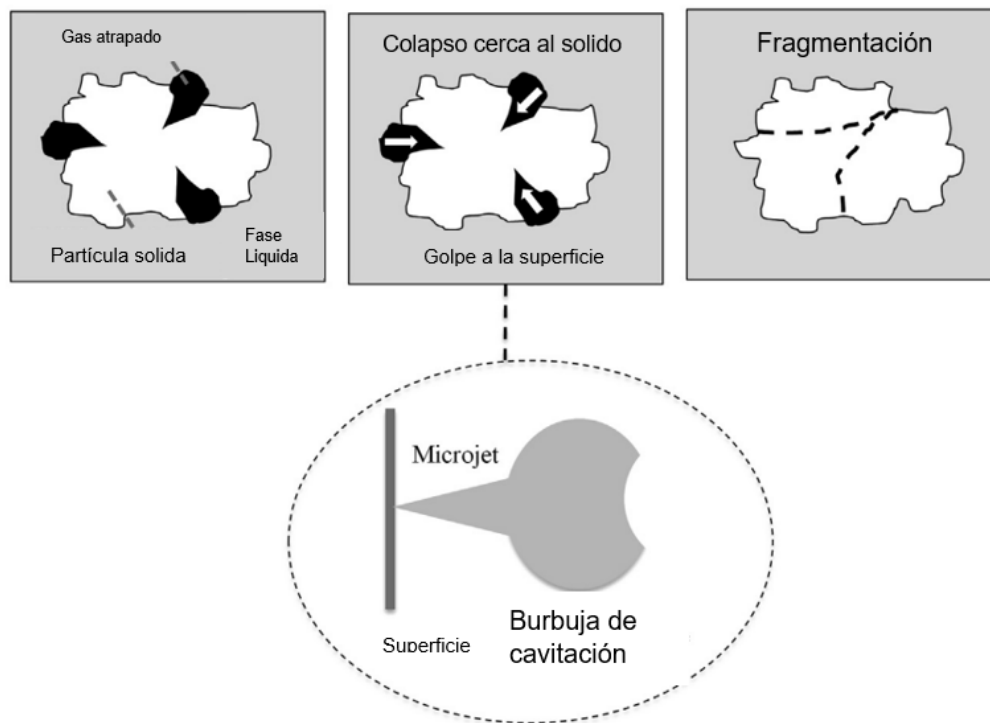


Figura II.1.2. Efectos de la cavitación sobre la superficie de un sólido (Lavilla y Bendicho, 2017).

Las burbujas de cavitación son clasificadas en dos tipos: estables y transientes. Las estables se someten a muchos ciclos de expansión (presión mínima) y compresión (presión máxima), tienen un tiempo de vida relativamente largo y oscilan no linealmente alrededor de un tamaño de equilibrio. Las burbujas transientes existen para períodos acústicos muy cortos (a veces menos de un ciclo), durante los cuales se expanden muy rápidamente hasta al menos el doble de su tamaño inicial antes

de colapsar violentamente en burbujas más pequeñas. La implosión supone liberación de toda la energía acumulada, generando condiciones determinadas de temperatura y presión capaces de acelerar la reactividad química del medio. La energía liberada, así como el choque mecánico asociados al fenómeno de implosión afectan la estructura de los materiales situados en el microentorno (**Figura II.1.2**) (Lavilla y Bendicho, 2017).

Dentro de los efectos físicos del ultrasonido causados en los materiales vegetales se han identificado la fragmentación, la erosión de las estructuras del vegetal, el aumento de la penetración de solventes en los canales y poros del material vegetal, la formación de poros en la membrana celular que liberan el contenido celular al medio líquido, efectos de flujo y destrucción de estructuras (Chemat et al., 2017).

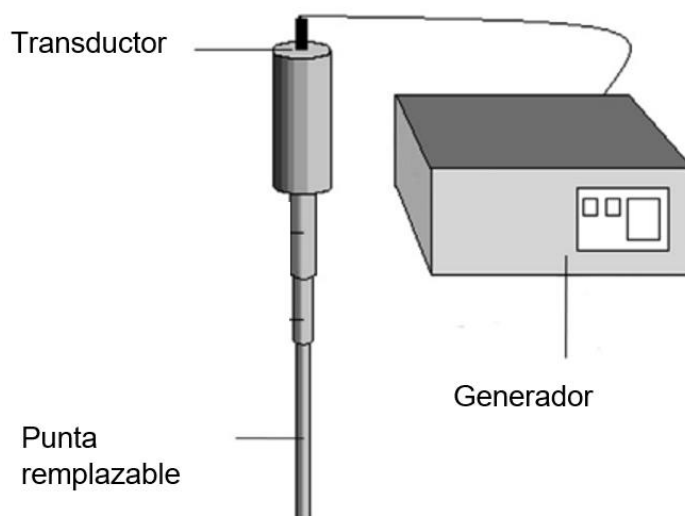


Figura II.1.3. Equipo de ultrasonido con sonda (Lavilla y Bendicho, 2017).

El ultrasonido de alta potencia (US) (**Figura II.1.3**) puede ser aplicado usando sondas de inmersión ultrasónicas con diferentes longitudes, diámetros y geometrías, según la aplicación (Picot-Allain et al., 2022). Se reconoce que las sondas dan lugar a un mejor rendimiento porque se transmite más energía al medio. Esto conduce a una reducción de los tiempos de extracción en condiciones suaves, así como a un aumento de la reproducibilidad. Sin embargo, pueden surgir diferentes problemas al utilizar sondas ultrasónicas para la extracción de compuestos bioactivos. Las sondas generalmente dan como resultado una menor productividad si se procesa una sola muestra

a la vez. Además, la extracción ultrasónica con sonda es propensa a pérdidas de compuestos volátiles debido al efecto de desgasificación mejorado. La sonicación con una sonda conduce al calentamiento del medio debido al calor generado. En última instancia, puede causar cambios en las características del medio y luego la cavitación. Por lo general, es necesario enfriar el recipiente de sonicación o, como alternativa, el uso del modo pulsado. Dado que puede ocurrir degradación de compuestos bioactivos, se debe realizar un control de las condiciones de sonicación (Lavilla y Bendicho, 2017).

Las vibraciones de alta frecuencia, la cavitación y los efectos térmicos, pueden acelerar la deformación y fractura de los tejidos, estructuras y células vegetales, y acelerar aún más la penetración de los disolventes en los tejidos, a fin de dispersar mejor los componentes activos de las células vegetales en el extractante, aumentando así el rendimiento. Los factores que influyen en la extracción mediante ultrasonido incluyen el tiempo ultrasónico, la frecuencia ultrasónica (por lo general, mayor eficacia de extracción a bajas frecuencias, aunque hay excepciones), la relación entre las masas de sólidos y líquidos, y la temperatura (Huang y Huang, 2020).

La extracción asistida por ultrasonido podría jugar un papel importante para la obtención de bioactivos de plantas, frutas, algas, tanto a escala de laboratorio como industrial; se ha identificado como una tecnología limpia que tiene gran potencial en una gran cantidad de procesos en la industria química y alimentaria. Tiene una gran aplicación para la extracción de diversos compuestos y biomateriales provenientes de la pared celular, aceites esenciales, proteínas, péptidos y moléculas bioactivas de importancia comercial como la pectina (Tiwari, 2015). Los productos naturales, que normalmente necesitan tiempos de extracción de varias horas o días por los métodos clásicos de extracción sólido-líquido, se pueden aislar con éxito por la extracción asistida por ultrasonido en cuestión de minutos (Lavilla y Bendicho, 2017).

No obstante, es importante destacar que una alta intensidad de potencia puede tener un efecto contrario, es decir, una disminución en el rendimiento. Esto se relaciona con altas concentraciones de volumen de burbujas que reducen la actividad de cavitación y con el efecto de saturación que se produce cuando el número de burbujas de cavitación alrededor de la punta de la sonda disminuye la transmisión de energía al medio de reacción. Además, la deformación no

esférica de las burbujas y su colapso pueden disminuir la eficiencia energética de las burbujas que colapsan. Un menor rendimiento podría estar relacionado con la degradación de la pectina extraída debido al efecto del US. Es fundamental diferenciar entre la densidad de potencia ultrasónica y la intensidad. En ambos casos, es esencial optimizar la potencia, ya que no se produce un aumento adicional en la velocidad de reacción más allá de las condiciones óptimas de potencia (Delmas et al., 2015; Wang et al., 2015).

II.1.2.2. Extracción con Enzimas (EAE)

La extracción de compuestos bioactivos se basa en la difusión molecular utilizando generalmente solventes orgánicos o, en el caso de las pectinas, se utilizan ácidos minerales, los cuales no son deseables, especialmente en la industria alimentaria, debido a sus efectos nocivos para la salud humana y el medio ambiente. La extracción asistida por enzimas evita el uso de estos medios extractivos, además de utilizar temperaturas de extracción más bajas (Žlabur et al., 2018).

Las enzimas se pueden obtener a partir de microorganismos, plantas y células de mamíferos. Se pueden utilizar en diversos procesos industriales, tanto en forma libre como inmovilizada. Algunas enzimas comunes utilizadas para la extracción de bioactivos incluyen celulasa, α -amilasa, β -glucosidasa, xilanasas, β -glucanasa, pectinasa y otras enzimas relacionadas. El tipo de enzima a utilizar dependerá del bioactivo a extraer y de la materia prima (Fleurence et al., 1995).

Una extracción enzimática eficaz depende principalmente de la interacción enzima-sustrato, altamente específica. La enzima y el sustrato forman un complejo intermediario enzima-sustrato en el cual los enlaces en las moléculas del sustrato se rompen para finalmente dar lugar a la formación del producto. La adición de enzima aumenta la velocidad de reacción hasta que la concentración de sustrato se vuelve limitante. La interacción enzima-sustrato se ve afectada por parámetros como el tamaño de partícula del material vegetal, la concentración de la enzima, el tiempo de reacción, la temperatura, el pH y la relación sólido-líquido (Cheng et al., 2015). Para facilitar la máxima interacción de la enzima con el sustrato, estos parámetros deben establecerse en sus valores óptimos. A temperaturas por debajo de las óptimas, las enzimas muestran menos actividad, mientras

que a temperaturas más altas conducen a la degradación de las enzimas por desnaturalización, lo que reduce la eficacia en la extracción de los compuestos bioactivos (Nadar et al., 2018).

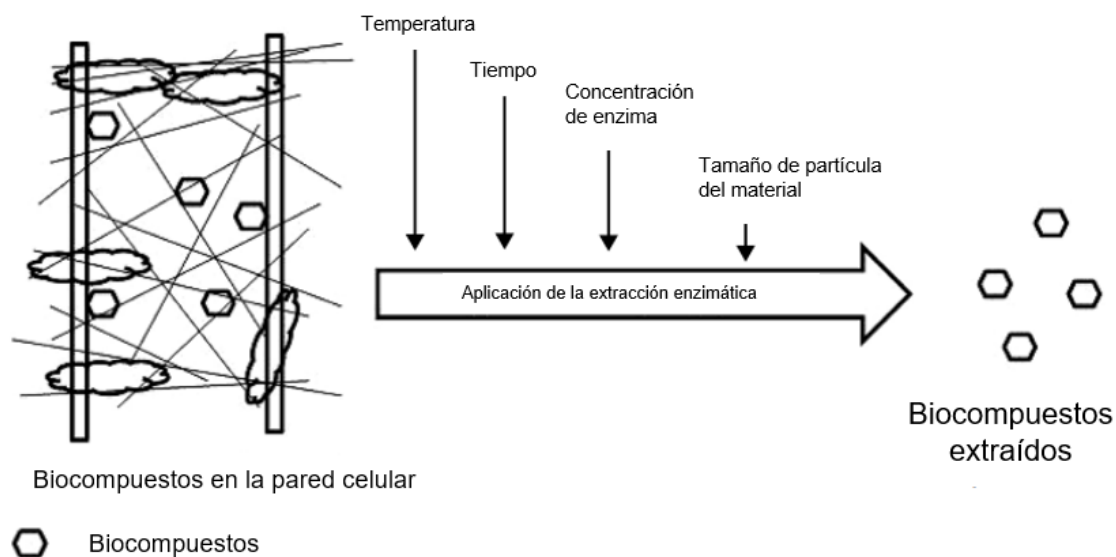


Figura II.1.3. Diagrama general para la extracción asistida por enzimas (Marathe et al., 2019).

En el **Capítulo I** se analizó la estructura de la pared celular vegetal y la variedad de polisacáridos complejos que la constituyen, tales como celulosa, hemicelulosas y pectina, así como también biopolímeros como la lignina y proteínas. Esta estructura es la que otorga estabilidad a las células vegetales y resistencia a la extracción de los componentes intracelulares. Por lo tanto, en la EAE se utilizan las enzimas con propiedades hidrolíticas específicas para romper o desagregar esta matriz, con el fin de tener acceso a los componentes bioactivos desde los espacios citosólicos e inclusive a aquellos polímeros deseados de las paredes celulares (Cosgrove, 2022).

Las enzimas degradan estos componentes de la pared celular y permiten la liberación del compuesto de interés. La interacción entre la enzima y el sustrato decide el grado de hidrólisis de estas barreras. El pretratamiento enzimático de la materia prima generalmente reduce el tiempo de extracción y el volumen de solventes, aumenta el rendimiento y mejora la calidad del producto. Para el caso de EAE de la pectina, se pueden distinguir dos enfoques posibles: (a) el uso de enzimas que degradan la pectina y ayudan a aislar fragmentos de ésta y (b) el uso de enzimas capaces de deconstruir la pared celular y de esta manera aislar la pectina (Marathe et al, 2019).

Dentro del grupo de las enzimas utilizadas para deconstruir la pared celular y facilitar la extracción de pectinas se encuentran las celulasas, responsables de la degradación de la celulosa al hidrolizar los enlaces β -1,4-glucosídicos. Existen celulasas industriales que son ampliamente utilizadas y que están disponibles comercialmente desde hace más de 30 años. Estas son enzimas inducibles, sintetizadas por varios microorganismos, incluidas bacterias y hongos, durante su crecimiento en materiales celulósicos. La celulasa consta de tres enzimas: β -glucosidasa, endo-1,4- β -D-glucanasa (endoglucanasa) y exo-1,4- β -D-glucanasa (exoglucanasa). Estas tres enzimas están involucradas en la hidrólisis de la celulosa por acción sinérgica (Ejaz et al., 2021). Dado que la acción enzimática depende del pH, se usan soluciones buffer en lugar de ácidos. Sin embargo, la especificidad enzimática de diferentes enzimas podría influir en el rendimiento de pectina. Además, los metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, los flavonoides y los alcaloides, presentes en los materiales vegetales, podrían interferir con las enzimas durante la extracción de pectina, reduciendo su actividad (Picot-Allain et al., 2021).

II.1.3. Combinación de tecnologías no convencionales

Cada vez se utiliza más la combinación de tecnologías innovadoras para extraer pectina, como el ultrasonido-enzimas (US-EAE). Esta combinación potencia la extracción enzimática, ya que la energía ultrasónica rompe las matrices y facilita las reacciones enzimáticas para liberar componentes específicos. A diferencia de esto, la extracción solo con enzimas no mejora el transporte de solventes, partículas objetivo y enzimas dentro o fuera de los medios, por eso, en la extracción enzimática se pueden usar otras operaciones, como la agitación, para favorecer la transferencia de masa. Entre estas operaciones, el US-EAE es una opción ideal, ya que actúa tanto sobre el medio que rodea a las partículas vegetales como sobre el interior de las matrices (Yang et al., 2018).

Aparte de esto, la energía ultrasónica con US-EAE incrementa las áreas de contacto entre etapas contribuyendo a la exposición de más lugares donde las enzimas podrían realizar la hidrólisis. La eficiencia de los US-EAE está influenciada por muchos parámetros, como el tipo de enzima, las concentraciones de enzimas con relación a la masa de material vegetal, la composición del solvente, la proporción de solvente a sólido, la temperatura y el tiempo de reacción (Castillo-Zamudio et al., 2021).

II.2. Objetivos

Objetivos principales

- Extracción de pectinas a partir de los polvos obtenidos de las brácteas del maíz, mediante técnicas amigables con el ambiente.
- Extracción de pectinas a partir de los polvos obtenidos de la cáscara, cáliz y pulpa de los frutos de la berenjena, mediante técnicas amigables con el ambiente.

Objetivos secundarios

- Desarrollar una técnica de extracción de pectinas que involucre el uso de ultrasonido de alta potencia (US) como pretratamiento para desintegrar la microestructura de la pared celular, en combinación con una posterior extracción adecuada según la composición química de cada tejido.
- Evaluar como posterior extracción el uso de solución acuosa de carbonato de sodio (1M) como extractante de la pectina de la cáscara, cáliz y pulpa de frutos de berenjena.
- Evaluar como posterior extracción el uso de solución acuosa de hidróxido de sodio (0,1M) seguido de hidrólisis enzimática con celulasa para obtener la pectina de las brácteas del maíz.
- Determinar el rendimiento de los procedimientos aplicados.
- Caracterizar químicamente y determinar los pesos moleculares de las fracciones pécticas aisladas.
- Caracterizar el comportamiento reológico de las fracciones pécticas aisladas.
- Evaluar la capacidad antioxidante y el perfil de compuestos antioxidantes coextraídos en las fracciones pécticas obtenidas de los polvos de la berenjena.

II.3. Materiales y Métodos

II.3.1. Reactivos

Se utilizó agua desionizada (Milli-Q™, EE.UU.). Los productos químicos fueron de grado analítico. Ácido D-galacturónico, D-glucosa, L-arabinosa, L-ramnosa, L-fucosa, D-xilosa, la D-manosa, la D-galactosa, estándar de seroalbúmina bovina, α -caroteno, β -caroteno, luteína, retinol, así como estándares de α -, β -, γ - y δ -tocoferol, ácido clorogénico (ácido 5-O-caffeoylquinico) y ácido ferúlico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) y 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), el cloruro de calcio dihidratado, y la celulasa de *Trichoderma viride* (C9442) fueron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE.UU.). Los demás reactivos utilizados fueron de Merck de Argentina.

II.3.2. Extracciones a partir del polvo RIA-PB del maíz

Al polvo RIA-PB, residuo insoluble en etanol de las brácteas del maíz deshidratadas, se le aplicó un proceso de extracción de pectinas a través de los siguientes pasos:

- Proceso sin US

a) Pretratamiento con NaOH 0,1M. b) Neutralización con buffer citrato. c) Tratamiento enzimático con celulasa en buffer citrato de sodio 0,05M (pH 5,20).

- Proceso con US

a) Tratamiento con US en agua. b) Pretratamiento con 0,1M NaOH. c) Neutralización con buffer citrato. d) Tratamiento US en buffer citrato de sodio 0,05M (pH 5,20). e) Adición de la enzima celulasa en buffer citrato de sodio 0,05M (pH 5,20).

II.3.2.1. Extracción con buffer citrato de sodio – enzimas

El pretratamiento con solución acuosa de NaOH 0,1M se realizó a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 30min (1g polvo:100mL solución). El residuo se separó por filtración y fue lavado con la solución buffer de citrato de sodio 0,05M por repetida dispersión en esta solución seguida de filtración, para ser el residuo neutralizado hasta pH 5,20.

El residuo fue separadamente suspendido en 500mL, 700mL, 850mL y 1000mL de una solución buffer citrato sódico 0,05M (pH 5,20) con la finalidad de evaluar la mejor relación sólido:solvente. Seguidamente se añadió celulasa (5mg:1g polvo) y la dispersión se mantuvo bajo agitación magnética durante 4h a 40°C constante. Posteriormente, se filtró la dispersión (filtro de fibra de vidrio Schleicher & Schuell, Alemania), el sobrenadante fue separado en un vaso de precipitados de vidrio y luego se agregó etanol al 96% v/v (1:2 v/v) para insolubilizar la pectina. Se dejó durante la noche a 8°C para la precipitación de la fracción enriquecida con pectina, la que luego se recuperó mediante filtración al vacío. La fracción aislada fue lavada con etanol, filtrada y finalmente liofilizada (Christ Alpha; Bomba de vacío Pfeiffer, Alemania), molida en un molino de cuchillas doméstico (DeLonghi, Argentina), y envasada en una bolsa Cryovac (Sealed Air, EE.UU.) con sellado al vacío, y almacenada a -30°C hasta su uso.

II.3.2.2. Tratamiento con Ultrasonido (US)

El tratamiento con US se realizó con un procesador de ultrasonido de 20kHz (Vibracell®, 750W, Sonics Materials Inc., EE.UU.) provisto de una sonda de punta plana de titanio de 13mm de diámetro. Para realizar el tratamiento de US, el RIA-PB (5,00g) fue dispersado en 500mL de agua antes del tratamiento alcalino o en buffer de citrato de sodio 0,05M (pH 5,20) después del tratamiento alcalino, con previo filtrado, lavado y neutralización, como se describió anteriormente. Se utilizó como contenedor un vaso de precipitados con un diámetro interno de 90mm y 125mm de altura (vidrio borosilicato, IVA, Argentina). El líquido alcanzó una altura de 95mm en el vaso de precipitados de vidrio, mientras que la sonda US se sumergió 20mm. La dispersión se sonicó a una amplitud de onda del 80% durante un tiempo neto de 20min con 5s "encendido" seguido de pulsos de 5s "apagado". La temperatura se determinó en función del tiempo a través de una termocupla conectada al US. También se registraron la energía y la potencia mostradas por el equipo, mientras que las realmente proporcionadas por el equipo US se calcularon como se explicó en el **Capítulo I sección I.3.13.**

II.3.3. Extracciones a partir de los polvos P-CC y P-P de berenjena

II.3.3.1. Extracción de las fracciones enriquecidas en pectinas

El tratamiento con US se realizó con un procesador de ultrasonido de 20kHz (Vibracell®, 750W, Sonics Materials Inc., EE.UU.) provisto de una sonda de punta plana de titanio de 13mm de diámetro, usando una amplitud del 80%. El polvo P-CC o P-P (5g o 10g) se dispersó en 200mL de agua desionizada contenida en un vaso de precipitados de 250mL (vidrio borosilicato, Duran Super Duty, forma baja, Alemania) de 70mm de diámetro interno y 95mm de altura. En este vaso de precipitados, el volumen total de dispersión alcanzó una altura de 58mm, mientras que la sonda de ultrasonido fue sumergida 20mm en el centro de la superficie del líquido. La dispersión fue dejada en contacto por 1h antes del tratamiento con US. El tiempo neto de procesamiento fue de 7, 10, 13 o 20min para 5g de P-CC o P-P, y de 10 o 13min para 10g de P-CC o P-P, trabajando con pulsos ultrasónicos de 5s "encendido" y 5s "apagado". Por lo tanto, se utilizaron 14, 20, 26 o 40 minutos de tiempo ultrasónico total, respectivamente. La temperatura se registró a través de una termocupla conectada al dispositivo de US y se lo sumergió 20mm en la dispersión acuosa junto a la pared del vaso de precipitados de vidrio. Se registraron los valores de energía y potencia mostrados por el equipo y la evolución de la temperatura con el tiempo de proceso (**sección I.3.13**).

II.3.3.2. Extracción con carbonato de sodio

Después del tratamiento con US, se retiró del equipo el vaso de precipitados con la dispersión acuosa y se añadieron 100mL de una solución acuosa de Na_2CO_3 0,3M para obtener una concentración final 0,1M. El sistema fue agitado durante 1h en un agitador magnético (Velp, Italia) a temperatura ambiente (23°C). A continuación, se filtró al vacío (filtro de fibra de vidrio Schleicher & Schuell, Alemania) para separar el residuo insoluble. Luego se neutralizó la solución filtrada utilizando una solución de ácido clorhídrico 1M y se le agregó etanol al 96% (relación sobrenadante / etanol 1:2 v/v), manteniendo el sistema a 4°C durante 12h hasta la precipitación completa de pectinas. Finalmente, la fracción de pectina obtenida por separado a partir de P-CC y P-P fue recolectada mediante filtración al vacío (filtro de fibra de vidrio, Schleicher & Schuell, Alemania), se lavó el residuo tres veces con etanol 96% v/v por resuspensión seguida de filtración, para finalmente

el residuo ser liofilizado, molido y envasado al vacío en bolsa de Cryovac (Sealed Air, EE.UU.). Por otro lado, para comparar, se obtuvieron por separado las respectivas pectinas de P-CC y P-P pero sin aplicar el pretratamiento de US. El rendimiento se calculó como gramos de pectina obtenidos por cada 100g de polvo de P-CC o P-P. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

II.3.4. Determinación del color de las fracciones extraídas

El color de las pectinas extraídas, liofilizadas y molidas fue determinado siguiendo la metodología mencionada anteriormente en la **sección I.3.6**.

II.3.5. Características Químicas de las fracciones extraídas

Para todas las determinaciones espectrofotométricas realizadas en el presente trabajo se utilizó un equipo Shimadzu UV-1800 (Japón). Una cantidad de cada una de las fracciones extraídas fueron disueltas en agua desionizada, agitadas hasta la disolución completa, obteniendo una solución homogénea. Se tomaron alícuotas de cada solución acuosa para realizar cada una de las siguientes determinaciones químicas.

II.3.5.1. Ácidos Urónicos

El contenido de ácido urónico (AU) se determinó mediante el método espectrofotométrico de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) con ácido D-galacturónico como estándar, tal como se explicó en el **Capítulo I, sección I.3.8.1**.

II.3.5.2. Determinación de Proteínas

Las proteínas se determinaron de acuerdo con el ensayo espectrofotométrico de Lowry et al. (1951) utilizando seroalbúmina bovina como estándar, siguiendo el proceso experimental explicado anteriormente en el **Capítulo I, sección 1.3.8.4**.

II.3.5.3. Determinación de Carbohidratos Totales

El contenido de carbohidratos totales fue realizado mediante el método espectrofotométrico del fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), utilizando ácido D-galacturónico para la curva de calibración, siguiendo el proceso experimental explicado en el **Capítulo I, sección I.3.8.2.**

II.3.5.4. Determinación del Grado de Metilación (DM)

El contenido de metanol se determinó a través del método espectrofotométrico de Wood y Siddiqui (1971) y el grado de metilesterificación (DM) fue calculado como la relación porcentual entre los moles de metanol y los moles de AU en la muestra, siguiendo el proceso experimental explicado anteriormente en el **Capítulo I, sección I.3.8.6.**

II.3.5.5. Determinación del Grado de Acetilación (DA)

Tal como se explicó en el **Capítulo I, sección I.3.8.7** el contenido de acetato se determinó a través del método espectrofotométrico de Naumenko y Phillipoff (1992). El grado de acetilación (DA) fue calculado como la relación porcentual entre moles de acetato y moles de AU en una muestra dada (Broxterman y Schols 2017).

II.3.6. Determinación del perfil de Azúcares Neutros mediante cromatografía gaseosa (GC)

La muestra fue colocada en un vial con tapa de teflón y disuelta en ácido tricloroacético puro. El vial fue colocado en una estufa a 37°C durante 1h. Posteriormente se agregó agua destilada a fin de alcanzar una concentración 2M de TFA y se realizó la hidrólisis en una estufa a 120°C durante 90min. A continuación, el contenido del vial fue llevado a sequedad mediante el uso de corriente de aire, eliminando el ácido mediante lavados sucesivos con agua desionizada, seguidos de su evaporación. Los hidrolizados secos fueron dejados en un desecador al vacío durante toda la noche.

Para obtener los alditoles peracetilados se siguió la metodología descrita por Shea y Carpita (1988). La muestra seca hidrolizada se disolvió en hidróxido de amonio 1M, y se le añadió

borohidruro de sodio. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 2h y, a continuación, se agregaron gotas de ácido acético, para eliminar el exceso de borohidruro. Posteriormente, las muestras se descationizaron mediante la adición de resina Amberlite IR-120 (H+) o Dowex 50 (H+). La muestra fue filtrada y evaporada a sequedad. A continuación, se realizaron 5 lavados con metanol a fin de eliminar, en forma de borato de metilo, el ácido bórico generado. La muestra fue dejada en un desecador al vacío durante una noche. A continuación, las mezclas de alditoles fueron peracetiladas en viales cerrados con una solución de anhídrido acético:piridina (1:1), en estufa a 100°C por 45min. Después de enfriarse, los derivados se extrajeron con cloroformo:agua (1:1). Los extractos clorofórmicos se lavaron tres veces con solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con agua destilada. Finalmente, se eliminó el agua residual mediante filtración con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad bajo corriente de aire. Los residuos resultantes se redisolviaron en 20µL de cloroformo antes de ser inyectados en el cromatógrafo de gases (CG).

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 5890A (EE.UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se trabajó con una relación de split entre 45:1 y 90:1. Se empleó nitrógeno como gas portador y se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30m x 0,25µm x 0,20µm. El flujo del nitrógeno fue de 1mL/min y una relación de split 90:1 con una presión en cabeza de columna de 104kPa (1,02atm o 15PSI). Los monosacáridos derivatizados como alditoles peracetilados fueron separados en una corrida isotérmica a 220°C, mientras que el inyector y el detector fueron fijados a 220°C.

II.3.7. Pesos moleculares determinados por Cromatografía de Permeación en Geles (GPC)

La distribución de pesos moleculares de cada fracción extraída fue determinada por GPC (*Gel Permeation Chromatography*). Las muestras se disolvieron al 0,25% p/p, separadamente, en solución acuosa de NaNO₃ 0,1M y se dejaron agitar durante la noche a temperatura ambiente, después de lo cual todas las muestras se filtraron (filtro de nylon de 0,22µm) e inyectaron al sistema GPC (Waters, MA, EE.UU.). El equipo usado para esta determinación fue un cromatógrafo HPLC Waters System (Suecia) equipado con un horno calefactor (TCM 5 CH, Singapur), un sistema de bombas (modelo M09DG2 455M, Waters, Milford, EE.UU.), un detector de índice de refracción (Waters 2414, Suecia) y un detector de arreglo de diodos DAD (Waters 2998, Suecia), contando

además con un *loop* de 100 μ L conectado a una pre-columna Ultrahydrogel (6x40mm) de tamaño de partícula de 10 μ m, una columna Ultrahydrogel 500 de tamaño de partícula de 10 μ m y una segunda columna Ultrahydrogel 1000 (7,8 x 300mm) de tamaño de partícula de 12 μ m (Waters, Japón), dispuestas en serie. La fase móvil fue NaNO₃ 0,1M a un flujo de 0,6mL/min. La temperatura fue mantenida constante a 40°C. Los estándares utilizados para la calibración de la columna fueron dextranos con masas moleculares entre 5200 y 668000Da (kit PSS, Waters, Alemania). Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos fueron procesados mediante el software Breeze Empower 2 (Suecia). Se calcularon el peso molecular promedio (*Mn*), el peso molecular promedio ponderado (*Mw*) y la distribución del peso molecular (*Mw/Mn*). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

II.3.8. Espectroscopia FT-IR

Las determinaciones fueron realizadas en un espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700 (Thermo Scientific Nicolet, MA, EE.UU.) equipado con un detector DTGS TEC. Para la preparación de la muestra se utilizó una pastilla de KBr anhidro. Se trabajó en el rango espectral entre 4000 y 400cm⁻¹. Se realizaron 64 barridos de porcentaje de transmitancia para cada espectro, con una resolución de 4cm⁻¹, ganancia 1 y apertura 100. La adquisición de los espectros y su procesado se realizó con el software OMNIC versión 7.3 (Thermo Electron Corp, EE.UU.).

II.3.9. Determinación de carotenoides y tocoferoles de las fracciones extraídas

Los contenidos de carotenoides, retinoides y de los isómeros del tocoferol fueron determinados de acuerdo con la metodología experimental mencionada en el **Capítulo I, sección I.3.10.**

II.3.10. Determinación del contenido de compuestos fenólicos de las fracciones extraídas a partir de los polvos de berenjena (P-CC y P-P)

II.3.10.1. Extracción y cuantificación mediante HPLC-DAD

El contenido de compuestos fenólicos de las fracciones extraídas de los polvos P-CC y P-P, se determinó mediante la metodología experimental mencionada anteriormente en el **Capítulo I** (sección **I.3.11.1**). Los espectros fueron registrados en el intervalo de 280-560nm, y se analizó a 280, 320, 360 y 520nm de longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción de los compuestos fenólicos. Los ácidos fenólicos se cuantificaron como ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico) a 320nm. Los resultados se expresaron como mg por 100g de fracción de pectina.

II.3.10.2. Identificación de fenoles mediante HPLC-ESI-microTOF/MS

Los análisis HPLC-ESI-microTOF/MS y HPLC-PAD se realizaron siguiendo la metodología experimental mencionada anteriormente en la **sección I.3.11.2**. Los picos se identificaron por medio de espectros UV, por los cromatogramas de iones extraídos de la corriente de iones en valores m/z correspondientes a los iones $[M + H]^+$ de los compuestos individuales investigados y por su fragmentación.

II.3.10.3. Cuantificación de Compuestos fenólicos enlazados covalentemente mediante HPLC-DAD

Los compuestos fenólicos esterificados se obtuvieron mediante la hidrólisis de cada una de las fracciones extraídas de los polvos P-CC y P-P siguiendo la metodología experimental mencionada anteriormente en la **sección I.3.11.3**, para luego ser analizados utilizando HPLC-DAD de fase reversa y HPLC-ESI-MS/MS. La cuantificación se realizó utilizando ácido ferúlico como estándar externo. Todos los análisis químicos se realizaron por triplicado.

II.3.10.4. Determinación y cuantificación de proantocianidinas mediante HPLC-DAD

Las proantocianidinas fueron determinadas usando la reacción de floroglucinólisis con catálisis ácida según lo reportan Basanta et al. (2016). Para ello se preparó una solución metanólica de HCl 0,1M, que contenía 50g/L de floroglucinol y 10g/L de ácido L-(+)-ascórbico, llamado reactivo de floroglucinólisis.

La muestra se la hizo reaccionar con dicho reactivo durante 20min en un baño de agua a 50°C. La reacción se detuvo colocando los viales en un baño de hielo y diluyendo el medio de reacción con una solución de acetato de sodio 40mM. Los aductos de floroglucinol se separaron cromatográficamente en una columna Luna C18 (250×4,0mm, tamaño de partícula de 5µm; Phenomenex, EE.UU.). El método utilizó un gradiente binario con ácido acético acuoso al 2,5% v/v (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B), a un caudal de 1mL/min. El gradiente lineal comenzó con 3% B, a los 5min 5% B, a los 15min 16% B, a los 45min 50% B y a los 52min 3% B y se mantuvo en condición isocrática hasta 57min. Los productos de flavan-3-ol se estimaron utilizando sus factores de respuesta en relación con la catequina, que se la utilizó como estándar cuantitativo.

II.3.11. Capacidad Antioxidante de las fracciones extraídas

II.3.11.1. Ensayo del FRAP

La capacidad de cada muestra para reducir al Fe(III) se determinó mediante el método FRAP, siguiendo la metodología experimental descrita en el **Capítulo I, sección I.3.9.1**. Los resultados se expresaron en mg de ácido L-(+)-ascórbico (AA) por cada 100g de fracción extraída.

II.3.11.2. Ensayo del DPPH

Se determinó la capacidad para capturar radicales libres de cada una de las fracciones extraídas mediante el método del DPPH, siguiendo la metodología experimental descrita en el **Capítulo I, sección I.3.9.2**. Los resultados se expresaron en mg de ácido L-(+)-ascórbico (AA) por cada 100g de fracción extraída.

II.3.12. Caracterización Reológica de las fracciones pécticas de berenjena

Se prepararon sistemas acuosos de 1,50 o 2,0% p/v de las fracciones extraídas de berenjena. Para ello, se disolvieron en agua desionizada con la ayuda de un vórtex las cantidades correspondientes de cada fracción, previamente pesadas en una balanza analítica, seguido de calentamiento en baño de agua a 85°C con agitación y enfriamiento hasta temperatura ambiente. El volumen final se completó con la adición de suficiente cantidad de agua desionizada, seguido de homogeneización en vórtex. Los sistemas acuosos obtenidos se dejaron reposar durante 24h antes de proceder a las mediciones reológicas.

II.3.12.1. Efecto de iones calcio

Para determinar el efecto de la concentración de iones de calcio, se desarrollaron sistemas acuosos que contenían 1,50% p/v de la fracción extraída de berenjena como se explicó anteriormente, pero el volumen final (V_T) fue completado a $V_T - 100\mu\text{L}$. A continuación, se calentó el sistema acuoso en baño de agua a 85°C, y luego se añadió, agitando, un volumen de 100 μL de una solución de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) de concentración suficiente para alcanzar la cantidad de ion calcio requerida en el sistema final de cada fracción péctica extraída (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50mg de calcio/g UA). Inmediatamente, estando a 85°C, se dispensó cada sistema acuoso en un molde plástico horizontal del mismo diámetro que el de la geometría que se utilizará en el reómetro. Se dejó reposar por 24h antes de la medición.

II.3.12.2. Ensayos de flujo

Los sistemas acuosos al 1,50% p/v o 2,0% p/v de fracciones pécticas aisladas de berenjena fueron sometidos a un estudio de flujo, usando el modo rotacional del reómetro. Las curvas de flujo (esfuerzo de corte *versus* velocidad de corte: 0,01-300s⁻¹) se registraron durante 50min en un reómetro de cizalla Paar Physica (modelo MCR300, Anton Paar, Austria) utilizando una geometría de cono y plato (40mm diámetro; 2° ángulo). La temperatura se mantuvo constante a 8°C o 20°C a través de un sistema Peltier (Viscotherm VT2 Physica, Austria). Cada punto experimental fue registrado una vez alcanzado el estado estacionario. Se estableció un tamaño de gap de 500 a

1000 μm . Los análisis se llevaron a cabo por triplicado. La ley de la Potencia o de Ostwald (Ecuación II.3.4) y el modelo de Herschel-Bulkley (Ecuación II.3.5) fueron considerados para el ajuste de datos registrados:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación II.3.4}$$

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n + \tau_0 \quad \text{Ecuación II.3.5}$$

donde τ es el esfuerzo de corte (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte (s^{-1}), K es el coeficiente de consistencia (Pa s^n), n es el índice de flujo (adimensional) y τ_0 es el umbral de fluencia (Pa).

II.3.12.3. Ensayos dinámicos u oscilatorios

Los sistemas acuosos al 1,50% o 2,0% p/v se ensayaron en modo oscilatorio o dinámico a 8°C y 20°C constantes. Los sistemas al 1,50% p/v que contenían calcio en las concentraciones indicadas anteriormente (sección II.3.12.1) se midieron a una temperatura constante de 20°C. En el reómetro y con la geometría antes mencionada, se realizaron ensayos dinámicos de cizallamiento en cada muestra. Se registró el espectro mecánico respectivo a deformación relativa (*strain*) constante, esto es, el módulo de almacenamiento o elástico (G'), el módulo de pérdida o viscoso (G'') y la $\tan \delta$ (G''/G') o tangente del ángulo de desfase (δ) en función de la frecuencia angular (rad/s).

Para esto, se realizó un ensayo previo de barrido de amplitud (esfuerzo versus deformación relativa o *strain*) a una frecuencia constante de 0,5Hz para seleccionar el valor de deformación relativa (*strain*) constante en la región viscoelástica lineal (relación lineal entre el esfuerzo o *stress* y la deformación relativa o *strain*) con la que trabajar para obtener luego el espectro mecánico. Cada punto experimental se registró después de que se alcanzó el estado estacionario. Se estableció un tamaño de gap de 500 a 1000 μm . Los registros se realizaron por triplicado.

II.3.13. Caracterización Reológica de las fracciones enriquecidas en pectinas extraídas de las brácteas del maíz

La caracterización reológica se llevó a cabo a través de ensayos de flujo o rotatorios y ensayos oscilatorios o dinámicos utilizando el reómetro mencionado en las secciones anteriores. Se estableció un tamaño de gap de 1000 μ m. Los datos fueron registrados en estado estacionario.

Para el estudio reológico se trabajó con una solución acuosa conteniendo 2,0% p/v de cada fracción péctica extraída de RIA-PB, a la que se le agregó 5mg de Ca²⁺ o el número equivalente de moles de Fe²⁺ ($1,25 \times 10^{-4}$) por gramo de AU. En un tubo de vidrio graduado de 10mL, la alícuota pesada de cada fracción péctica extraída de RIA-PB fue dispersada en un volumen de agua desionizada alternando agitación en vórtex y calentamiento (70°C) en un baño de agua (Julabo, Alemania). En caliente y bajo vortexeado intenso, se agregaron 100 μ L de la solución acuosa con suficiente concentración de CaCl₂·2H₂O o de FeSO₄·7H₂O (pH 6,0) para alcanzar la concentración de iones Ca²⁺ o de Fe(II) requerida para el estudio de gelificación. Finalmente, el volumen total de la solución se completó mediante la adición de agua desionizada a 70°C seguida de agitación en vórtex. Una alícuota de cada solución se transfirió inmediatamente a la plataforma horizontal estacionaria del reómetro a temperatura de 85°C, donde se utilizó una geometría de platos paralelos dentados de 25mm de diámetro (PP25/S). La temperatura se controló a través de una unidad Peltier y se evitó la evaporación mediante el uso de una cámara. Los módulos elástico (G') y viscoso (G'') se midieron en función de la temperatura, el tiempo y la frecuencia para cada fracción de pectina, de acuerdo con los siguientes pasos:

- a) un período isotérmico (85°C) de 10s a 0,5Hz de frecuencia constante;
- b) una rampa de enfriamiento desde 85,0 hasta 10,0°C a una velocidad de 5,0°C/min (0,5Hz de frecuencia y 0,02% de deformación relativa o *strain* constantes);
- c) un período isotérmico (10°C) de 900s (0,5Hz de frecuencia y 0,02% de deformación relativa o *strain* constantes);
- d) un barrido de frecuencia desde 0,1 hasta 10Hz en la condición viscoelástica lineal (deformación constante del 0,02%) a 10°C;
- e) una rampa de calentamiento desde 10,0 hasta 85,0°C a una velocidad de 5,0°C/min (0,5Hz de

frecuencia y 0,02% de deformación relativa o *strain* constantes).

Las temperaturas de gelificación y de fusión se determinaron, respectivamente, en los pasos (b) y (e). Durante la rampa de enfriamiento (paso b), la temperatura de gelificación corresponde al punto donde los valores de G'' cruzan por debajo de los de G' , después de lo cual el módulo elástico está por encima de G'' . Por el contrario, la temperatura de fusión corresponde al punto donde los valores de G' se cruzan por debajo de los de G'' determinados a partir de la rampa de calentamiento (paso e).

El rango viscoelástico lineal se encontró previamente a través de ensayos de barrido de amplitud (esfuerzo versus deformación relativa o *strain*) separadamente realizados a una frecuencia constante de 0,1; 1 y 10Hz, respectivamente, para cada fracción péctica ensayada con la menor y la mayor concentración de Ca^{2+} y Fe(II).

II.3.14. Análisis de las fibras por microscopía de fuerza atómica (AFM) de las fracciones enriquecidas en pectinas extraídas de las brácteas del maíz

Las imágenes de AFM se adquirieron en "*tapping mode*", utilizando puntas de silicio con una constante del resorte de 42N/m y una frecuencia de resonancia de 32kHz. Se utilizó un Bruker Multimode 8 SPM (Santa Bárbara, CA, EE.UU.) y un controlador NanoScope V (Santa Bárbara, CA, EE.UU.). Para preparar la muestra para la imagen de AFM, se depositó un volumen de 5 μ L de cada solución de muestra con una concentración entre 2,5 μ g/mL y 1 μ g/mL, debido a la diferente solubilidad de las muestras, sobre discos de mica moscovita grado V1 (Ted Pella, Inc.) de 10mm de diámetro, previamente escindidos con cinta adhesiva y pegados a discos de acero. Luego, los discos se secaron a condiciones de ambiente durante 24h para lograr la sequedad total. Los experimentos se llevaron a cabo en una sala de temperatura controlada a 25°C, con aislamiento de campana acústica y amortiguación activa de vibraciones.

Las imágenes fueron procesadas utilizando el software Gwyddion (Brno, República Checa). Las imágenes se aplanaron aplicando las siguientes herramientas: alinear filas, eliminar cicatrices y aplanar la base. Los granos se detectaron mediante umbrales y filtrados. Se excluyeron los granos

de menos de 6 píxeles de área o que tocaban el borde de la imagen. Para objetos esféricos, se determinó el diámetro de disco equivalente de cada partícula, que es el diámetro de un disco con la misma área proyectada que el grano. Las fibras como objeto fueron caracterizadas por la longitud del contorno. Estos conjuntos de valores se utilizaron como parámetros para un análisis estadístico para realizar los gráficos de diagramas de caja (*boxplot graphs*). Para este propósito, se adquirió y procesó un número suficiente de imágenes para analizar más de 150 partículas.

II.3.15. Potencial zeta y diámetro hidrodinámico medio de las fracciones extraídas de las brácteas del maíz

El potencial zeta y el diámetro hidrodinámico medio fueron determinados en las soluciones respectivas (0,02% p/v) de cada fracción péctica extraída de RIA-PB disuelta en agua desionizada y filtrada por 0,22 μ m. Se utilizó un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) provisto de un láser "rojo" de 632,8nm de gas He-Ne de 4mW y un ángulo de detección de 175°. Se utilizó una celda zeta capilar plegada con una escobilla lateral de cobre. Se realizaron diez mediciones para cada muestra, y las muestras se evaluaron por triplicado a una temperatura constante de 23°C.

II.3.16. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se informaron como la media aritmética y el desvío estándar para n replicados. Fueron analizados a través de ANOVA (<0,05) seguido del test de comparaciones múltiples de la diferencia menos significativa (LSD, *Least significant difference*). Se utilizó el software GraphPad Prism (versión 8, 2019, EE.UU.).

II.4. Resultados y Discusión

Parte I. Extracción de fracciones enriquecidas en pectina a partir de las brácteas del maíz

II.4.1. Rendimientos

El residuo insoluble en etanol de las brácteas del maíz, deshidratado (RIA-PB), obtenido con un rendimiento del 67% a partir de las brácteas secadas, se utilizó para la recuperación de pectinas (4,5% AU; **Tabla I.4.1**) durante la extracción secuencial de los biopolímeros mayoritarios (arabinoxilanos y celulosa; **Tabla I.4.1**) para la valorización de este residuo agroindustrial.

Debido al contenido de ácido ferúlico esterificado en RIA-PB (Bernhardt et al., 2019), los métodos de extracción de pectinas que se apliquen en este material deberán tener una etapa de hidrólisis alcalina de estos ésteres para liberarlas. Es por ello que, para la extracción de fracciones enriquecidas en pectina de las brácteas del maíz, a partir de RIA-PB obtenido en el **Capítulo I (sección I.3.3.1)**, se realizó un pretratamiento alcalino (0,1M NaOH; 30min; temperatura ambiente).

Bernhardt et al. (2019) determinó que las cáscaras del maíz deshidratadas y molidas (PB) estaban compuestas por un 70% de material insoluble en agua y que este residuo, por ser todo además insoluble en etanol, estaba entonces formado por los polímeros de la pared celular, rendimientos que coincidieron con los obtenidos en la presente tesis al obtener RIA-PB a partir de PB. Se encontró un contenido de AU del 4,5% (**Tabla I.4.1**), el cual estuvo constituido por las fracciones solubles en CDTA y en 0,1M de Na₂CO₃ (Bernhardt et al., 2019). El CDTA extrajo pectinas reticuladas con iones calcio mientras que la solución acuosa de Na₂CO₃ permitió el aislamiento de pectinas ancladas en la matriz de la pared celular mediante enlaces covalentes tipo puentes diéster de ferulato (Bernhardt et al., 2019) y, posiblemente también, uronoil ésteres (Fry, 2011). Además, también se encontraron algunas pectinas residuales con los AU liberados con las fracciones solubilizadas en KOH al 4% y al 24% (hemicelulosas) extraídas posteriormente. Este solvente alcalino fuerte es un solvente caotrópico que, por lo tanto, rompe los puentes de hidrógeno

entre las hemicelulosas y la celulosa (Fry, 1986). Además, el KOH también hidroliza los puentes éster (uronoil, ferulato) que mantiene asociadas las macromoléculas (Bernhardt et al., 2019). Por todo lo mencionado, fue necesario un pretratamiento alcalino con NaOH para hidrolizar los ésteres ferulato del RIA-PB para liberar la pectina, incluida la residual que se encontró retenida en la red de hemicelulosa-celulosa.

Posteriormente al pretratamiento con NaOH del RIA-PB, el residuo insoluble remanente fue colocado en agitación a 40°C durante 4h con celulasa (5mg/1g de RIA-PB). A períodos más largos de extracción (24h) no se produjeron mayores rendimientos.

Se estudió la relación polvo/solvente óptima para la extracción. Se aumentó el volumen de ácido cítrico/citrato de sodio (pH 5,2) desde 500mL hasta 1000mL, donde los rendimientos de extracción de compuestos enriquecidos en pectinas obtenidos se ven en la **Tabla II.4.1**. A medida que se aumentaba el volumen de extracción se obtenían rendimientos más bajos, lo cual podría deberse a que, al aumentar el volumen, existía una mayor dispersión del polvo en el líquido, disminuyendo la eficiencia del US y de la enzima. Se usaron volúmenes de solvente por encima de los 100mL por gramo de RIA-PB ya que, según lo indica el valor de SC (capacidad de hinchamiento: SC = 12,5mL **sección I.4.5**) reportado por Bernhardt et al. (2019) se necesitan volúmenes significativos de solución extractante para mantener el sistema lo suficientemente fluido durante la agitación y así asegurar una homogénea actividad enzimática en la matriz del RIA-PB. El mayor rendimiento se obtuvo para una relación 5g RIA-PB/500mL buffer cítrico/citrato, la cual fue utilizada para el estudio de la extracción de fracciones enriquecidas en pectinas utilizando US, aplicado antes y después del pretratamiento alcalino del RIA-PB.

El uso de US sobre la muestra se realizó en un sistema abierto mediante la aplicación de un pretratamiento a una frecuencia constante de 20kHz y a una amplitud del 80% con pulsos de 5 segundos "encendido" seguido de 5 segundos de "apagado" durante 20min de tiempo neto (**sección II.3.2.2**). Este tratamiento fue realizado antes y después del tratamiento alcalino, para garantizar una alteración o destrucción de la matriz de la pared celular del polvo RIA-PB generado por el tratamiento con US.

Tabla II.4.1. Rendimientos obtenidos en la extracción de fracciones enriquecidas en pectinas, a partir del residuo insoluble en etanol de las brácteas deshidratadas del maíz (RIA-PB).

Tratamiento ^a	Pectina (%)
MP 5g/500mL	2,4
MP 5g/700mL	2,0
MP 5g/850mL	1,8
MP 5g/1000mL	1,5
MP-US 5g / 500mL	4,0

^a gramos de RIA-PB / V mL de solución buffer de cítrico/citrato de sodio (pH 5,2).

El siguiente paso para realizar la extracción fue tratar la muestra con la enzima celulasa en buffer cítrico/citrato de sodio (pH 5,2), como se mencionó anteriormente. Las fracciones enriquecidas en pectinas obtenidas finalmente por precipitación con etanol, filtración y deshidratación fueron denominadas MP para aquellas extraídas sin tratamiento con US y MP-US. Teniendo en cuenta el rendimiento obtenido de MP-US (4%) y el contenido de AU determinado en MP-US (67%) (**Tabla II.4.2**), se calculó una extracción de 2,7% de AU contenidos en RIA-PB mediante el tratamiento combinado de US + Celulasa, el cual representa un 60% del contenido total de AU de RIA-PB (4,5%; **Tabla I.4.1**). Por el contrario, teniendo en cuenta el rendimiento de MP (2,4%) y su contenido de AU (63%) (**Tabla II.4.2**), se obtuvo una extracción de 1,5% de AU contenidos en RIA-PB (**Tabla I.4.1**) mediante el tratamiento sin US con buffer citrato + Celulasa, representando un 33% del contenido total de AU de RIA-PB (4,5%; **Tabla I.4.1**). Por lo tanto, el pretratamiento de US fue imprescindible para duplicar el rendimiento de extracción (33% a 60% de AU) en RIA-PB. Se observó un efecto positivo de la acción combinada de US y la enzima celulasa, luego del pretratamiento alcalino con NaOH. La degradación de la celulosa conduce al desenredo de la red de hemicelulosa-celulosa en la pared celular, lo que facilita la extracción de pectina.

Tabla II.4.2. Composición^a y peso molecular de las fracciones de pectina (MP y MP-US) extraídas de RIA-PB.

	MP^{a,b}	MP-US^{a,b}
Rendimiento de extracción (g pectina/100g RIA-PB)	2,4	4,0
Carbohidratos totales (% p/p)	80 ± 1	93 ± 1,2
Contenido de ácidos urónicos (AU) (% p/p)	63 ± 2	67 ± 1
Grado de metilación, DM (% molar)	ND	8,8 ± 0,6
Grado de acetilación, DA (% molar)	7,7 ± 0,19	9,3 ± 0,11
Contenido de azúcares neutros (NS) ^b (% p/p)	17	25,8
Relación molar NS/AU	0,3	0,4
Proteínas (% p/p)	4,2 ± 0,4	4,5 ± 0,2
<i>M_w</i> (kDa)	166,0 ± 2,5	108,6 ± 10,2
<i>M_n</i> (kDa)	39,2 ± 1,2	31,5 ± 1,1
<i>M_w/M_n</i>	4,24	3,45
Tamaño hidrodinámico (nm) a pH 6,0	350 ± 12	122 ± 7
Ancho (nm)	97	43
	Monodisperso	Monodisperso
Potencial zeta (mV) a pH 6,0	-24 ± 0,2	-32 ± 0,3

^aSe notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 3$.

^bLos azúcares neutros (NS) se calculan como la diferencia aritmética entre el contenido de carbohidratos totales y ácidos urónicos (AU).

M_w: peso molecular medio ponderado.

M_n: peso molecular promedio en número.

M_w / M_n: distribución del peso molecular o polidispersidad.

Fissore et al. (2007, 2011) realizaron el aislamiento de las fracciones enriquecidas en pectinas sin el pretratamiento de US a partir de polvos de calabaza o de raíz de remolacha, los cuales necesitaron tiempos de extracción prolongados (20h a 30°C) después del tratamiento con diferentes concentraciones de celulasa. Por otro lado, Idrovo Encalada et al. (2019b) realizaron extracciones asistidas con US + celulasa de 4h a 40°C a partir del polvo de raíces de zanahoria libre de azúcares simples. Extrajo un 12,2% de AU, mientras que solamente 2,91; 3,85 y 5,47% de AU fueron extraídos del polvo de raíces de zanahoria sin US en buffer citrato sin enzima, con hemicelulasa y celulasa, respectivamente. La combinación US-enzima mejorará los rendimientos de extracción.

II.4.2. Caracterización química de las fracciones MP y MP-US

Los resultados de la caracterización química de las fracciones aisladas de las brácteas del maíz (RIA-PB) se muestran en la **Tabla II.4.2**. Las fracciones extraídas fueron pectinas debido a que el $\approx 65\%$ estuvo constituido por ácidos urónicos (AU), de acuerdo con la definición de pectina del *Food Codex* reportada por Ciriminna et al. (2016).

Las pectinas MP y MP-US mostraron bajo DM y bajo DA (**Tabla II.4.2**) tal como era de esperar después del pretratamiento alcalino con NaOH, el cual produce la hidrólisis de los metilésteres presentes en los AU (saponificación). Además, presentaron un bajo contenido de proteínas ($\approx 4,5\%$).

El contenido total de carbohidratos, que incluye los AU y los azúcares neutros (NS), fue de 80 y 93% para las pectinas extraídas sin (MP) y con US (MP-US), respectivamente. Como consecuencia, se calcularon los contenidos de NS presentes en las pectinas de las brácteas del maíz, siendo de 17 y 25% para MP y MP-US, respectivamente (**Tabla II.4.2**). Así, las relaciones molares NS/AU calculadas para las pectinas extraídas fueron bajas, 0,3 y 0,4 para MP y MP-US, respectivamente (**Tabla II.4.2**). Ello significa que estas pectinas estaban formadas prevalentemente por cadenas de homogalacturonano (HG). Esto se confirma por las altas relaciones molares AU/Rha (Rha: L-ramnosa) calculadas para ambas pectinas extraídas del RIA-PB, lo que indica una muy baja proporción de RG-I (**Figura II.4.1**).

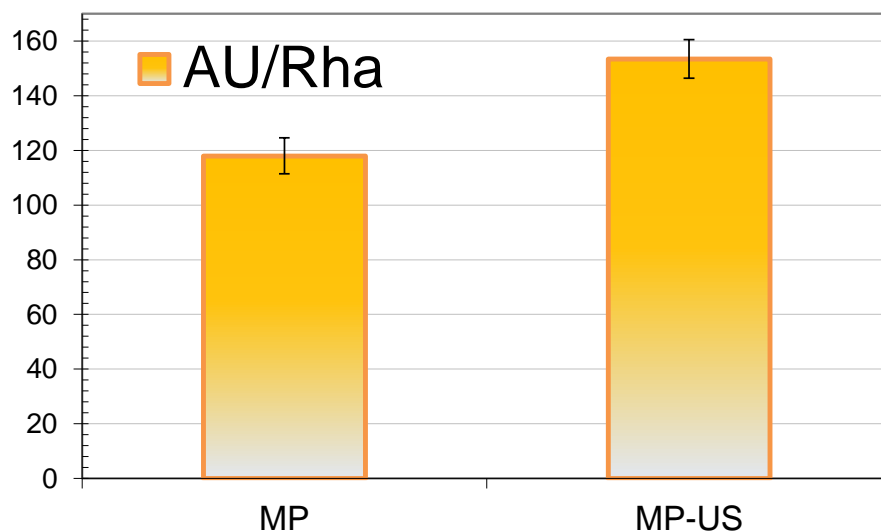


Figura II.4.1. Relación molar calculada para ácidos urónicos/ramnosa (AU/Rha).

Como se muestra en la **Figura II.4.2**, en la composición de los azúcares neutros (NS) se encontraron los monosacáridos típicos de las pectinas, del RG-I: Rha (0,4-0,5g/100g de pectina), Ara (8-9,7g/100g de pectina) y Gal (2,1-2,6g/100g de pectina). Sorprendentemente, también se encontró un nivel significativo de xilosa (Xil) (6,2 y 12g/100g de MP y MP-US, respectivamente) entre los NS. De acuerdo con la extracción secuencial de los polímeros de la pared celular de las brácteas del maíz realizada en Bernhardt et al. (2019), la presencia de Xil puede atribuirse en el presente trabajo a la coextracción de arabinoxilanos debido al pretratamiento alcalino realizado. Así, una proporción de la Ara encontrada puede corresponder a la sustitución lateral de la cadena principal de xilanos de los arabinoxilanos y no al RG-I de las pectinas. Considerando una relación molar Ara/Xil de 0,78 para las cadenas de arabinoxilano (Kofod et al., 1995; Bernhardt et al., 2019), el contenido restante de Ara atribuido al RG-I de las macromoléculas de pectina sería 4,5 y 0,5g/100g de MP y MP-US, respectivamente.

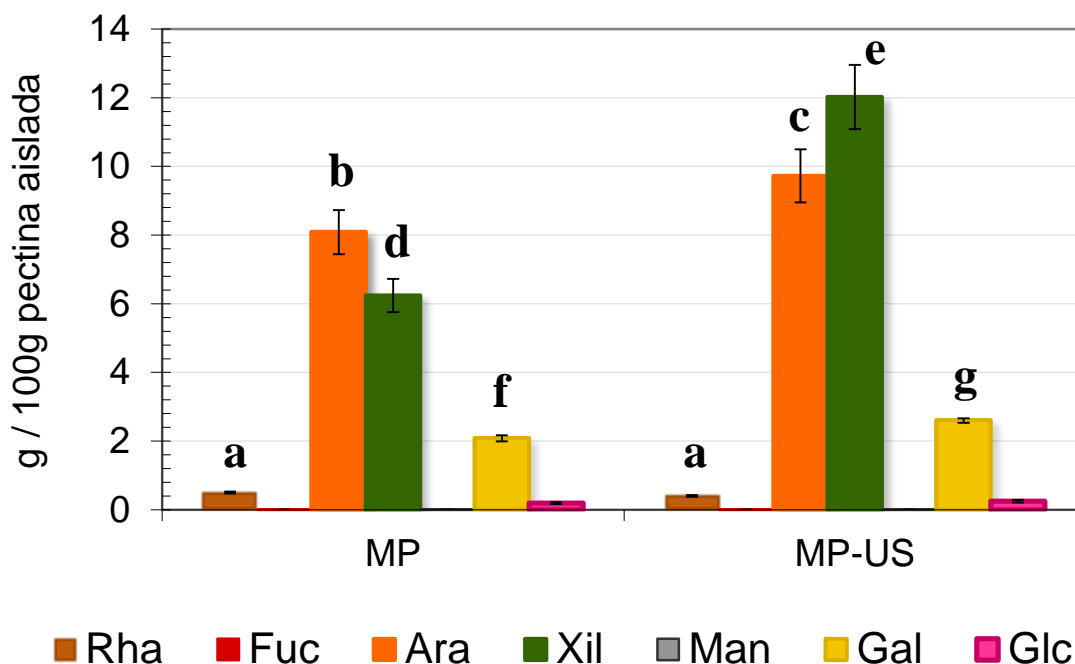


Figura II.4.2. Composición en monosacáridos de los azúcares neutros (NS) de las pectinas MP y MP-US aisladas a partir del residuo insoluble en alcohol de las brácteas del maíz (RIA-PB). L-Ramnosa (Rha), L-fucosa (Fuc), L-arabinosa (Ara), D-xilosa (Xil), D-manosa (Man), D-galactosa (Gal), D-glucosa (Glc). Diferentes letras para un monosacárido dado indican diferencias significativas ($n = 3$) ($p < 0,05$).

Como se muestra en la **Figura II.4.3**, la relación molar de Ara/Gal fue de 1,9 y 0,2 para MP y MP-US, respectivamente. Por otro lado, las relaciones molares de Ara/Rha y Gal/Rha para MP fueron 7 y 3,8 respectivamente, mientras que para MP-US la relación Ara/Rha disminuyó a 0,9 y la de Gal/Rha aumentó a 5,8.

El menor grado de ramificación o relación molar del RG-I, $(Ara + Gal)/Rha$, fue el de la pectina MP-US, que también presentó la mayor relación molar AU/Rha, como se mencionó anteriormente (**Figura II.4.1**). Aunque las proporciones en peso de Xil fueron significativas (**Figura II.4.2**), la relación molar Xil (arabinoxilanos) a AU (pectinas) en MP y MP-US no lo fueron (**Figura II.4.3**), lo que indica que ambas fracciones, MP y MP-US, estaban constituidas esencialmente por pectinas.

Khodaei y Karbourne (2013) utilizaron la pared celular (material libre de almidón y proteínas) de la pulpa de la papa para la extracción de polisacáridos enriquecidos en RG-I usando métodos alcalinos (NaOH y KOH 0,5; 1 o 2M) y enzimáticos (galacturonasa, 24h a 35°C). El rendimiento de la pectina obtenida con el tratamiento enzimático fue del 38%, similar a los obtenidos con las

soluciones alcalinas 1M. Por otra parte, el contenido de AU de las fracciones obtenidas con el método alcalino fue de 9,7 a 18,1%; mientras que para las pectinas obtenidas con el método enzimático el contenido de AU fue del 38,3%, logrando extraer la mayor cantidad de pectinas de la pulpa de papa.

Considerando todas las relaciones molares calculadas, se puede inferir para la pectina MP que cada 118 residuos de GalA (esqueleto HG), aparece insertado un residuo de Rha, el cual es sustituido lateralmente por 4 residuos de Gal y 18 residuos de Ara, mientras que 14 residuos de Xil podrían unirse lateralmente a no más de 14 residuos de GalA del esqueleto de HG, constituyendo algunas regiones cortas de xilogalacturonano. Por otro lado, para la pectina MP-US, cada 153 residuos de GalA (esqueleto de HG), se encuentra un residuo de Rha, el cual está lateralmente sustituido por 6 residuos de Gal y 26 residuos de Ara, mientras que 30 residuos de Xil están unidos lateralmente a no más de 30 residuos de GalA del HG, constituyendo regiones de xilogalacturonano.

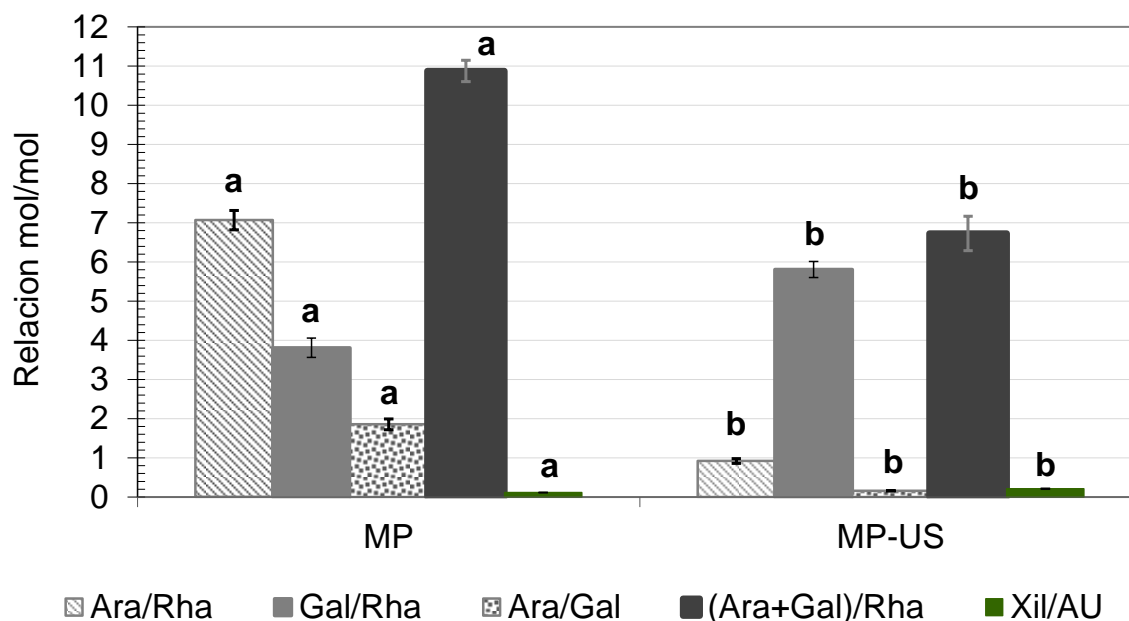


Figura II.4.3. Relación molar de Ara/Rha, Gal/Rha, Ara/Gal, Xil/AU. L-Ramnosa (Rha), L-arabinosa (Ara), D-galactosa (Gal), D-xilosa (Xil), ácidos urónicos (AU). Diferentes letras para un monosacárido dado indican diferencias significativas ($n = 3$) ($p < 0,05$).

II.4.3. Peso Molecular de las fracciones MP y MP-US

Aunque conocer la composición química de las pectinas es esencial en relación con sus posibles aplicaciones, el comportamiento reológico es crítico para conocer el desempeño de las pectinas, y el análisis de la distribución del peso molecular puede ayudar a predecir el comportamiento reológico (Dangi et al. 2020). Los pesos moleculares promedio (M_w) determinados para MP y MP-US fueron 166 y 108,6kDa, respectivamente (**Tabla II.4.2**), valores que son del orden de los encontrados para muchas pectinas comúnmente extraídas como las del pelón (von Mollendorff et al., 1993), de los cítricos (Hotchkiss et al., 2002) y de la zanahoria por agitación o pretratamiento con US seguido de celulasa (Idrovo Encalada et al., 2019b) y mediante agitación o pretratamiento con US seguido de Na_2CO_3 (Idrovo Encalada et al., 2019a). El peso molecular promedio en número (M_n) de las pectinas fue de 39,2kDa para MP y 31,5kDa para MP-US.

El efecto del US sobre la masa molecular ha sido estudiado por diferentes investigadores. Shi et al. (2022) estudiaron el efecto del US sobre la masa molecular de pectina aislada de *Premna microphylla*. Se utilizó una potencia de salida máxima de 1000W y una sonda de 6mm y la extracción se realizó con una solución de oxalato de amonio 0,1M a 70°C durante 30min. Estos autores informaron que el peso molecular disminuyó de 133,60 a 90,04kDa con un tratamiento por 30min debido a que el rápido colapso de las burbujas de cavitación generadas por US produjo fuerzas de fricción y cizallamiento que degradaron los polímeros. También informaron que el tratamiento con US disminuyó el comportamiento tixotrópico del producto, mejorando su calidad de procesamiento.

Sun et al. (2004) determinaron los pesos moleculares (M_w y M_n) al igual que la polidispersidad (M_w/M_n) de fracciones de hemicelulosas extraídas con US, donde obtuvieron una disminución significativa en los pesos moleculares relativos. Los resultados confirmaron que el tratamiento ultrasónico no sólo atacó la integridad de las paredes celulares haciendo que sus componentes sean más accesibles para la extracción, sino que también rompió los enlaces hemicelulósicos intermoleculares e intramoleculares, lo que resultó en una despolimerización de las macromoléculas en fragmentos solubles en agua.

La polidispersidad, que proporciona una indicación del rango de masas moleculares de la pectina, calculada como la relación Mw/Mn , fue de 4,24 para MP y 3,45 para MP-US (**Tabla II.4.2**). Estos valores están alejados de 1,0, lo que significa que la longitud de las cadenas formadas son diferentes y divergentes entre sí para ambas muestras (Zanella y Taranto, 2015), además se observa que el índice de polidispersidad fue mayor para MP que para MP-US. En un estudio realizado por Shi et al. (2022) observaron que el índice de polidispersidad de las pectinas cítricas extraídas sin degradación con US alcanzó un valor máximo de 1,577, mientras que, las pectinas extraídas después del tratamiento con US fueron menor, lo que sugiere que el tratamiento ultrasónico causó una distribución estrecha del peso molecular. Esto puede estar relacionado con la transferencia de la región molecular en mayor peso molecular a la región de menor peso molecular.

Zhang et al. (2019) extrajeron y purificaron un polisacárido rico en GalA (14,7% p/p) y con cantidades menores de Ara (1,24% p/p), Gal (0,87% p/p), Glc (3,92% p/p), así como de Man (0,67% p/p), Fuc (0,44% p/p) y Xil (0,47% p/p). Este polímero mostró un peso molecular promedio (Mw) de 3,301kDa y una polidispersidad importante ($Mw/Mn = 8,14$), a pesar de la purificación. Esto último indicó una proporción mucho mayor de moléculas pequeñas del polisacárido.

II.4.4. Análisis de espectros FT-IR de las fracciones MP y MP-US

Los espectros FTIR correspondientes a MP y MP-US se muestran en la **Figura II.4.4**. En principio revelan que se trata de pectinas esencialmente enriquecidas en ácido poligalacturónico. El ancho de absorción a 3450cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento O-H debido a la formación de puentes de hidrógeno. La débil banda de absorción a 2935cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-H (saturado) de los grupos $-\text{CH}_2$ del esqueleto de la pectina.

Para ambas pectinas MP y MP-US, la banda correspondiente al grupo carboxilato esterificado a $\approx 1730\text{cm}^{-1}$ está casi ausente, lo cual es coherente con un DM muy bajo (**Tabla II.4.2**). Como se mencionó anteriormente, las pectinas extraídas en condiciones alcalinas se caracterizan por poseer bajo DM (**sección I.3.2**).

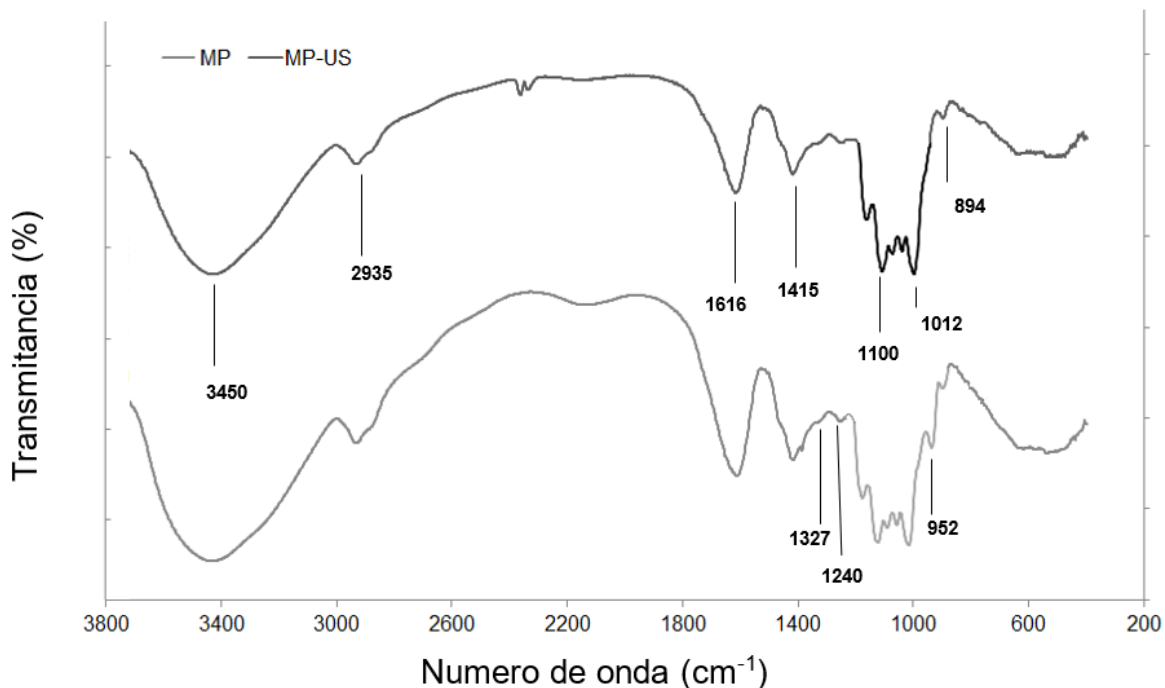


Figura II.4.4. Espectros de FT-IR de las pectinas MP y MP-US extraídas de las brácteas del maíz.

Dranca y Oroian et al. (2019) realizaron extracciones de pectina de manzana utilizando tratamientos enzimáticos en condiciones óptimas. La banda a 1743cm^{-1} indica el estiramiento del carbonilo (C = O) del carboxilato esterificado, mientras que la banda a 1606cm^{-1} se atribuyó al estiramiento de iones carboxilato. La relación entre estos picos puede utilizarse para la cuantificación del grado de esterificación. La muestra de pectina de manzana extraída con enzimas fue altamente esterificada y se encontró que era más similar a la pectina cítrica comercial que a la pectina de manzana comercial, en términos del grado de esterificación. Purcell y Fishman (1987) determinaron que la banda a 1604cm^{-1} es atribuible a la vibración del estiramiento asimétrico de los grupos carboxilato ionizado, y que el incremento en el área es atribuido a la disociación de los contraiones de pectina, simultánea a la disociación de los agregados de pectina.

Se observaron bandas entre $1271\text{--}1000\text{cm}^{-1}$, características de las vibraciones C–O, vibración que se atribuye al C–O–H y al enlace glicosídico C–O–C del anillo piranosa. Se observan los picos de absorción entre 1100cm^{-1} y 1012cm^{-1} característicos de la zona de la huella digital de los ácidos galacturónicos, mientras que los picos de absorción a 834 y 894cm^{-1} indican la existencia de enlaces glicosídicos de tipos α y β (Coimbra et al., 1998; Coimbra et al., 1999).

II.4.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM) de pectinas MP y MP-US

La caracterización por AFM de las fracciones extraídas del polvo RIA-PB se muestra en la **Figura II.4.5**. Las macromoléculas MP se observaron como nanoestructuras gruesas esféricas u ovoides no ramificadas a una concentración de 2,5µg/L de la solución de muestra depositada en los discos de mica (**Figura II.4.5 A**). Se caracterizaron a través de diámetros de disco equivalentes que variaron ampliamente entre 80 y 250nm, con una media de 160nm (**Figura II.4.6 A**). Por otro lado, las macromoléculas MP-US eran fibras delgadas y pequeñas nanoestructuras esféricas cuando las imágenes se registraron a 1,0µg/L de la solución de muestra depositada (**Figura II.4.5 B**). Estas macromoléculas son cadenas lineales extendidas y rígidas, y en general no se observaron ramificaciones. Las estructuras rígidas y extendidas sugieren que las moléculas de pectina adoptan una estructura helicoidal cuando se adsorben en el sustrato de mica (Kirby et al., 2008). La caracterización de las pequeñas nanoestructuras esféricas presentes en MP-US a través de diámetros de disco equivalentes mostró que variaban entre 20 y 30nm (media = 25nm) (**Figura II.4.6 A**). La distribución total de la longitud del contorno de las fibras MP-US se muestra en la **Figura II.4.6 B**. Se encontró que las longitudes de contorno promedio en peso (L_W) y promedio numérico (L_N) eran 77nm y 71nm, respectivamente, con $L_W/L_N = 1,09$. El diámetro hidrodinámico de MP y MP-US en agua (pH = 6,0) fue de 350nm y 122nm, con un rango de anchura de 97 y 43nm, respectivamente (**Tabla II.4.2**). Los resultados de AFM confirmaron macromoléculas lineales y no agregadas para MP-US (**Figura II.4.5 B**).

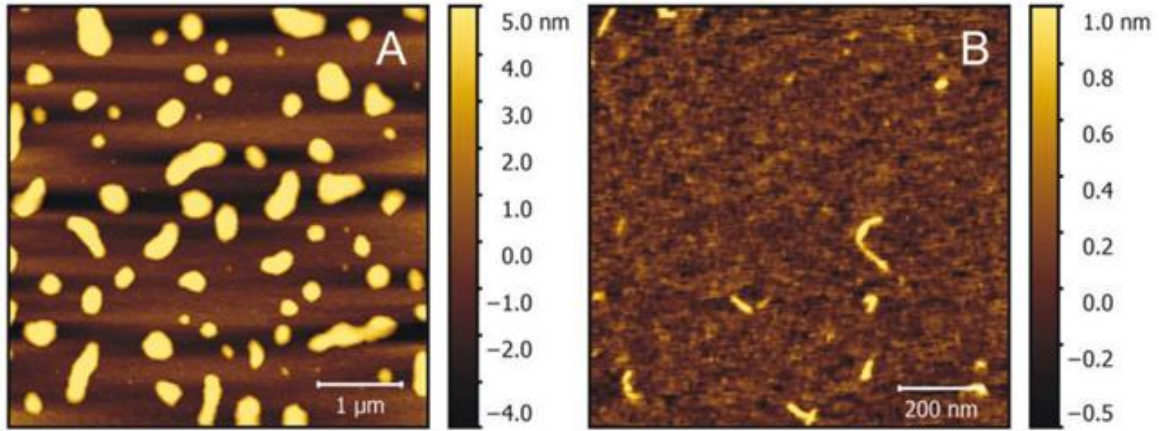


Figura II.4.5. Imágenes topográficas de AFM obtenidas de MP (A) y MP-US (B) en concentraciones de 2,5 y 1,0µg/mL, respectivamente; las barras blancas indican 1µm (A) y 200nm (B).

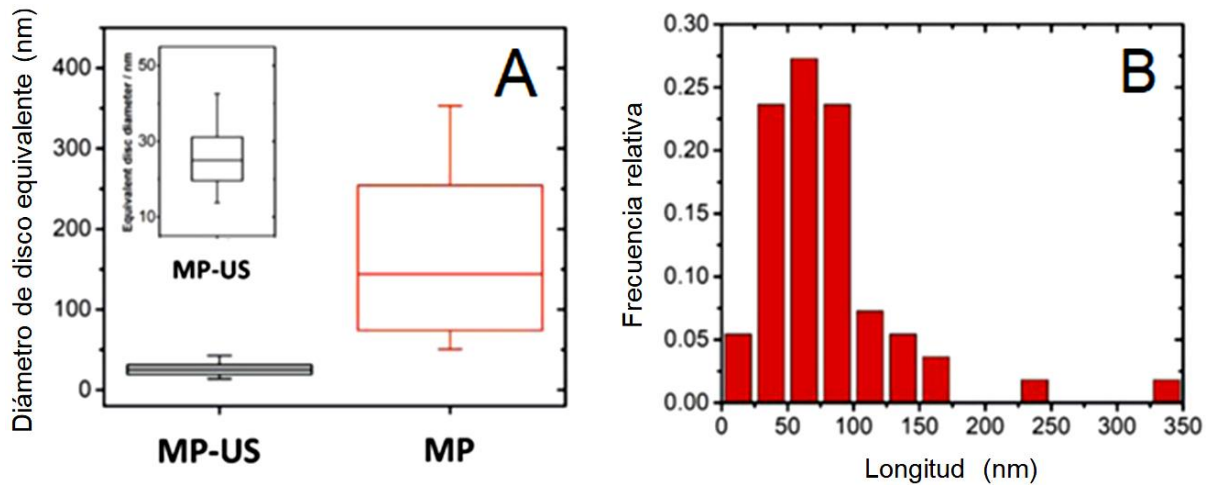


Figura II.4.6. Distribuciones de tamaño, expresadas en diámetro de disco equivalente, de MP y MP-US: cada caja contiene el 50% del valor de los datos y el 80% de los datos están entre los bigotes, y la línea continua dentro de la caja representa el valor medio de cada distribución (A). Longitud de fibra de MP-US como histograma de frecuencia de la longitud del contorno de la fibra (B).

Los análisis por AFM confirmaron que MP-US se presenta como macromoléculas lineales y no agregadas, lo que puede explicar la alta solubilidad en agua de esta pectina a temperatura ambiente, solubilizándose inmediatamente, lo cual no ocurre habitualmente con las pectinas. Así, la pectina MP mostró nanoestructuras agregadas y con una solubilidad en agua a temperaturas altas (85°C), al agitar intensamente y dejar hidratar luego por 24h. Por lo tanto, el uso de US evitaría la agregación de las macromoléculas extraídas.

Li al. (2022) extrajeron diferentes pectinas cítricas y encontraron que una de ellas tenía una estructura de conglomerados irregulares. Este fenómeno lo atribuyeron a la naturaleza neutra de la pectina y a la existencia de puentes de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares formados por los grupos hidroxilo en las macromoléculas. Las fuerzas de van der Waals y estos enlaces de hidrógeno hacen que las cadenas de polisacáridos se agreguen para formar una estructura aglomerada. En cambio, otra de las pectinas extraídas poseía tanto una estructura lineal como agregados esféricos irregulares, lo que posiblemente se debió a cadenas laterales relativamente más largas y a su naturaleza de hallarse cargada negativamente. La pectina generalmente exhibe autoagregación en soluciones acuosas debido a las interacciones intermoleculares.

II.4.6. Ensayos reológicos para las fracciones MP y MP-US

II.4.6.1. Caracterización termo-reológica: sensibilidad al Ca^{2+} y al Fe^{2+}

Las temperaturas de gelificación y de fusión, así como el comportamiento viscoelástico en agua de las pectinas MP y MP-US fueron reológicamente evaluados en sistemas al 2,0% p/v de MP o MP-US en función de la temperatura (10-85°C; 5°C/min constante), del tiempo de reposo a 10°C durante 900s y de la frecuencia a viscoelasticidad lineal (espectros mecánicos) a 10°C.

Dado que MP y MP-US mostraron bajo DM (**Tabla II.4.2**), esta caracterización reológica se realizó en presencia de Ca^{2+} (**Figura II.4.7**) o de Fe^{2+} (**Figura II.4.8**), que son minerales esenciales para la salud humana (Lopresti, 2020), por lo cual están presentes en alimentos procesados o se agregan para suplementos nutricionales específicos (Das et al., 2020).

El pH de los sistemas acuosos MP y MP-US fue de 6,0, lo que significa que las pectinas se cargaron negativamente si se considera un valor de 4,50 para el pK_a (Torkova et al., 2018). El potencial zeta, que se determinó por separado en MP y MP-US disuelto en agua (0,02% p/v), sin adición de Ca^{2+} o de Fe^{2+} , fue negativo y con valores de -24 y -32mV, respectivamente (**Tabla II.4.2**).

II.4.6.2. Efecto de iones calcio

A pH 6,0, las rampas de enfriamiento de MP y MP-US en presencia de iones calcio (5mg Ca^{2+} /g de contenido de AU) (**Figura II.4.7A**), mostraron un ligero comportamiento viscoelástico “símil sólido” (*solid-like*) ya que, a 85°C, el módulo elástico (G') estaba por encima del módulo viscoso (G''), aunque muy cerca entre sí ($G' = 20\text{Pa}$ y $G'' = 14\text{Pa}$ para MP; $G' = 14\text{Pa}$ y $G'' = 6\text{Pa}$ para MP-US).

Para el sistema acuoso MP, a medida que la temperatura fue disminuyendo hasta 10°C, los valores G' fueron continuamente aumentando hasta alcanzar 100Pa, mientras que los valores G'' aumentaron hasta 20Pa a 10°C y permaneciendo después constantes. El sistema acuoso MP-US mostró un comportamiento similar, alcanzando valores más bajos de G' (70Pa) y de G'' (15Pa) que MP cuando la temperatura disminuyó a 10°C. Por ello, a 10°C la rampa de enfriamiento permitió alcanzar valores de G' y G'' que diferían entre sí en menos de un orden de magnitud. Como G' siempre estuvo por encima de G'' durante el enfriamiento (**Figura II.4.7A**), no se observaron temperaturas de gelificación para MP y MP-US en el rango de temperatura de 85-10°C, y se observó un creciente comportamiento viscoelástico de símil-sólido (*solid-like*) conforme disminuía la temperatura. Este perfil de temperatura evidenció que un número creciente de puentes de hidrógeno estaba involucrado en el desarrollo de la red macromolecular del gel en paralelo a la disminución de la temperatura. Al mismo tiempo, el comportamiento viscoelástico de símil-sólido (*solid-like*) observado ya a las temperaturas más altas evaluadas (85-80°C) indicó que la interacción electrostática de las macromoléculas de pectina a través de iones de calcio prevaleció sobre el enlace de hidrógeno ya a las más altas temperaturas evaluadas.

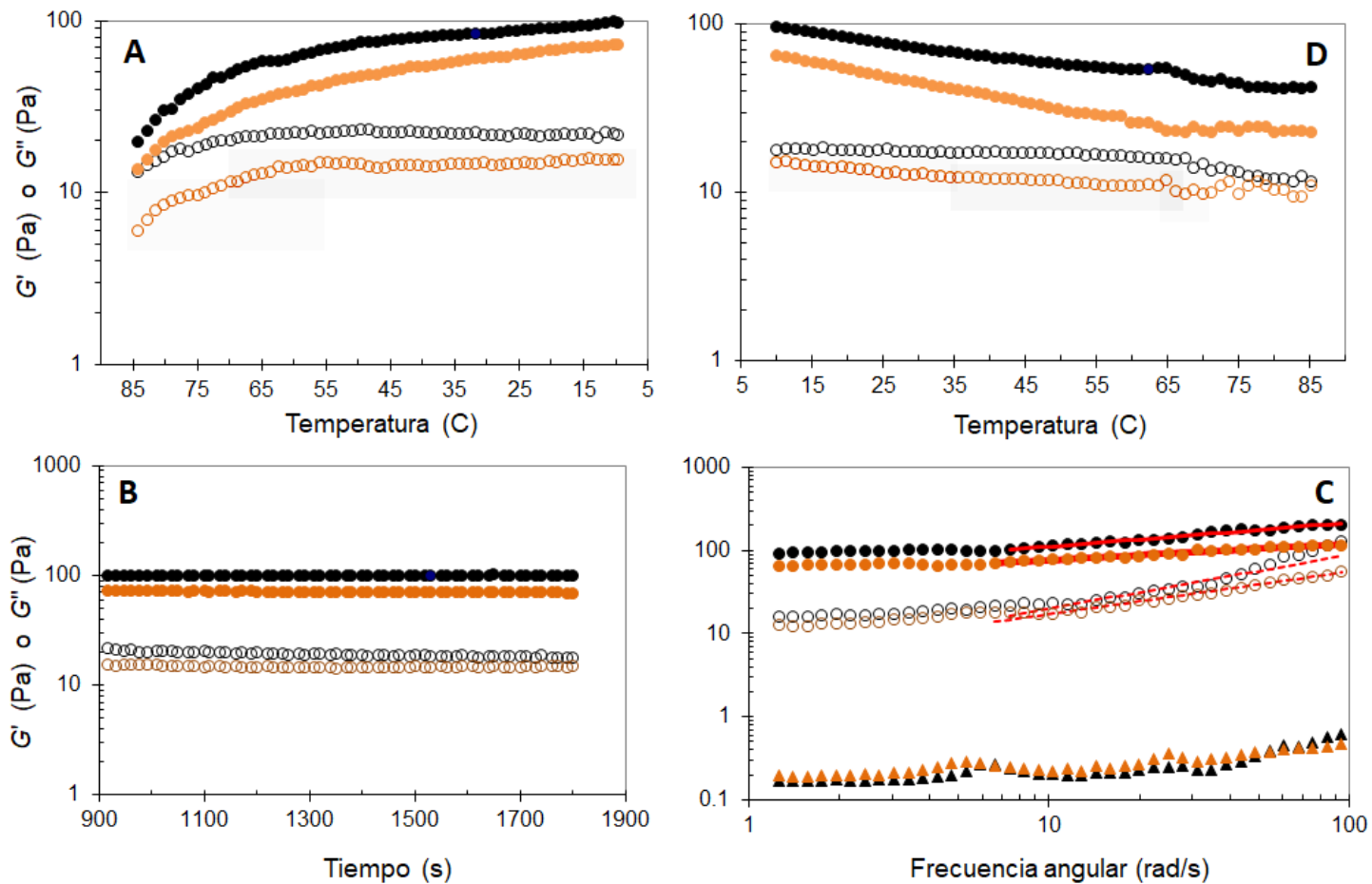


Figura II.4.7. Rampa de enfriamiento a 0,5Hz y 5,0°C/min constantes (A), período isotérmico a 10,0°C (0,5Hz constante) (B), barrido de frecuencia a 10,0°C en viscoelasticidad lineal (▲ ▲ ; tan delta) (línea roja continua: modelo de Ley de la Potencia) (C), rampa de calentamiento a 0,5 Hz y 5,0°C/min constantes (D) para 2,0% p/v de MP (●○; black) y MP-US (●○), pH 6,0, con iones calcio (5mg/g ácidos urónicos). Símbolos llenos: G' ; símbolos vacíos: G'' . Las barras de la desviación estándar ($n = 3$) están dentro del tamaño del símbolo.

Durante el período de reposo de 900s a 10°C (**Figura II.4.7 B**), los valores de G' y G'' no cambiaron significativamente, lo que indica que la red de gel formada durante el período de enfriamiento (**Figura II.4.7 A**) se constituyó completamente a la temperatura más baja alcanzada. Posteriormente, los espectros mecánicos obtenidos a 10°C constante (**Figura II.4.7 C**) demostraron que, al 2,0% p/v, MP y MP-US desarrollaron redes de gel con Ca^{2+} ya que G' está siempre por encima de G'' , aunque con los módulos separados por menos de un ciclo logarítmico. Según Ikeda y Nishinari (2001), los geles del "tipo gel débil" son aquellos con $\tan(\delta)$ (relación G''/G') superior a 0,1, que es el caso observado en la **Figura II.4.7 C**, donde $\tan(\delta)$ también va aumentado con la frecuencia. Una ligera dependencia de G' con la frecuencia en todo el rango de frecuencia se observa en la **Figura II.4.7 C**, la cual es común en geles físicos (Doublier et al., 1992). En cambio, G'' fue especialmente dependiente de la frecuencia hasta casi alcanzar G' a los valores de frecuencia más altos (tiempos cortos) (**Figura II.4.7 C**). Según Rizzi (2017), el comportamiento de los biomateriales es un comportamiento viscoelástico bien conocido de materiales "símil-gel", que se caracteriza por un régimen de *plateau* donde $G' \approx G_{eq}$ ($G_{eq} \approx 100\text{Pa}$ para MP; $G_{eq} \approx 70\text{Pa}$ para MP-US) a frecuencias inferiores a la frecuencia umbral ω^* ($\omega^* = 6,6\text{rad/s}$ para los valores de G' registrados tanto desde MP como desde MP-US) (**Figura II.4.7 C**). Probablemente, la ligera diferencia en el módulo elástico ($G' \approx G_{eq}$) entre los espectros MP y MP-US podría estar relacionada con la pequeña diferencia entre los pesos moleculares (**Tabla II.4.2**). Por encima de ω^* , ocurre el *power-law stiffening regime*, dado por $G'(\omega) \sim \omega^N$ (**Ecuación II.4.1**), donde el exponente N indica la dependencia de G' con la frecuencia, siendo $N = 0,288 (\pm 0,009)$ para MP y $0,197 (\pm 0,007)$ para MP-US (Rizzi, 2017). La dependencia de G'' con la frecuencia es también descrita usando la relación de Ley de la Potencia (**Ecuación II.4.2**):

$$G'(\omega) = a \cdot \omega^N \quad \text{Ecuación II.4.1}$$

$$G''(\omega) = b \cdot \omega^M \quad \text{Ecuación II.4.2}$$

donde ω es la frecuencia angular (rad/s), N y M son exponentes y los valores de la pendiente de una gráfica logarítmica de G' y G'' versus ω , mientras que a y b son constantes. El ajuste de la Ley de la Potencia se puede observar en la **Figura II.4.7 D** como líneas continuas en rojo.

Al 1% p/v y en presencia de iones calcio, Urias-Orona et al. (2010) obtuvieron geles iónicos con un G' de 40Pa para la pectina (67% de contenido de AU; DM = 10%) extraída de las cáscaras de garbanzos con HCl 0,05N a 80°C, mientras que al 2% p/v, el G' fue de 131Pa. El espectro mecánico de esta pectina al 2% p/v mostró a G' y G'' separados en menos de un ciclo de logaritmo ($\tan \delta > 0,1$). Urias-Orona et al. (2010) observaron que G' no se vio muy afectado por la temperatura.

También es importante señalar que las pectinas MP y MP-US necesitaron una concentración muy baja de Ca^{2+} (5mg Ca^{2+} /g de contenido de UA) para desarrollar este tipo de gel (**Figura II.4.7 C**), lo que permitió inferir que son altamente sensibles al ion calcio. Esta característica puede explicarse en parte por el muy bajo DM de MP y MP-US. Además, el muy bajo contenido de regiones de RG-I (**Tabla II.4.2; Figura II.4.2**) implica un bajo impedimento estérico para la generación de interacciones cadena-cadena antiparalelas de poligalacturonato ("regiones lisas" o *smooth regions* del HG). Como consecuencia, las cadenas encajan eficientemente entre sí mediante numerosas interacciones del tipo fuerzas de van der Waals, subcavidades simétricas de tamaño apropiado para unir un ion calcio y una eficiente red periódica de enlaces de puente de hidrógeno intermoleculares que contribuye a la fuerza del gel pectato (Braccini y Pérez, 2001). Se ha informado que el grado crítico de polimerización necesario para la unión cooperativa de iones calcio para inducir la gelificación es de $\approx 15-20$ para el poligalacturonato. La unión cooperativa de iones calcio también involucra puentes de hidrógeno intermoleculares en los grupos hidroxilo en C2 y/o C3 en las caras interiores de la estructura dimérica formada (Braccini y Pérez, 2001). Se espera que cualquier sustitución en estos sitios dificulte el empaquetamiento eficiente de las cadenas contiguas de HG y, por lo tanto, disminuya la capacidad de gelificación, tal como se observa con la acetilación en las pectinas extraídas de la remolacha azucarera. Un exceso de concentración de iones de calcio con respecto al poligalacturonato promueve la agregación de los dímeros formados, lo cual se evidencia con frecuencia por el fenómeno de la sinéresis. Esta agregación dímero-dímero no es específica, mientras que la asociación cadena-cadena (HG-HG) por dimerización es fuertemente específica, como se describió anteriormente (Braccini y Pérez, 2001).

Durante el calentamiento ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), las redes de gel de calcio (tipo “gel débil”) de MP y MP-US mostraron los mismos perfiles térmicos: no se fundieron, al menos hasta 85°C (**Figura II.4.7 D**), como se observa por el hecho de que G' siempre estuvo claramente por encima de G'' . Además, a 85°C , los valores G' respectivamente alcanzados por geles formados por MP y MP-US fueron de 42 y 23Pa, mientras que los valores de G'' fueron de $\approx 9\text{Pa}$. Estos módulos obtenidos después del calentamiento (**Figura II.4.7 D**) fueron notablemente superiores a aquellos mostrados por los mismos sistemas al inicio de la rampa de enfriamiento, a 85°C (**Figura II.4.7 A**). Esto puede demostrar la histéresis que ocurre entre las rampas de enfriamiento (**Figura II.4.7 A**) y calentamiento (**Figura II.4.7 D**). G' disminuyó con el aumento de la temperatura durante la rampa de calentamiento (**Figura II.4.7 D**), indicando que los enlaces hidrógeno entre macromoléculas fueron interacciones importantes que contribuyen a la constitución y mantenimiento de la red del gel. Simultáneamente, la irreversibilidad térmica final del gel demostró que la reticulación entre cadenas mediante iones calcio prevaleció en la formación y estabilización de la red del gel. Según Flutto (2003), las propiedades de los geles de pectina muy poco metilesterificada son muy dependientes del tipo de pectina utilizada junto con el procedimiento y la formulación utilizados para hacer el gel. Típicamente, son termo-reversibles con calcio y muestran un alto grado de tixotropía. Sin embargo, en condiciones específicas, es posible obtener geles termo-resistentes o geles muy quebradizos sin reversibilidad al cizallamiento.

Según Ralet et al. (2001) y Löfgren et al. (2005), cuanto menor es el DM y mayor es el número de unidades sucesivas de AU desesterificado en el HG, más sensibles son las cadenas de pectina a la reticulación con Ca^{2+} , lo que resulta en la formación de geles más rígidos. Kyomugasho et al. (2016) determinaron que el valor G' registrado en los espectros mecánicos de los geles de pectina obtenidos de pectinas comerciales de cítricos (73% GalA) y de remolacha azucarera (55% GalA) en presencia de iones calcio ($2\text{mol Ca}^{2+}/\text{mol carboxilato}$) disminuyó a medida que aumentaba el DM. No obstante, las interacciones de pectina con cationes divalentes no se establecen necesariamente a través de grupos carboxílicos cargados negativamente, sino a través de puentes de hidrógeno (Braccini y Pérez, 2001). El tipo de interacción entre cationes y pectina es también catión-dependiente (Celus et al., 2018). Por otro lado, el uso de hidrólisis química de los grupos metil-éster, la que incluye un tratamiento de pectina con álcali, genera unidades de GalA desesterificado distribuidas aleatoriamente, mientras que la desesterificación por vía enzimática produce pectinas

con determinados patrones de bloques de GalA no metilesterificado (Willats et al., 2006; Owen et al., 2017).

Las pectinas poco metilesterificadas con un comportamiento de gel termo-irreversible, en la presencia de iones de calcio tal como aquellas extraídas de las brácteas del maíz, pueden ser útiles como espesantes (May, 1990; Mortensen et al., 2017). Pectinas con bajo DM, termo-irreversibles, seleccionadas según el nivel de sólidos, pueden utilizarse de manera muy eficaz, evitando el uso de pectinas amidadas o de almidones, quienes pueden enmascarar *flavours* frutales delicados y producir una textura harinosa (May, 1990). Se ha mostrado que pectinas resistentes al agua, enzimáticamente degradables, preparadas por entrecruzamiento con Ca^{2+} , son candidatas potenciales para acarrear drogas con liberación específica en el colon (Nasrollahzadeh et al., 2019). La fermentación de la fibra dietaria en el colon, incluyendo pectinas, puede liberar minerales, haciéndolos biodisponibles en el intestino. Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) resultantes de la fermentación como el acetato y el propionato pueden mejorar la absorción de calcio en el colon. El secuestro o complejación de iones calcio por fibra dietaria aniónica tal como la pectina puede también afectar la digestión y absorción de los lípidos, considerando también que el ion calcio es un importante cofactor de la lipasa pancreática (Capuano, 2017).

II.4.6.3. Efecto de iones hierro

Frente al mismo número de moles de Fe^{2+} que el uso de Ca^{2+} ($1,25 \times 10^{-4}$ moles) por gramo de AU, las pectinas MP y MP-US formaron geles termo-reversibles ya que éstos fundieron entre 55 y 85°C (**Figura II.4.8 A,D**). Los valores de G' alcanzados después de enfriar hasta 10°C (**Figura II.4.8 A**) y calentar hasta 85°C (**Figura II.4.8 D**) fueron un orden de magnitud más bajos que aquellos respectivamente observados para las pectinas MP y MP-US en presencia de Ca^{2+} (**Figuras II.4.7 A,D**). G' aumentaba a medida que disminuía la temperatura (**Figura II.4.8 A**) y viceversa (**Figura II.4.8 D**), lo que evidenció que el enlace de tipo puente de hidrógeno prevaleció sobre las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la red de gel. Se observó nuevamente histéresis al comparar las rampas de enfriamiento (**Figura II.4.8 A**) y de calentamiento (**Figura II.4.8 D**). Durante el período de reposo de 900s a 10°C, G' mostró un aumento muy leve con el tiempo (**Figura II.4.8 B**).

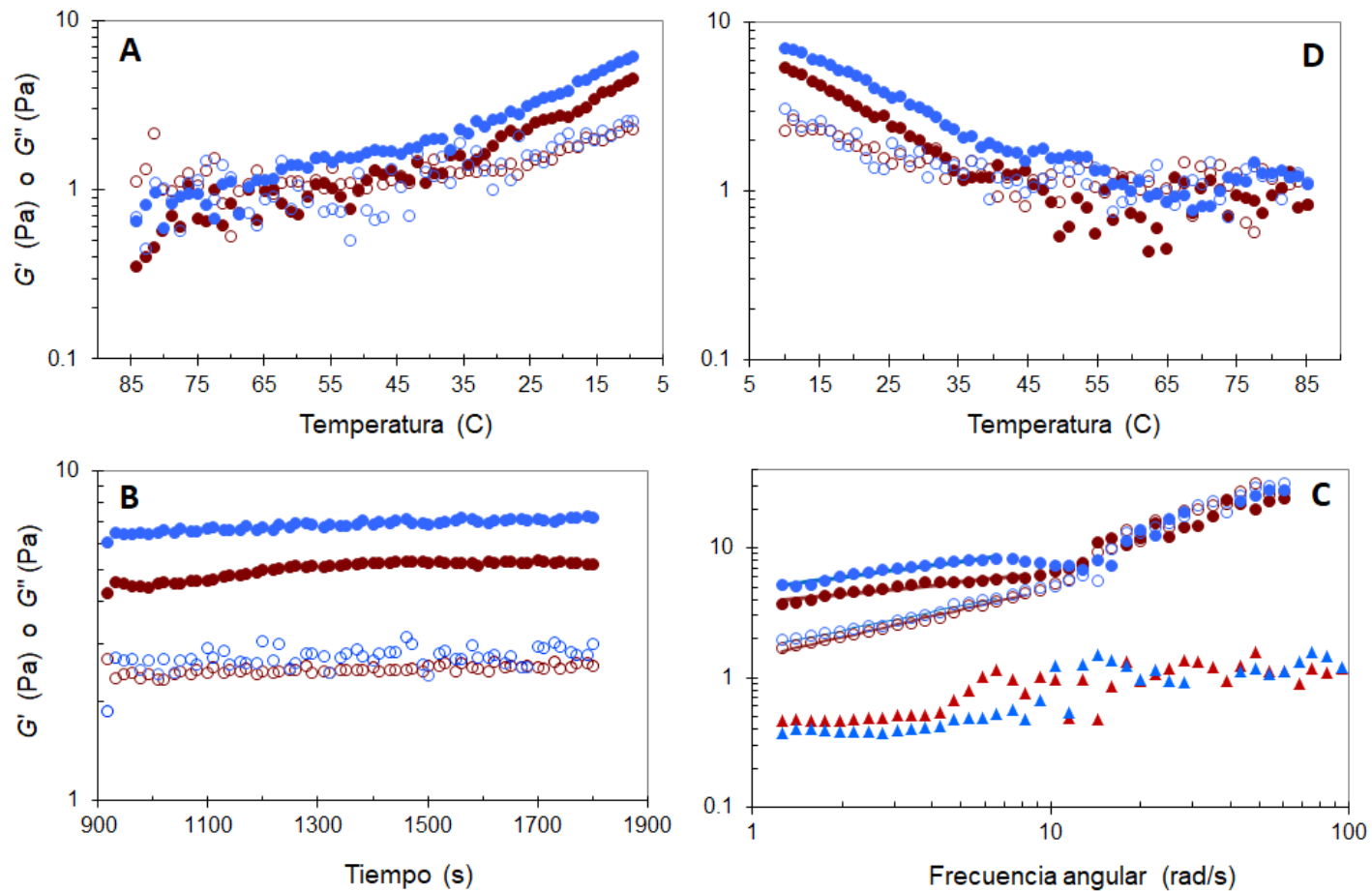


Figura II.4.8. Rampa de enfriamiento a 0,5Hz y 5,0°C/min constantes (A), período isotérmico a 10,0°C (0,5Hz constante) (B), barrido de frecuencia a 10°C en viscoelasticidad lineal (\blacktriangle \blacktriangle ; $\tan \delta$) (línea continua: modelo Ley de la Potencia) (C), y rampa de calentamiento a 0,5Hz y 5,0°C/min constantes (D) para 2,0% p/v MP (\bullet \circ ; marrón) y MP-US (\bullet \circ ; azul), pH 6,0, con iones Fe (II) (número de moles equivalente a los presentes en 5mg de Ca^{2+} / g de ácidos urónicos). Símbolos llenos: G' ; símbolos vacíos: G'' . Las barras de la desviación estándar ($n = 3$) están dentro del tamaño del símbolo.

Los espectros mecánicos de MP y MP-US a 10°C con Fe²⁺ (**Figura II.4.8 C**) revelaron la formación de una red del tipo "gel débil" cuando se evaluó durante los períodos más largos, por debajo de 10rad/s de frecuencia angular. En esta región, G' estaba por encima de G'' pero separado por menos de un ciclo logarítmico ($\tan \delta > 0,1$) y ambos módulos dependían de la frecuencia, especialmente G'', quien alcanzó a G' a ≈ 10 rad/s de frecuencia angular. El *power-law stiffening regime*, dado por $G'(\omega) \sim \omega^N$ (**Ecuación II.4.1**), se observó en todo el rango de frecuencia en presencia de Fe²⁺ (**Figura II.4.8 C**, línea continua), donde N = 0,23 ($\pm 0,01$) para MP y 0,53 ($\pm 0,01$) para MP-US, lo que indica una notable dependencia de frecuencia de G' (Rizzi, 2017). A 6,5rad/s, los valores de G' fueron similares para MP (≈ 6 Pa) y MP-US (≈ 8 Pa) (**Figura II.4.8 C**) y fueron notablemente bajos en comparación con los valores de G' observados para los geles reticulados por iones calcio (**Figura II.4.7 C**). Kyomugasho et al. (2016) obtuvieron geles con ion Fe²⁺ a pH 6,2 con pectinas comerciales de cítricos (73% p/p GalA) y remolacha azucarera (55% p/p GalA) a 1,0 y 2,5mol ion/mol carboxilato, con valores G' de alrededor de 100 y 1000Pa, respectivamente, en los espectros mecánicos.

Se ha determinado que la capacidad de la pectina para unir iones calcio y hierro es dependiente del pH. A valores de pH más bajos, la capacidad de unión es menor, como es esperable ya que una mayor proporción de grupos carboxilato están protonados ($pK_a \approx 4,50$ para pectinas) (Celus et al., 2018; Torkova et al., 2018). MP y MP-US pueden entonces formar geles en el tracto intestinal, donde el pH puede cambiar desde 6,6 en el intestino proximal hasta 6,4 en el caecum, tal como antes se informó. Ya en el íleon, donde es probable que las bacterias prefieran fibras más solubles y fácilmente digeribles como las pectinas (Briggs et al., 2020), pueden ellas allí liberar los iones calcio y Fe(II).

Jaramillo et al. (2015) determinaron que la pectina cítrica con 55-70% de DM, en dosis de 250mg, ya sea en presencia o ausencia de 800mg de Ca²⁺, no afectó significativamente la biodisponibilidad en ayunas de 5mg de hierro no hemínico (FeSO₄). Aunque las pectinas pueden unirse al hierro y al calcio, estos resultados podrían ser explicados por el efecto del pH sobre la interacción de las pectinas con estos iones y el alto grado de digestión y metabolismo en los seres humanos.

También se ha explorado el uso de pectina para la eliminación de iones metálicos tóxicos del organismo humano o metales pesados de las aguas residuales. Además, algunos estudios han explorado la interacción entre la pectina y el Fe^{2+} , principalmente en el contexto de la bioaccesibilidad (Padayachee et al., 2017; Celus et al., 2018). La pectina efectivamente reduce el hierro de la forma férrica a la forma ferrosa. En ratas alimentadas con una dieta conteniendo pectina, donde el Fe(II) unido a la pectina fue la única fuente de hierro, el nivel final de hemoglobina alcanzado con esta dieta conteniendo concentraciones crecientes de Fe(II) fue igual al nivel de hemoglobina encontrado en ratas alimentadas con dietas conteniendo las mismas cantidades de Fe(II) provistas como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Miyada et al., 2011). Esto es destacable, dado que el ion Fe(II) puede promover la oxidación lipídica en una variedad de productos a base de lípidos, y que la complejación del Fe(II) por la pectina podría efectivamente reducir la oxidación de lípidos (Minzanova et al., 2018).

Parte II. Extracción de fracciones enriquecidas en pectina y polifenoles a partir de residuos de la berenjena

II.4.7. Rendimientos de extracción de los polvos de berenjena P-CC y P-P

Las partes de los frutos de berenjena descartadas después de la selección por tamaño, forma y defectos superficiales fueron estabilizadas mediante secado, seguido luego por molienda a polvos, llamados P-CC (cáscaras y cálices) y P-P (Pulpa: mesocarpio, placenta y núcleo), tal como fuera descrito (**sección I.3.3.2**).

En el presente capítulo, estos polvos se utilizaron como fuentes para la extracción de productos químicos de interés como lo son las pectinas. La utilización de una solución acuosa de Na_2CO_3 0,1M permite hidrolizar los enlaces covalentes presentes en la pared celular del material, específicamente los enlaces éster de ferulato o de *p*-cumarato y éster diferuloil formados entre los ácidos urónicos de pectinas y azúcares neutros, enlaces del tipo pectina-uronil-glucosil-celulosa, lo cual permite la liberación de las pectinas covalentemente unidas en la pared celular (Fry, 1986). Pero también hidroliza la unión éster del galacturonato metilesterificado del HG de las pectinas. Por otro lado, por ser el Na_2CO_3 una sal, así como por su pH (>7,0) hacen que también se puedan extraer, de forma inespecífica, las pectinas que interactúan iónicamente, como por ejemplo las pectinas reticuladas por iones calcio (Fry, 1986). Dado que se extrajo a temperatura ambiente, 23°C, no debería haber ocurrido una hidrólisis significativa de enlaces glicosídicos durante la extracción de las pectinas a partir de P-CC y P-P (Fry, 1986).

Tal como se viene mencionando, aquí también se ensayó un pretratamiento con ultrasonido de alta potencia (US) (20kHz, 80% de amplitud) con el polvo (P-CC o P-P) dispersado en 200mL de agua desionizada a temperatura ambiente (23°C). Primero se consideró una cantidad de 5g de polvo (P-CC o P-P). El rendimiento de la fracción de pectina extraída fue determinado después de ensayar el aumento de los tiempos netos de pretratamiento con US, seguido de agitación con solución 0,1M de Na_2CO_3 durante 1h a temperatura ambiente. Los resultados se representan en la **Figura II.4.8 (A)**

para fracciones de pectina obtenidas a partir de P-P. Se puede observar que el rendimiento aumentó linealmente del 17,7% al 22,7% p/p, ya que el tiempo neto aplicado con US aumentó de 7min a 13min, pero no se observó ningún aumento significativo del rendimiento de pectina (23% p/p) para 20min de pretratamiento neto con US. Sin pretratamiento con US (0min), el rendimiento en la fracción de pectina obtenido del polvo P-P fue del 16,3% p/p, lo que remarcó el efecto positivo del uso de US.

Cuando se consideró el rendimiento expresado como AU (**Figura II.4.8 B**) en lugar del rendimiento en peso de la fracción de pectina extraída, los resultados obtenidos para tiempos netos con US entre 7 y 20min fueron muy similares entre ellos ($\approx 62\%$ p/p). Posteriormente, se analizó la posibilidad de utilizar una mayor cantidad de P-CC o P-P, 10g, por cada 200mL de agua durante el pretratamiento de US, antes de la agitación con 0,1M Na_2CO_3 durante 1h. Este ensayo fue posible porque la capacidad de hinchamiento (SC) determinada (**Figura I.4.4**) fue de 10,6 y 8,1mL de agua por gramo de P-CC y P-P, respectivamente. La capacidad de hinchamiento (SC) está determinada por la cantidad de líquido que pueden absorber el polvo y de cómo se hinchan los polímeros que componen estos tejidos en un exceso de agua, ocupando un volumen mayor, lo que determina la cantidad mínima de solvente de extracción por gramo de polvo de P-CC o P-P, que debe añadirse para conseguir un sistema suficientemente fluido para la agitación y fácil difusión de la pectina en el solvente. Además, para un tratamiento eficiente que permita lograr la máxima cavitación, también es necesario contar con un sistema fluido (polvo + disolvente). Polvos con alta capacidad de hinchamiento como los obtenidos de zanahorias (36mL/g polvo; Idrovo Encalada et al., 2016) no permitieron el uso de mayores proporciones de sólido a agua (5g: 500mL) para las extracciones, especialmente durante el pretratamiento con US (Idrovo Encalada et al., 2019a).

De aquí en más, las pectinas obtenidas del polvo P-CC, sin y con pretratamiento de US, fueron denominadas, respectivamente, PC y PCUS, mientras que las pectinas obtenidas del polvo P-P, sin y con pretratamiento de US, fueron denominadas, respectivamente, Mes y MesUS.

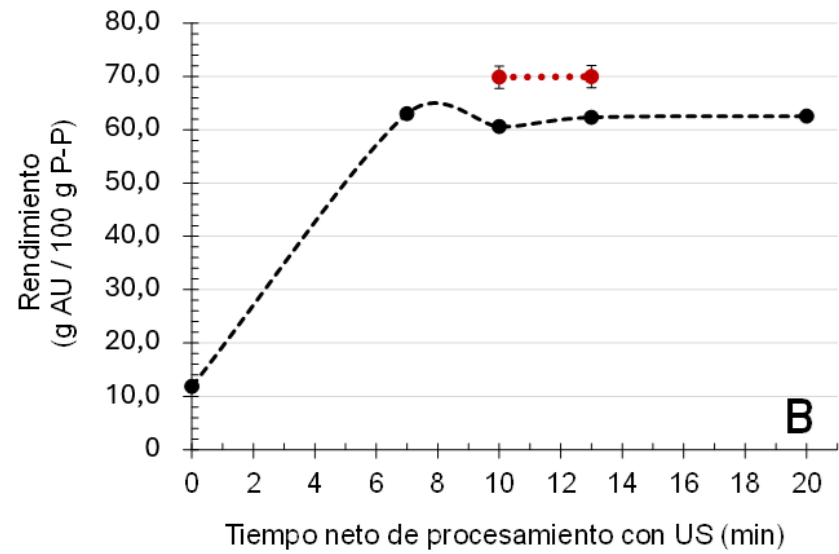
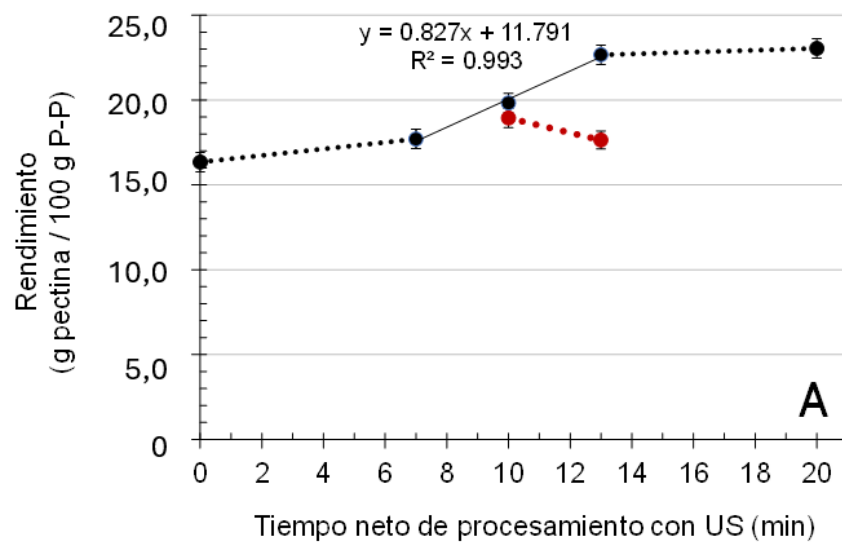


Figura II.4.8. Rendimiento de pectina (A) y rendimiento de ácido urónicos (AU) (B) obtenidos en función del tiempo neto de pretratamiento con ultrasonido de alta potencia (US) aplicado para la extracción de 10g (círculos llenos rojos) o de 5g (círculos llenos negros) de polvo P-P disperso en 200mL de agua, previo a la agitación en carbonato de sodio 0,1M durante 1h a temperatura ambiente.

Al observar los resultados obtenidos anteriormente, se realizaron las extracciones a la mitad del tiempo neto de procesamiento de US, esto es 10 y 13min (**Figura II.4.8**; color rojo). Se obtuvo un rendimiento del 19% p/p de la fracción de pectina para un pretratamiento neto de US de 10min y una relación 10g:200mL (P-P:agua) (**Figura II.4.8A**; color rojo). Fue el mismo rendimiento obtenido para una relación 5g:200mL (P-P:agua) y 10min de tiempo neto de procesamiento con US (**Figura II.4.8 A**; color negro). Cuando se expresó como AU, se obtuvieron mayores rendimientos ($\approx 70\%$ p/p) para 10 y 13min de pretratamiento neto US (**Figura II.4.8 B**; color rojo) (relación 10g:200mL P-P:agua) que para tiempos netos US entre 7 y 20min y 5g:200mL relación polvo:agua (**Figura II.4.8 B**; color negro). Para las fracciones de pectina extraídas con 5g de polvo de P-P en 200mL de agua, el mayor rendimiento (29% p/p) se obtuvo con 20min de pretratamiento neto US, mientras que 23% fue el rendimiento con 10 y 13min de pretratamiento neto con US y 10g:200mL de relación polvo:agua. Sin embargo, cuando se expresa como AU, el rendimiento más alto (80,2% p/p) se obtuvo en este último caso, y para 10min de US, mientras que el rendimiento expresado como AU fue del 76% para 13min de US. Los tiempos netos más cortos de pretratamiento de US (10min) y una mayor proporción de sólidos (10g) a agua (200mL) conducen a un menor consumo de energía por gramo de pectina seca finalmente producida, después del tratamiento final con solución de Na_2CO_3 0,1M por 1h. Por lo tanto, se eligió este procedimiento para la extracción de pectinas a partir de los tejidos de berenjena, P-CC y P-P, secos y molidos. Como se calculó previamente en este **Capítulo II (sección II.3.3.2)**, y de acuerdo a la energía de 32410J mostrada por el equipo de US, se pudo determinar una eficiencia del proceso de US aplicado mayor al 90% para el sistema polvo-solvente (10g:200mL polvo:agua; 10min de tiempo neto de US) utilizado, con una energía real consumida de 40633J y una potencia real de 67,7W experimentalmente determinada y calculada de acuerdo a Mamvura et al. (2018). Además, considerando la punta de US utilizada (**sección II.3.4**), de 13mm de diámetro, se calculó una intensidad de potencia de 12,76W/cm². Valores de intensidad de potencia cercanos o arriba de 10W/cm² son ya suficientes para formar burbujas transientes que funcionan como micro-reactores, responsables del efecto químico y mecánico del US aquí aplicado (Santos et al., 2009).

II.4.8. Color de las pectinas extraídas de los polvos P-CC y P-P

Las coordenadas de color del espacio CIE-Lab de las pectinas secas extraídas de P-CC o P-P, sin y con pretratamiento con US, se reportan en la **Tabla II.4.3**. El parámetro L^* estuvo entre 19 y 42%, siendo mayor la luminosidad L^* para las pectinas extraídas con pretratamiento de US. Los valores de a^* estuvieron entre +3,4 y +4,12, mientras que los valores de b^* estuvieron entre +6,2 y +14,2. La mayor luminosidad (L^*) de las pectinas aisladas por pretratamiento de US puede atribuirse al aislamiento de pigmentos después de la cavitación que, después de la precipitación de la pectina con etanol, permanecieron en el sobrenadante etanólico y posteriormente se perdieron al filtrar.

De acuerdo con los parámetros a^* y b^* (**Tabla II.4.3**), las pectinas obtenidas fueron de color marrón sepia (**Figura II.4.9**). Cabe destacar que, aunque hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de a^* y entre los valores de b^* determinados en las pectinas obtenidas por cada método extractivo (**Figura II.4.9**), estas diferencias no se aprecian visualmente.

Tabla II.4.3. Coordenadas^a de color CIE-Lab de las pectinas extraídas (PC, PCUS, Mes y MesUS) de los polvos de berenjena P-CC (cáscara + cáliz) o P-P (pulpa: mesocarpio, placenta y núcleo), sin y con pretratamiento de ultrasonido de alta potencia (US).

	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
L^* (%)	19 ± 3 ^A	33 ± 1 ^B	22,3 ± 0,3 ^C	42 ± 2 ^D
a^*	3,6 ± 0,4 ^A	3,92 ± 0,05 ^B	4,12 ± 0,07 ^C	3,40 ± 0,03 ^D
b^*	6,2 ± 0,5 ^A	8,6 ± 0,2 ^B	10,8 ± 0,2 ^C	14,2 ± 0,4 ^D

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 10$. Diferentes letras mayúsculas como superíndices en una fila dada indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados.

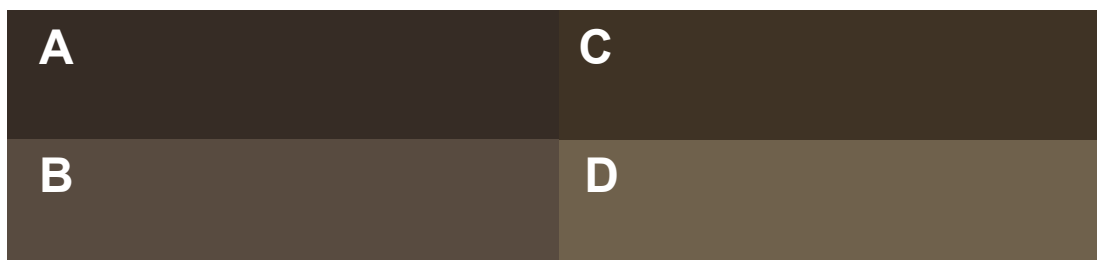


Figura II.4.9. Colores de las pectinas extraídas (A) PC, (B) PCUS, (C) Mes, (D) MesUS.

II.4.9. Caracterización química de las fracciones extraídas de los polvos de berenjena P-CC y P-P

Los resultados de la caracterización química de las fracciones enriquecidas en pectinas aisladas de los polvos de berenjena P-CC y P-P después de 1h de agitación en 0,1M Na₂CO₃ a temperatura ambiente, sin (PC o Mes) o con pretratamiento de US (PCUS o MesUS), se reportan en la **Tabla II.4.4**.

Tabla II.4.4. Rendimiento^a y composición química^a de cada fracción de pectina obtenida de los polvos de berenjena P-CC y P-P sin o con pretratamiento de ultrasonido de alta potencia (US) (intensidad de potencia: 12,76W/cm²; 10g polvo/200mL agua) seguido de 1h de agitación en solución acuosa de carbonato de sodio 0,1M (10g polvo/300mL solución) a 23°C.

	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
Rendimiento (g/100g polvo P-CC o P-P)	15,0±0,8 ^A	23,3 ± 0,4 ^B	11,3±0,2 ^C	20,0 ± 0,8 ^D
Proteínas (g/100g pectina)	21,3±0,1 ^A	14,4±0,3 ^B	20,6±0,2 ^C	11,7±0,3 ^D
Carbohidratos totales (g/100g pectina)	76,4±0,7 ^A	82,2±0,5 ^B	77±1 ^A	84,2±0,6 ^D
Azúcares reductores (g/100g pectina)	0,9±0,1 ^A	0,97±0,08 ^A	1,4±0,1 ^C	1,6±0,1 ^C
Ácidos urónicos (AU) (g/100g pectina)	72,2±0,4 ^A	76±1 ^B	65,8±0,2 ^C	69,8±0,5 ^D
DM (% molar)	6,5±0,2 ^A	5,37±0,05 ^B	8,7±0,1 ^C	7,13±0,04 ^D
DA (% molar)	10,3±0,2 ^A	9,4±0,3 ^B	8,3±0,2 ^C	7,9±0,5 ^C
Azúcares neutros (NS) ^b (g/100g pectina)	3,3	5,2	9,8	12,8
NS/AU ^c (relación molar)	0,05	0,07	0,15	0,22
Porcentaje recuperado de ácidos urónicos a partir de P-CC o P-P (%)	54,11	80,25	82,01	93,8

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para n = 3 (o n = 10 para los parámetros de color). Diferentes letras mayúsculas como superíndices en una fila dada indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados.

^b Los NS se calculan como: NS = Carbohidratos totales - (ácidos urónicos + azúcares reductores)

^c Los moles de NS se calcularon con una masa molar media de monosacáridos ponderada de 166,73 g/mol considerando la composición típica de monosacáridos de las pectinas (Basanta et al., 2013).

Es evidente el aumento significativo ($p < 0,05$) en el rendimiento (15 a 23,3g/100g P-CC; 11,3 a 20,0g/100g P-P) cuando se incluyó el pretratamiento con US. El contenido de proteínas de las fracciones extraídas varió entre 11,7 y 21,3%, disminuyendo del 21,3-20,6% al 14,4% u 11,7% cuando se aplicó el pretratamiento de US.

Las fracciones estaban constituidas principalmente por carbohidratos (76,4-84,2%), con sólo una proporción muy baja de azúcares reductores (0,9-1,6%), por lo cual, estaban constituidas por polisacáridos. Estos polisacáridos incluían los AU, cuyo contenido fue superior a 65% (**Tabla II.4.4**), lo que significa que estas fracciones estaban constituidas por pectinas, tal como se definen comercialmente (Ciriminna et al., 2016), siendo esencialmente HG. Por lo tanto, el contenido de NS fue relativamente bajo (3,3-12,8 g/100g), después de ser calculado como la diferencia entre el contenido carbohidratos totales y el de AU más el contenido de azúcares reductores (**Tabla II.4.4**).

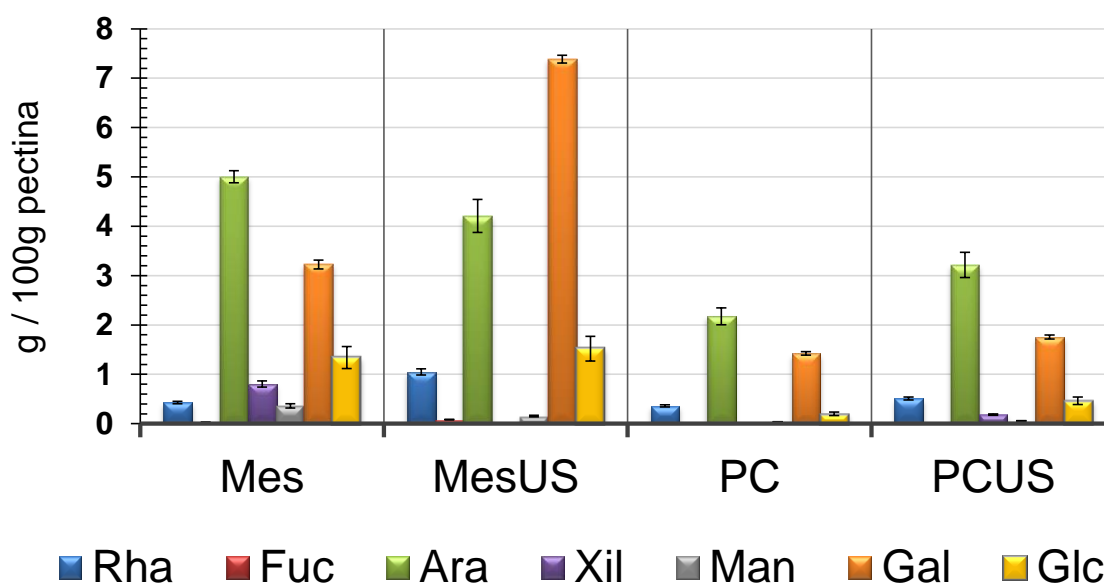


Figura II.4.10. Composición de los azúcares neutros de las pectinas extraídas de la berenjena, denominadas PC, PCUS, Mes y MesUS, tal y como se obtuvieron de cáscara + cálices (P-CC) y del resto del fruto (P-P) por agitación en carbonato de sodio 0,1M (1h), ya sea sin o con pretratamiento por ultrasonido de alta potencia (US). Las barras de error corresponden a la desviación estándar ($n = 3$).

Se determinó la composición en monosacáridos de los NS, la cual se muestra en la **Figura II.4.10**. La Ara y la Gal fueron los componentes mayoritarios, presentes a niveles entre 1,42 y 7,4g/100g de pectina aislada, y corresponden a las regiones ramificadas o RG-I de las pectinas, siendo la Rha (0,36-1,05g/100g de pectina) el monómero al que se unen covalentemente las cadenas laterales de arabinogalactanos y arabinanos. La Rha se alterna entre cadenas de HG, formando los núcleos de RG-I. Como se observa en la **Figura II.4.10**, las PC y PCUS mostraron los contenidos más bajos de componentes del RG-I.

Las pectinas Mes y MesUS mostraron también menores cantidades de Glc, 1,34-1,52g / 100g de fracción de pectina aislada (**Figura II.4.10**). Después del tratamiento alcalino suave (Na_2CO_3 0,1M) de los tejidos deshidratados (P-P) para la extracción de las fracciones pécticas Mes y MesUS, la Glc sólo podría ser atribuida al almidón residual proveniente del contenido celular del mesocarpio, placenta y núcleo (semillas) en P-P. Sin embargo, el contenido de almidón que ha sido reportado para la berenjena es bajo, 1,4-4,9g / 100g de fruto (San José et al., 2014; Sharma y Kaushik, 2021).

Las relaciones molares NS/AU, calculadas sobre la composición en monosacáridos de los NS (**Figura II.4.10**) de las pectinas extraídas fueron muy bajas, entre 0,05 y 0,22, lo que indica que las pectinas extraídas eran esencialmente HG como se mencionó anteriormente, con sólo RG-I residuales. A su vez, las relaciones NS/AU para PC (0,05) y PCUS (0,07) fueron más bajas que para Mes (0,15) y MesUS (0,22), debido ello al contenido algo menor en AU de Mes y MesUS (**Tabla II.4.4**). El análisis de las proporciones de NS de la pectina permite obtener información valiosa sobre las regiones del RG y del HG. La relación molar NS a AU da una idea general de la proporción de ramificación en RG-I; una relación NS / AU baja indica pectinas ligeramente ramificadas, con bajo contenido de RG (Basanta et al., 2014).

El grado de metilación (DM) de las pectinas extraídas fue bajo, entre 5,3 a 8,7% molar, en concordancia con el pH alcalino de extracción, que genera la hidrólisis de los ésteres metílicos presentes en los AU. Sin embargo, teniendo en cuenta este hecho, el DA de los HG (10,3-7,9% molar; **Tabla II.4.4**) siguió siendo significativo. El DA de las pectinas contenidas en los polvos P-CC y P-P fue del 18% y 10,5% (molar), respectivamente, mientras que el DM de los AU contenidos en los polvos fue del 27,2 y 32,3% (molar), respectivamente (**Tabla I.4.1**).

Los polvos de P-CC y P-P estaban constituidos por 23,9 y 14,1% de AU, respectivamente (**Tabla I.4.1**). Si además se consideran los rendimientos de pectina obtenidos después de la extracción y los respectivos contenidos de AU de estas pectinas (**Tabla II.4.4**), los mayores rendimientos de extracción en AU fueron los de las pectinas obtenidas mediante la aplicación del pretratamiento con US, 80,25% y 93,8%, a partir de P-CC y P-P, respectivamente (**Tabla II.4.4**).

II.4.10. Peso molecular de las pectinas extraídas de los polvos de berenjena P-CC y P-P

El comportamiento reológico es crítico para el desempeño de las pectinas como aditivo alimentario, y la distribución del peso molecular puede contribuir a predecir el comportamiento reológico (Dangi et al., 2020). Los pesos moleculares promedio en peso (M_w) determinados para las pectinas extraídas estuvieron entre 90,2kDa y 138,2kDa, mientras que los pesos moleculares promedio numéricos (M_n) estuvieron entre 72,6 y 98,8kDa. Los valores de M_w y M_n más bajos se obtuvieron para aquellas pectinas extraídas aplicando el pretratamiento de US (**Tabla II.4.5**). El tratamiento por US provoca la fractura de las cadenas laterales y los enlaces glicosídicos que constituyen los polisacáridos. Se ha informado que el desplazamiento del polímero y el disolvente durante el colapso de la burbuja de cavitación generan fuerzas de fricción y cizallamiento que producen la degradación y fractura de los polímeros. Los polímeros grandes con cadenas más largas son más sensibles a la cavitación. El aumento de la intensidad ultrasónica mejora la energía de cavitación y aumentará el número de burbujas de cavitación, aumentando así la velocidad y el grado de degradación (Li et al., 2022).

La polidispersidad, que proporciona una indicación del rango de pesos moleculares que constituye la pectina, calculada como la relación M_w/M_n , fue 1,32-1,40 (**Tabla II.4.5**). Esta polidispersidad es sorprendentemente cercana a 1,0, lo que significa que las longitudes de las cadenas casi no difieren entre sí. Esto no se observa comúnmente en las pectinas. Inclusive, pectinas purificadas y del mismo origen tienen generalmente una amplia polidispersidad. Las características moleculares y la composición se ven afectadas por la especie vegetal y el método de extracción (Zhang et al., 2019).

Tabla II.4.5. Valores de pesos moleculares promedio en peso (M_w) y numéricos (M_n) y polidispersidad (M_w/M_n) de las pectinas extraídas (PC, PCUS, Mes y MesUS) de los polvos de berenjena P-CC y P-P, con y sin pretratamiento de ultrasonido (US).

	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
M_w (kDa)	138,2	108,8	119,7	90,2
M_n (kDa)	98,8	81,6	90,8	72,6
M_w/M_n	1,40	1,33	1,32	1,36

II.4.11. Espectros FT-IR de las pectinas extraídas de los polvos de berenjena P-CC y P-P

Los espectros FTIR correspondientes a las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS se muestran en la **Figura II.4.11**. Ellos muestran una alta similitud con los espectros registrados de las pectinas extraídas del polvo de zanahorias de descarte mediante Na_2CO_3 0,1M sin y con pretratamiento de US por Idrovo Encalada et al. (2019a).

La banda ancha de absorción que se encuentra a 3392cm^{-1} para las pectinas extraídas de la berenjena se atribuye a la vibración de estiramiento O-H, banda ensanchada debido a la formación de puentes de hidrógeno de los grupos hidroxilo. La débil banda de absorción observada a $2907\text{-}2925\text{cm}^{-1}$ corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-H de los grupos $-\text{CH}_2$ del esqueleto de la macromolécula de pectina.

Se observa una banda intensa a 1602cm^{-1} de oscilaciones simétricas y asimétricas que es característica de los grupos carboxilo libre ionizados, mientras que la banda a $\approx 1730\text{cm}^{-1}$ de los grupos carboxilato esterificados está casi ausente. Por otro lado, se observó que, para las pectinas extraídas de los polvos de berenjena, la banda de vibración de estiramiento del grupo C=O del carboxilato metilesterificado, a aproximadamente 1730cm^{-1} , se encuentra ausente, lo cual es típico de las pectinas con muy bajo DM, que es el caso de estas pectinas (**Tabla II.4.4**). Como se menciona anteriormente, las pectinas se extrajeron en medio alcalino, provocando la saponificación de los esteres metílicos.

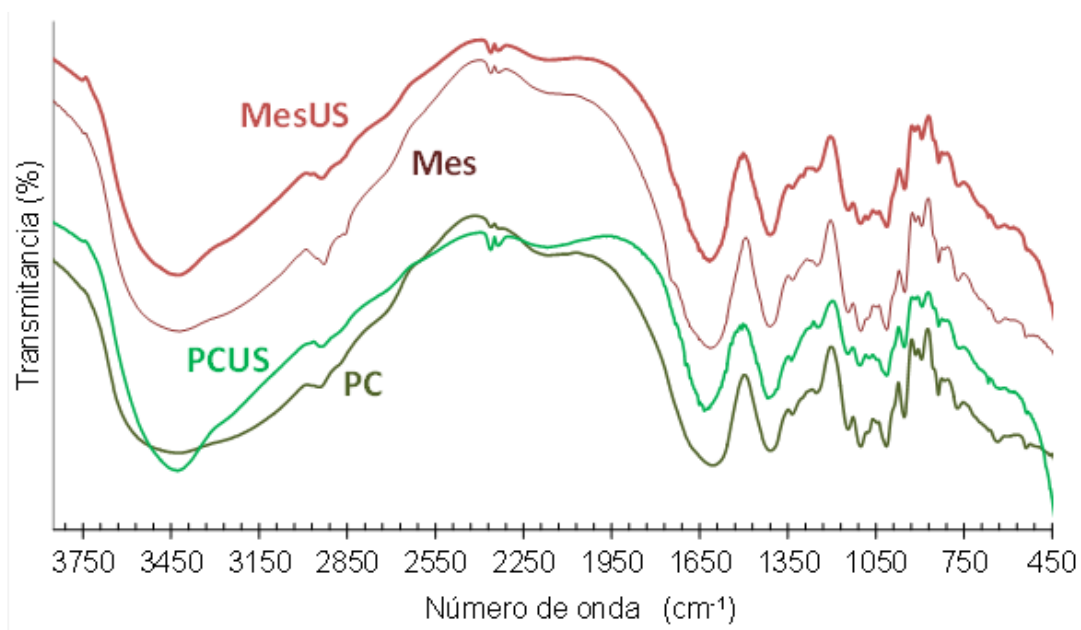


Figura II.4.11. Espectro de FT-IR de las pectinas extraídas de berenjena.

Wandee et al. (2019) realizaron extracciones de pectina de cáscara de pomelo en medio alcalino fuerte a diferentes concentraciones. Las pectinas extraídas en solución de NaOH 25mM presentaron una pequeña banda del grupo C=O del carboxilato metilesterificado a 1733cm^{-1} , la cual desapareció después de la extracción con concentraciones alcalinas más altas (50 - 200mM). El par de bandas de estiramiento carbonílico de carboxilato se desplazaron a 1595 y 1408cm^{-1} (estiramientos COO^- asimétricos y simétricos) en comparación con la extracción en agua (1603 y 1438cm^{-1} , respectivamente). El cambio de las bandas de estiramiento del carboxilato péctico a un número de onda más bajo puede atribuirse a su complejación con iones de la sal.

Las señales a 1398, 1321 y 1232cm^{-1} son propias de la zona de huellas digitales del espectro, bandas características de absorción para los enlaces del tipo C-H y correspondientes a los grupos glicosídicos C-O-C del anillo de piranosa, así como las bandas a 1118, 1091, 1008 y 948cm^{-1} , típicas de la cadena de ácido poligalacturónico (HG), de acuerdo con lo determinado por Lee et al. (2005) y Coimbra et al. (1999). Los picos de absorción a 835 y 890cm^{-1} indican la existencia de enlaces glicosídicos de tipo α y tipo β en estos componentes de la pectina (Coimbra et al., 1998).

II.4.12. Funcionalidad antioxidante

II.4.12.1. Antioxidantes lipofílicos

Se determinó la composición en antioxidantes lipofílicos coextraídos con las pectinas y los resultados se muestran en la **Tabla II.4.6**. Los tocoferoles no fueron detectables en ninguna de las pectinas extraídas. En cambio, se identificaron β -caroteno y luteína en aquellas pectinas aisladas con el pretratamiento de US, siendo también significativamente ($p < 0,05$) mayor en las pectinas extraídas del polvo de cáscaras y cálices (P-CC).

Jaeschke et al. (2016) obtuvieron la mayor recuperación de carotenoides (80%) de la microalga *Heterochlorella luteoviridis* utilizando una intensidad de US del 50% (potencia total: 664W), a 30°C y etanol 75%. Los autores observaron una disminución significativa (59%) en el rendimiento de extracción a una amplitud de US del 100%. El uso de un rango optimizado de intensidad de US es un parámetro crucial para obtener el mayor rendimiento de carotenoides en las extracciones. Por encima del rango óptimo, la mayor intensidad de US puede conducir a la formación y acumulación de radicales $H\bullet$ e $HO\bullet$ durante el proceso de cavitación, lo que puede conducir a una degradación significativa de los compuestos antioxidantes, incluidos los carotenoides (Pingret et al., 2013).

Tabla II.4.6. Composición^a en antioxidantes lipofílicos coextraídos con las pectinas (PC, PCUS, Mes y MesUS) obtenidas de los polvos de berenjena P-CC y P-P, sin y con pretratamiento de US.

$\mu\text{g}/100\text{g}$ pectina	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
α -tocoferol	ND	ND	ND	ND
γ -tocoferol	ND	ND	ND	ND
β -caroteno	ND	$8,1 \pm 0,2^B$	ND	$2,1 \pm 0,4^D$
Luteína	$3,2 \pm 0,2^A$	25 ± 8^B	ND	$3,4 \pm 0,3^A$

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 3$. Misma letra mayúscula como superíndices en una fila dada significan diferencias no significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, Idrovo Encalada et al. (2019a, 2019b) encontraron α y β -caroteno, luteína y α -tocoferol como antioxidantes lipofílicos co-extraídos en las pectinas aisladas de zanahoria mediante Na_2CO_3 0,1M donde, con el tratamiento previo de US, el contenido de antioxidantes fue menor, obteniéndose un producto "más purificado" en estos antioxidantes co-extraídos.

II.4.12.2. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos co-extraídos presentes en las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS fueron analizados mediante técnicas cromatográficas. En primer lugar, se determinó el perfil de los llamados "compuestos fenólicos extraíbles" con acetona/agua/ácido acético (70:29,5:0,5 v:v:v) (sección II.3.11.1), los cuales fueron finalmente concentrados en fase sólida como extracto metanólico y analizado mediante HPLC-DAD y HPLC-ESI-EM. El análisis cromatográfico fue a longitudes de onda de 280, 320, 360 y 520nm (sección I.3.11.2). En la **Figura II.4.12** se muestran los cromatogramas resultantes, observándose picos mayoritarios a 320nm y los resultados se resumen en las **Tablas II.4.7** y **II.4.8**. Se identificaron cinco compuestos fenólicos extraíbles en las pectinas obtenidas del exocarpio o cáscara y cálices (PC y PCUS) y seis en las pectinas obtenidas del resto del fruto (Mes y MesUS).

En la **Tabla I.4.3** se observa la composición encontrada en compuestos fenólicos extraíbles hallados en los polvos P-CC y P-P, habiéndose determinado un contenido total de 140,5 y 71,7mg/100g polvo, respectivamente. Las condiciones utilizadas para la extracción de pectinas permitieron la co-extracción de algunos de los compuestos fenólicos (**Tabla II.4.7** y **Tabla II.4.8**) previamente identificados en P-CC y P-P (**Tabla I.4.3**). Al comparar los resultados, se encontraron contenidos más bajos de compuestos fenólicos extraíbles en las pectinas (**Tabla II.4.8**), en especial para aquellas obtenidas a través del pretratamiento de US (0,819 y 0,706mg / 100g para PCUS y MesUS, respectivamente) en relación con las pectinas extraídas directamente con Na_2CO_3 (1,615 y 1,296mg / 100g PCUS y MesUS, respectivamente) (**Tabla II.4.8**). La diferencia en las concentraciones de los compuestos fenólicos debida al tratamiento de extracción podría deberse a dos posibilidades:

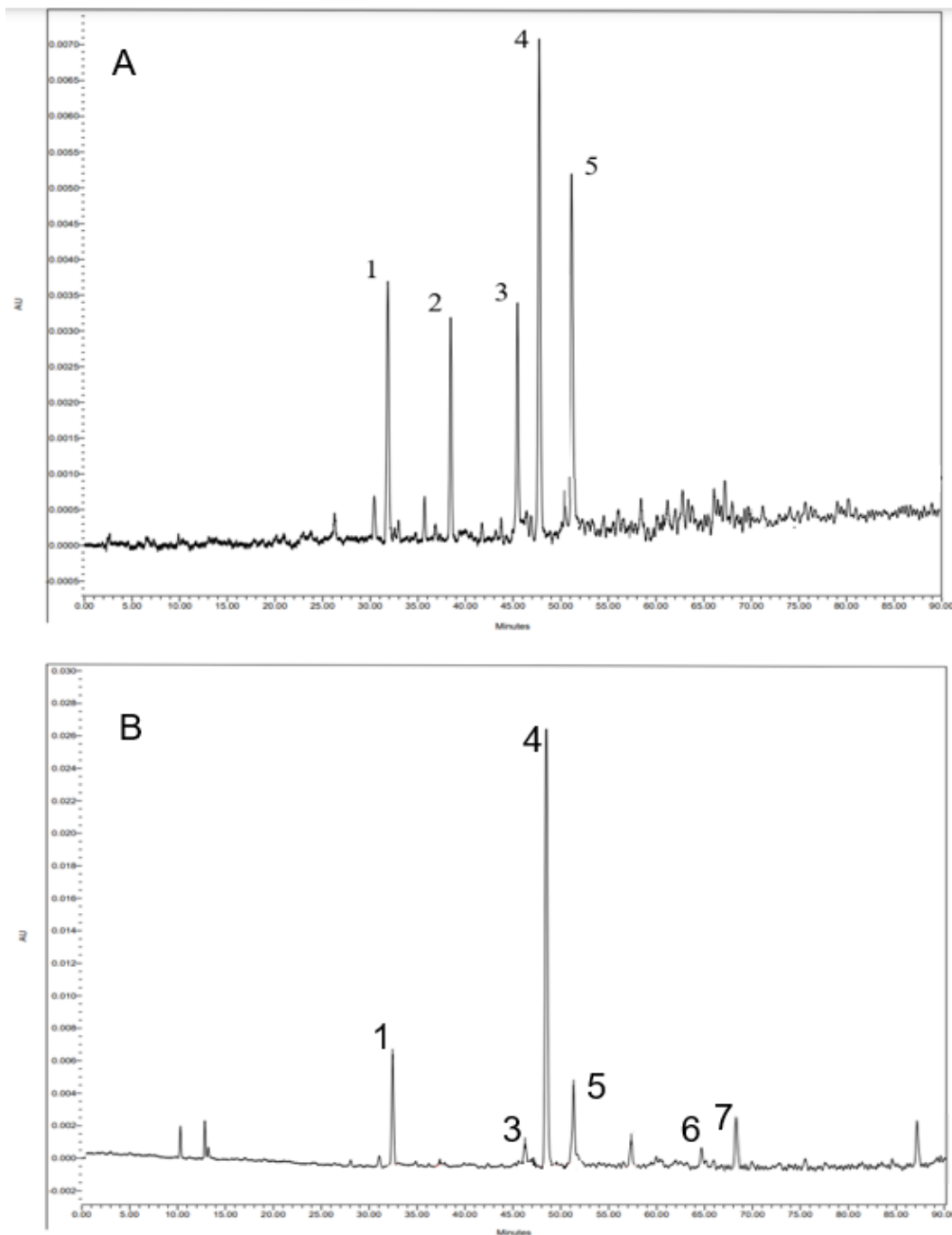


Figura II.4.12. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD a 320nm de los compuestos fenólicos extraídos de **(A)** las pectinas PC y PCUS (picos: 1, N-cafeoilputrescina; 3, O-metil-N-cafeoilputrescina; 4, ácido cafeoilquínico; 5, isómero del ácido cafeoilquínico); **(B)** las pectinas Mes y MesUS (picos: 1, N-cafeoilputrescina; 3, O-metil-N-cafeoilputrescina; 4, ácido cafeoilquínico; 5, isómero del ácido cafeoilquínico; 6, N-cafeoil-N-dihidrocafeolespermidina; 7, N, N-dicafeilspermidina).

1) podría atribuirse a la degradación de compuestos fenólicos por el aporte excesivo de energía mediante US (Liao et al., 2015). Además, un gran número de radicales libres generados podría acelerar o desencadenar reacciones químicas en el medio de extracción e inducir la degradación de los compuestos fenólicos. También los tiempos de tratamiento adecuado son importantes para la extracción de compuestos bioactivos; la duración prolongada del US puede conducir a la degradación de flavonoides y ácidos fenólicos y, así, a la disminución del rendimiento.

2) el fenómeno de cavitación acústica causado por la propagación de ondas de presión de US promueve la formación e implosión de microburbujas en la superficie de la matriz, lo que resulta en microchorros que generan diversos efectos en las estructuras vegetales. Además, la implosión de microburbujas de cavitación en un medio líquido conduce a macroturbulencias y micromezcla. Estos efectos combinados resultan en el colapso de la matriz vegetal, permitiendo la penetración del solvente en el material vegetal y mejorando la liberación de sustancias intracelulares en el solvente, aumentando así las tasas de extracción (Chemat et al., 2017). También la generación de ciertos lugares con ligeros aumentos de temperatura que pueden contribuir a una mayor recuperación de compuestos fenólicos por el ablandamiento y el hinchamiento o *swelling* de los tejidos vegetales, el debilitamiento de las interacciones compuesto fenólico-macromoléculas, el aumento de la solubilidad de los compuestos en el sistema de extracción, la reducción de la viscosidad y la tensión superficial del disolvente, y el aumento de la movilidad molecular. Estos efectos combinados hacen que la matriz vegetal sea más permeable y facilitan la penetración del solvente extractivo en la matriz, acelerando la velocidad de transferencia de masa (Arruda et al., 2017). Por lo tanto, los compuestos fenólicos quedan disueltos en la solución acuosa y son separados de la pectina al realizar la precipitación con etanol.

Tabla II.4.7. Resultados del análisis por HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS de los compuestos fenólicos extraíbles identificados en las pectinas de berenjena (PC y PCUS, Mes y MesUS) aisladas sin y con pretratamiento de ultrasonido (US) seguido de agitación por 1h en Na₂CO₃ 0,1M.

Compuesto fenólico	Pico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	MS[M-H] ⁺ (m/z)	MS/MS [M-H] ⁺ (m/z)	Ion Fórmula
N-cafeoilputrescina	1	33,6	317	251,139	234,1132 / 163,0408 / 145,0296 / 135,0441	C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₃
<i>p</i> -coumaroilputrescina	2	38,4 ^a	291	235,1451	218,1173 / 147,0446	C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₂
O-metil-N-cafeoilputrescina	3	46,5	315	265,1547	248,1286 / 177,0568 / 145,0315	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ₃
Ácido cafeoilquínico	4	49,0	324	355,1024	163,0354 / 145,0252	C ₁₆ H ₁₉ O ₉
Isómero del ácido cafeoilquínico	5	51,6	324	355,1024	163,0354 / 145,0252	C ₁₆ H ₁₉ O ₉
N-cafeoil-N- dihidrocafeolespermidina	6	60,2 ^b	318	472,3253	310,2660 / 222,1501 / 163,0666	C ₂₅ H ₃₄ N ₃ O ₆
N,N-Dicafeolespermidina	7	68,0 ^b	317	470,2264	308,1931 / 220,0950 / 163,0369	C ₂₅ H ₃₂ N ₃ O ₆

^a Solamente fue identificado para las pectinas PC y PUS.

^b Solamente fue identificado para las pectinas Mes y MesUS.

Al observar los perfiles cromatográficos HPLC-DAD registrados a 320nm en conjunto con los cromatogramas obtenidos HPLC-MS/MS de las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS, y al realizar la comparación con los resultados previamente obtenidos (**Tabla II.3.3**), el principal compuesto fenólico extraído para todas las pectinas fue el ácido cafeoilquínico y su isómero (picos 4 y 5 en **Figura II.4.12**; **Tabla II.4.7**). Ambos componentes mostraron un ion [M+H]⁺ a m/z 355,1024 con las fragmentaciones características MS² en m/z 163,0354, formado por la pérdida de un residuo de ácido quínico. (**Figura I.4.8**).

Tabla II.4.8. Composición^a de compuestos fenólicos extraíbles identificados en las pectinas de berenjena (PC y PCUS, Mes y MesUS) aisladas sin y con pretratamiento de ultrasonido (US), seguido de agitación en Na₂CO₃ 0,1M de los tejidos deshidratados de berenjena P-CC y P-P.

	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
Compuestos fenólicos extraíbles (mg/100g)				
N-cafeoilputrescina	0,24 ± 0,02 ^A	0,204 ± 0,009 ^B	0,086 ± 0,003 ^C	0,127 ± 0,007 ^D
<i>p</i> -coumaroilputrescina	0,155 ± 0,008 ^A	0,105 ± 0,007 ^B	ND	ND
O-metil-N-cafeoilputrescina	0,17 ± 0,01 ^A	0,064 ± 0,007 ^B	0,064 ± 0,004 ^B	0,086 ± 0,006 ^D
Ácido cafeoilquínico	0,47 ± 0,07 ^A	0,29 ± 0,03 ^B	0,86 ± 0,05 ^C	0,288 ± 0,009 ^B
Isomero ácido cafeoilquínico	0,58 ± 0,09 ^A	0,156 ± 0,004 ^B	0,129 ± 0,007 ^C	0,096 ± 0,008 ^D
N-cafeoil-N-dihidrocafeolespermidina	ND	ND	0,068 ± 0,005 ^C	0,039 ± 0,003 ^D
N,N Dicafeolespermidina	ND	ND	0,089 ± 0,004 ^C	0,07 ± 0,01 ^D
Fenólicos Totales	1,615	0,819	1,296	0,706

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar (n = 3). Letras mayúsculas diferentes como superíndices en una fila dada indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados.

También se identificó N-cafeoilputrescina (pico 1 en **Figura II.4.12**), la cual mostró un ion pseudo-molecular [M+H]⁺ a m/z 251,139 y fragmentos MS² en m/z 234,1132 y 163,0408, formados por la pérdida de ión amonio y de un residuo de putrescina, respectivamente. El compuesto siguiente fue la *p*-cumaroilputrescina (pico 2 en **Figura II.3.12**; **Tabla II.4.7**; [M+H]⁺ a m/z 235,1451 y el fragmento MS² a m/z 147,0446), formado por la pérdida de residuos de putrescina. La O-metil-N-cafeoilputrescina (pico 3 en **Figura II.4.12**) presentó un ión [M+H]⁺ a m/z 265,1286 con fragmentos MS² a m/z 177,0568 y 145,0315 por la pérdida de putrescina y un residuo metoxilo, respectivamente (**Tabla II.4.7**). N-cafeoilputrescina (pico 1 en **Figura II.4.12**) y O-metil-N-cafeoilputrescina (pico 3 en **Figura II.4.12**) estuvieron presentes en todas las pectinas extraídas de los polvos de berenjena, donde la mayor concentración se obtuvo para las pectinas PC y PCUS. (**Tabla II.4.8**).

Por otro lado, sólo se encontró el compuesto *p*-cumaroilputrescina en las pectinas obtenidas del polvo P-CC (pico 2, en **Figura II.4.12 A**), con concentraciones de 0,105 y 0,155mg/100g de PCUS y PC, respectivamente, siendo el compuesto fenólico minoritario. En un estudio realizado en cáscaras y pulpa de berenjena por Sulli et al. (2021), se detectó este compuesto solamente en la cáscara. Tanto el ión molecular como las fragmentaciones de éste se reportan en la **Tabla II.4.7**, presentando un fragmento MS² en m/z 147,0446, formado por la pérdida de putrescina (**Figura II.4.12**). En cambio, sólo se encontraron N-cafeoil-N-dihidrocafeolespermidina (pico 6, en **Figura II.4.12B**; **Tabla II.4.7**) y N,N-dicafeolespermidina (pico 7 en **Figura II.4.12B**; **Tabla II.4.7**) en las pectinas extraídas del polvo P-P, y en bajas concentraciones, siendo la N-cafeoil-N-dihidrocafeolespermidina el compuesto fenólico minoritario presente con una concentración de 0,068 y 0,039mg/100g de Mes y MesUS, respectivamente. Para este último compuesto fenólico, se halló un ión pseudo-molecular [M+H]⁺ a m/z 472,3253, con un fragmento MS² en m/z 310,2660; 222,1501 y 163,0369, formado por la pérdida de residuos de ácido dihidrocafeico y de espermidina, respectivamente.

La N,N-dicafeolespermidina mostró un ión [M+H]⁺ a m/z 470,2264, con un fragmento MS² a m/z 308,19131; 220,0950 y 163,0369, formados por la pérdida de residuos de ácido cafeico y espermidina, respectivamente (**Table II.4.7**). Todos estos derivados de putrescina y espermidina, llamados fenolamidas, fueron ya previamente encontrados en frutos de berenjena (Roumani et al., 2020). Las fenolamidas son el resultado de la reacción de al menos un ácido hidroxicinámico como el ácido cafeico con una monoamina o una poliamina alifáticas tal como putrescina y espermidina, produciendo la amida derivada (Meyer et al., 2015).

En el presente trabajo se analizaron también las proantocianidinas mediante reacción con catálisis ácida en exceso de floroglucinol, en acople con la determinación por HPLC-MS-MS en fase reversa (**sección II.3.10.4**). En las pectinas extraídas PC, PCUS, Mes y MesUS, las proantocianidinas no fueron detectables.

Después del tratamiento con solución de NaOH, se determinaron los “compuestos fenólicos no extraíbles”, es decir, covalentemente unidos, específicamente esterificados a las pectinas (**sección II.3.10.3**). El componente principal fue el monómero ferulato (2,09-2,9mg/100g de pectina)

(Tabla II.4.9). Se observó un ligero aumento en la concentración del ferulato monómero para aquellas pectinas extraídas utilizando un pretratamiento de US (Figura II.4.13 A y Figura II.4.14 A). Se ha reportado el monómero de ferulato esterificado a las cadenas laterales de Ara del RG-I de las pectinas (Fry, 1986). Por otra parte, se encontraron menores niveles de diferulato (0,656-1,70mg/100g de pectina) (Tabla II.4.9), donde se observa una disminución en la concentración en las pectinas extraídas utilizando un pretratamiento de US (Figuras II.4.13 B y II.4.14 B). El producto más simple de acoplamiento del ferulato es el diferulato. Puentes diferulato relacionan cadenas vecinas de pectina en la pared celular (Fry, 1986).

Dobberstein y Bunzel, (2010) demostraron que los ácidos ferúlico y *p*-cumárico liberados por tratamiento alcalino están principalmente esterificados a polisacáridos de la pared celular vegetal como arabinoxilanos y pectinas. También las moléculas de pectina pueden encontrarse unidas covalentemente por acoplamiento oxidativo de sus sustituyentes fenólicos de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico. Se han encontrado pequeñas cantidades de sinapato, enlazados con polisacáridos.

Tabla II.4.9. Composición^a en compuestos fenólicos unidos covalentemente identificados en las pectinas de berenjena (PC, PCUS, Mes y MesUS) aisladas a partir de los tejidos deshidratados de berenjena P-CC y P-P, sin y con pretratamiento de ultrasonido (US) y agitación en Na₂CO₃ 0,1M.

	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
Ácido ferúlico esterificado^a (mg/100g pectina)				
Monómero	2,09 ± 0,04 ^A	2,9 ± 0,1 ^B	2,2 ± 0,2 ^A	2,7 ± 0,1 ^B
Dímero	1,70 ± 0,06 ^A	0,66 ± 0,07 ^B	1,39 ± 0,05 ^C	0,77 ± 0,07 ^B
Total	3,79	3,56	3,59	3,47

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para n = 3. Diferentes letras mayúsculas como superíndices en una fila dada indican diferencias significativas (p < 0,05) entre los resultados.

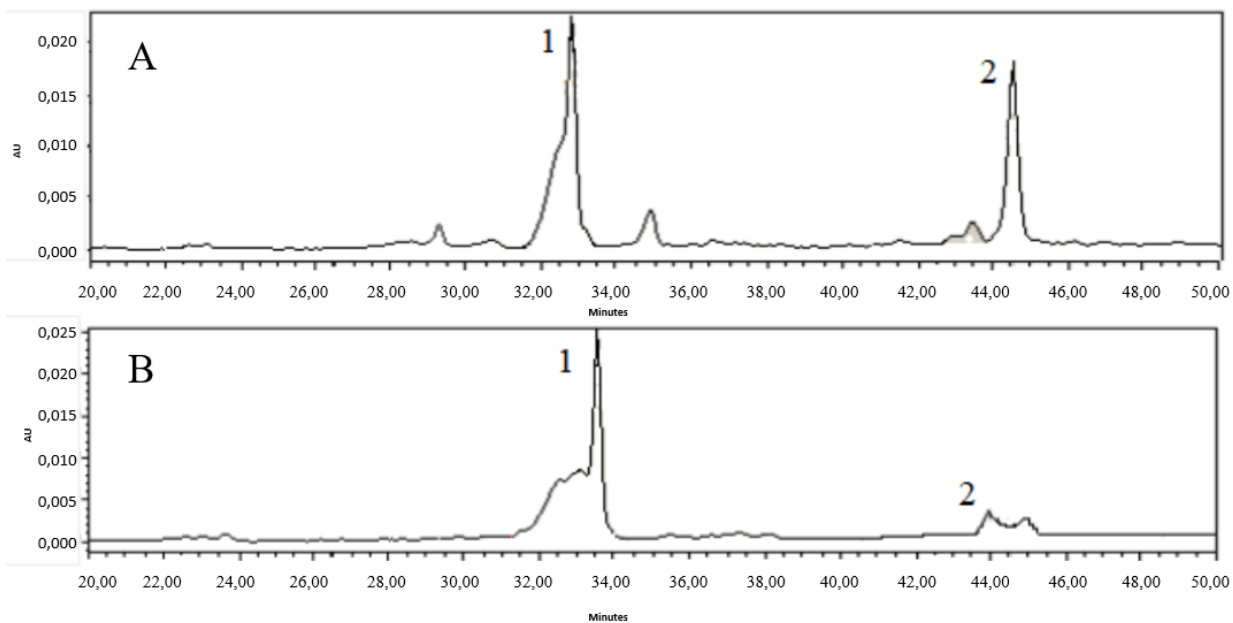


Figura II.4.13. Cromatogramas HPLC-DAD obtenidos a 320nm para compuestos ferúlicos esterificados determinados en las pectinas de berenjena: **(A)** Mes, pico: 1, monómero; 2, dímero. **(B)** MesUS, pico: 1, monómero; 2, dímero.

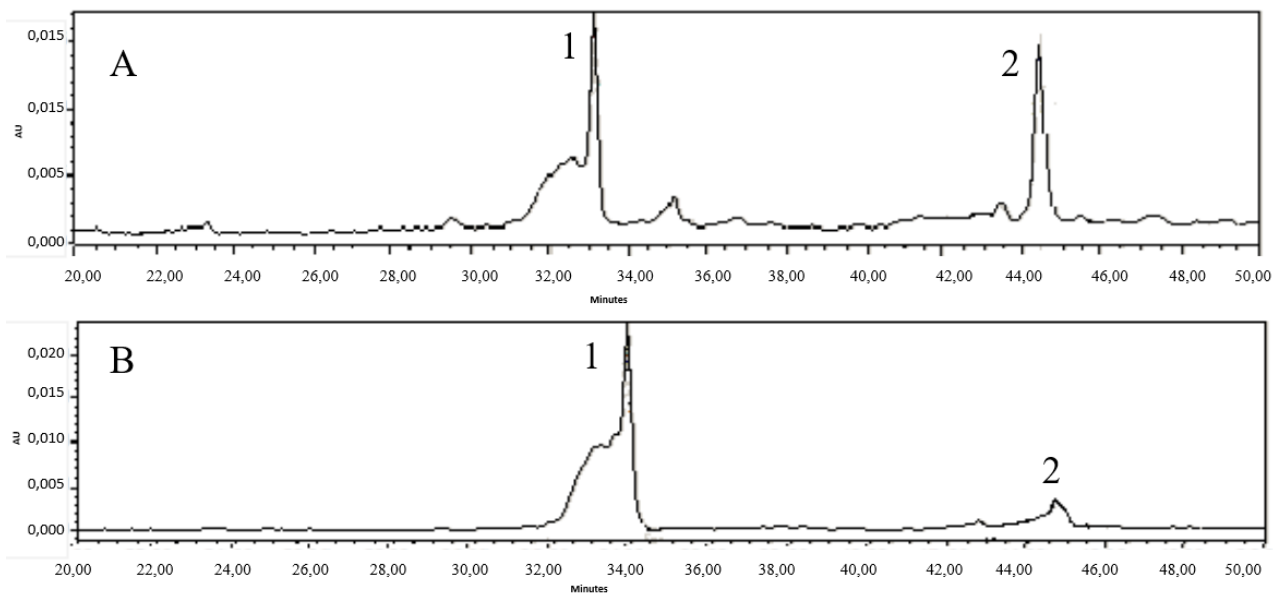


Figura II.4.14. Cromatogramas HPLC-DAD obtenidos a 320nm para compuestos ferúlicos esterificados determinados en la pectina de berenjena: **(A)** PC, pico: 1, monómero; 2, dímero. **(B)** PCUS, pico: 1, monómero; 2, dímero.

La naturaleza del solvente y la temperatura demostraron ser factores importantes para determinar la reacción de degradación de los ácidos hidroxicinámicos. La intensidad ultrasónica y el ciclo de trabajo de la exposición al US afectaron solamente la velocidad de degradación. Las reacciones de descomposición ocurrieron principalmente en ácidos cafeico y sinápico bajo US (Qiao et al., 2013).

Sun et al. (2004) realizaron un estudio sobre la degradación de la lignina. El cambio en la frecuencia ultrasónica de 58kHz a 190kHz generó un aumento en la degradación. Esto se debe a que las bajas frecuencias de US (20-80kHz) sólo conducen a efectos físicos como la microconvección, mientras que las frecuencias más altas (>100kHz) conducen a un aumento en la producción de especies radicalarias HO• que son responsables de la degradación química de la lignina. Es bien sabido que la lignina está estrechamente ligada a los polisacáridos en las paredes celulares secundarias de las plantas por varios tipos de enlace y, más comúnmente el enlace covalente es el éter del grupo hidroxilo en la posición α de la cadena lateral de lignina con el grupo hidroxilo de los polisacáridos (Giummarella et al., 2019).

II.4.12.3. Capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante de las pectinas extraídas de los polvos P-CC y P-P y los resultados son los resumidos en la **Tabla II.4.10**. La actividad de eliminación de radicales DPPH fue en general algo mayor para las pectinas PC y PCUS, siendo equivalentes a la de 38 y 33,9mg de ácido L-(+)-ascórbico (AA) por 100g de pectina, mientras que para Mes y MesUS, la actividad fue equivalente a la de 26 y 31mg de AA por 100g de pectina obtenida sin y con pretratamiento de US, respectivamente. La capacidad de reducción del Fe(III), ensayo de FRAP, fue mayor para las pectinas extraídas de P-CC, siendo equivalente a la capacidad reductora de 55 y 36mg de AA por 100g de pectina obtenida, respectivamente, sin y con pretratamiento de US, mientras que para Mes y MesUS fue de 20,9 y 26mg AA/100g de pectina, respectivamente (**Tabla II.4.10**).

Estos resultados obtenidos (**Tabla II.4.8**) concuerdan con las concentraciones de compuestos fenólicos totales coextraídos con las pectinas, donde aquellas actividades antioxidantes

determinadas en las pectinas provenientes del polvo P-CC presentan la mayor cantidad de compuestos fenólicos co-extraídos. (Tabla II.4.9).

Karimi et al. (2021) reportaron que el fruto de la berenjena es uno de los vegetales comestibles con mayor capacidad antioxidante, mostrando efectos antidiabéticos e hipotensivos así como efectos saludables, cardio y hepato-protectores.

Tabla II.4.10. Actividad antioxidante^a, determinada como la capacidad de captación de radicales DPPH y el poder reductor férrico (FRAP), de las pectinas (PC, PCUS, Mes y MesUS) extraídas de los polvos de berenjena (P-CC y P-P).

mg AA/100g de pectina	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
DPPH^a	38 ± 2 ^A	33,9 ± 0,6 ^B	26 ± 2 ^C	31 ± 1 ^D
FRAP^a	55 ± 2 ^A	36 ± 2 ^B	20,9 ± 0,5 ^C	22 ± 3 ^C

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 3$. Mismas letras mayúsculas de superíndice en una fila dada significan diferencias no significativas ($p < 0,05$).

AA: ácido L-(+)-ascórbico.

II.4.13. Funcionalidad reológica

II.4.13.1. Contenido de calcio

El contenido de calcio total encontrado en las fracciones de pectina PC, PCUS, Mes y MesUS varió entre 1726 (± 177) y 2878 (± 268) mg/kg pectina, valores que correspondieron respectivamente a 2,62 y 4,12mg de calcio/g AU.

En un estudio realizado por Combo et al. (2020) determinaron contenidos de calcio entre 13,70 y 32,26mg/100g en base al material seco en frutos de berenjena de diferentes variedades vegetales, mientras que Al Nachar et al. (2019) encontraron cantidades de 505,6mg de calcio/100g

de cáliz seco de berenjena. Además, Combo et al. (2020) determinaron que parte del calcio de la berenjena se encontraba unido principalmente al oxalato (129,53 - 311,32mg/100g de base seca), y en un rango de relación molar oxalato/Ca de 2,03-7,19, por encima del nivel crítico de 1,0, lo que indicaba calcio no biodisponible. En menor proporción, el calcio también se unió mediante enlaces fitato (41,78-143,30mg/100g de base seca), y con relaciones molares fitato/Ca en general entre 0,11 y 0,56 en los frutos de berenjena estudiados, que estuvieron por debajo del valor crítico de 0,5 que se sabe que afecta la biodisponibilidad del calcio.

Los iones calcio libres pueden reaccionar con los aniones carbonato de la solución de carbonato de sodio 0,1M para formar carbonato de calcio, poco soluble en agua ($K_{ps} = 2,8 \times 10^{-9}$; 25°C), durante 1h agitación para la extracción de pectina, el cual es posteriormente separado con el residuo remanente, insoluble (García et al., 2020) (**sección II.3.4**)

Considerando un contenido de calcio de 32,26mg/100g de berenjena en polvo (Combo et al., 2020), y suponiendo que todo este calcio fue arrastrado en la fracción de pectina durante su precipitación con etanol, se debería alcanzar un contenido final de calcio de 9,24-9,80mg de calcio/g de AU en las fracciones de pectina PC, PCUS, Mes y MesUS, valores superiores a los realmente determinados (2,62 y 4,12mg de calcio/g UA). Estos niveles de calcio encontrados podrían corresponder a Ca^{2+} probablemente reticulado en las fracciones de pectina PC, PCUS, Mes y MesUS extraídas.

Tabla II.4.11. Contenido^a de Calcio, Hierro y Cobre determinado en las pectinas PC, PCUS, Mes, MesUS.

	PC (mg/kg)	PCUS (mg/kg)	Mes(mg/kg)	MesUS (mg/kg)
<i>Ca</i>	1726 ± 173 ^A	2878 ± 288 ^B	2006 ± 201 ^C	1731 ± 173 ^A
<i>Fe</i>	52 ± 5 ^A	65 ± 6 ^B	110 ± 11 ^C	83 ± 8 ^D
<i>Cu</i>	1,8 ± 0,2 ^A	4,2 ± 0,4 ^B	3,7 ± 0,4 ^B	1,8 ± 0,2 ^A

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 3$. Mismas letras mayúsculas de superíndice en una fila dada significan diferencias no significativas ($p < 0,05$).

II.4.13.2. pH y color de las soluciones acuosas de los sistemas preparados para estudios reológicos

Stoddart et al. (1969) estudiaron las propiedades de la solución de un ácido poligalacturónico con cantidades no detectables de NS, trazas de Rha y sin grupos metiléster, estando únicamente constituido por monómeros de ácido D-galacturónico. A través de la curva de titulación ácido-base de una solución al 0,5% p/v a 18°C, se determinó un valor de pK_a de 3,7. Por otro lado, Zhang et al. (2015) reportaron valores de pK_a entre 3,5 y 4,5 para las pectinas.

El pH de los sistemas acuosos de PC, PCUS, Mes y MesUS al 1,50% y 2,0% p/v estuvo entre 6,42 y 6,85. En esta condición, en comparación con los valores de pK_a recién mencionados, las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS presentaron sus grupos carboxílicos principalmente como aniones carboxilatos, provocando la repulsión de cargas negativas en el agua, con la consecuente expansión de la red macromolecular hidratada en el sistema, lo cual resulta en mayor viscosidad o esfuerzo tangencial o módulo elástico, influyendo así en la reología (Knott et al., 2022).

Las coordenadas CIELab de las pectinas en agua al 2,0% p/v se informan en la **Tabla II.4.12**. La luminosidad L^* estuvo entre 27,5 y 40,6%, siendo mayor para PC y Mes, las cuales presentan mayor cantidad de compuestos fenólicos, a parte de los cuales se les atribuye la coloración de las pectinas. Por otro lado, los valores de los parámetros de color a^* estuvieron entre +6,7 y +9,6, mientras que los de b^* estuvieron entre +19,8 y +31,1. De acuerdo con estos parámetros mencionados, las soluciones acuosas presentaron diferentes tonalidades de marrón (**Figura II.4.15**).

Tabla II.4.12. Coordenadas de color en el espacio CIELab de las pectinas (PC, PCUS, Mes, MesUS) en agua al 2,00% p/v, que fueron extraídas de los tejidos deshidratados de berenjena P-CC y P-P.

	P-CC		P-P	
	PC	PCUS	Mes	MesUS
L^{*a}	27,5 ± 0,4 ^A	36,1 ± 0,4 ^B	31,7 ± 0,5 ^C	40,6 ± 0,3 ^D
a^{*a}	8,3 ± 0,2 ^A	7,75 ± 0,1 ^B	9,6 ± 1 ^A	6,7 ± 0,2 ^D
b^{*a}	21,9 ± 0,4 ^A	31,1 ± 0,8 ^B	19,8 ± 0,1 ^C	24,7 ± 0,6 ^D

^a Se notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 10$. Diferentes letras mayúsculas como superíndices en una fila dada indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados.

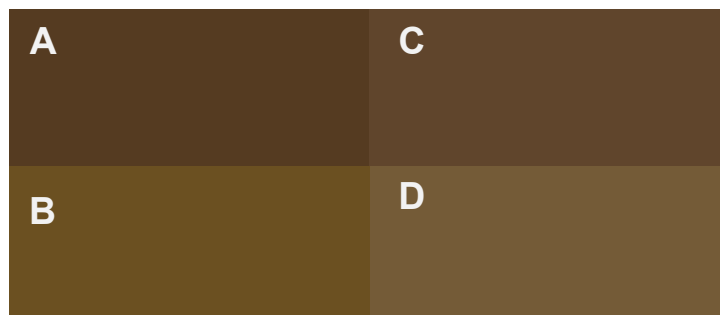


Figura II.4.15. Colores de las pectinas extraídas de los polvos de berenjena en agua al 2,00% p/v: (A) PC (B) PCUS, (C) Mes, (D) MesUS.

II.4.13.3. Ensayo de flujo en agua

Se registraron las curvas de esfuerzo de corte (τ) frente a la velocidad de cizallamiento creciente ($0,01-300s^{-1}$) para los sistemas acuosos preparados con PC, PCUS, Mes y MesUS a concentraciones de 1,50% y 2,0% p/v y a temperaturas de 8°C (refrigeración) y 20°C. El esfuerzo de corte (Pa) mostró en general una dependencia no lineal con la velocidad de cizallamiento. Los puntos experimentales ajustaron al modelo de Herschel-Bulkley (**ecuación II.3.5**), el cual incluye la existencia de un umbral de fluencia (τ_0) o esfuerzo de cizallamiento mínimo requerido para iniciar el flujo del sistema acuoso. Los parámetros obtenidos del ajuste se resumen en la **Tabla II.4.13**, remarcando que los valores de la consistencia (K) y del umbral de fluencia (τ_0) están expresados, respectivamente, en $mPa s^N$ y mPa. Este comportamiento con umbral de fluencia indica que, a las concentraciones evaluadas, las macromoléculas de pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS, de bajo DM, esencialmente HGs, en agua y sin agregado de ión calcio, interaccionaron físicamente formando una red transiente hidratada cuando el sistema acuoso estaba en reposo ($\tau_0 < 0$), modificando el comportamiento de flujo propio del agua. La repulsión entre los grupos aniónicos carboxilato, existentes debido a que el pH fue superior al pK_a de los ácidos poligalacturónicos, pudo haber contribuido a la existencia del τ_0 en agua, sin iones calcio. Parte de estos grupos carboxilato de cadenas vecinas o contiguas de HG (PC, PCUS, Mes y MesUS) pudieron estar iónicamente entrecruzados por calcio que naturalmente contenían estas fracciones aisladas de los tejidos deshidratados de la berenjena, tal como previamente se describió (2,62 y 4,12mg calcio/g AU) y, por ello, algunas estructuras de gelificación similar “caja de huevo” podrían haberse llegado a formar.

Tabla II.4.13. Parámetros^a del modelo de Herschel-Bulkley determinados a partir de los ensayos de flujo de sistemas acuosos de pectina de berenjena (PC, PCUS, Mes, MesUS)^b al 1,50 y 2,0% p/v a 8,0°C y 20,0°C.

Sistema		K (mPa s ^N)	N	τ_0 (mPa)	R²
1,50% p/v					
Mes		132 ± 3 ^A	0,414 ± 0,043 ^A	107 ± 42 ^A	0,895
MesUS		45 ± 6 ^B	0,649 ± 0,102 ^B	50 ± 8 ^B	0,837
PC	8°C	5,6 ± 0,5 ^C	0,961 ± 0,058 ^{CFH}	77 ± 4 ^C	0,798
PCUS		8 ± 1 ^D	0,997 ± 0,019 ^{CE}	96 ± 8 ^D	0,837
Mes		11 ± 5 ^{EG}	0,965 ± 0,079 ^{CFH}	119,31 ± 0,04 ^A	0,886
MesUS		19 ± 9 ^{EF}	0,821 ± 0,092 ^G	106,23 ± 0,04 ^A	0,833
PC ^c	20°C	8,4 ± 0,9 ^D	0,999 ± 0,051 ^C	-----	0,860
PCUS		8 ± 5 ^D	0,821 ± 0,092 ^G	64 ± 6 ^E	0,852
2,00% p/v					
Mes		24 ± 9 ^F	0,965 ± 0,113 ^{CH}	1080 ± 120 ^{FJ}	0,814
MesUS		41 ± 8 ^B	0,753 ± 0,061 ^D	1250 ± 281 ^{FI}	0,716
PC	8°C	10,5 ± 0,9 ^G	0,998 ± 0,007 ^E	1560 ± 110 ^G	0,890
PCUS		23 ± 6 ^F	0,998 ± 0,016 ^E	3610 ± 200 ^H	0,829
Mes		25 ± 9 ^F	0,938 ± 0,052 ^H	1330 ± 140 ^I	0,877
MesUS		14 ± 6 ^G	0,992 ± 0,073 ^E	1550 ± 80 ^G	0,904
PC	20°C	39 ± 7 ^B	0,832 ± 0,061 ^G	1178 ± 95 ^J	0,839
PCUS		24 ± 5 ^F	0,994 ± 0,040 ^{CEF}	2945 ± 145 ^K	0,825

^a Se muestran la media y la desviación estándar (n = 3). La misma letra mayúscula como superíndice de los resultados reportados en la misma columna implica diferencia no significativa ($p < 0,05$).

^b Pectinas (PC, PCUS, Mes, MesUS) obtenidas del mesocarpio (P-P) y cáscara o exocarpio + cálices (P-CC).

^c Fluido Newtoniano. Por lo tanto, K es, en este caso, la viscosidad del fluido.

El valor de τ_0 aumentó con la concentración y con la disminución de la temperatura (20°C a 8°C) (**Tabla II.4.13**), lo que concuerda con lo reportado en otras investigaciones (Yüceer et al., 2016; Razavi e Irani, 2019). El umbral de fluencia (τ_0) es la manifestación macroscópica de los componentes microestructurales de los sistemas alimenticios (Katsaros et al., 2020; Serial et al., 2022) y es una propiedad útil de algunas gomas o hidrocoloideos de uso en alimentos para mantener los ingredientes de las formulaciones alimenticias en su espacio o lugar, siendo un parámetro reológico de importancia como estabilizador en productos como mayonesa y aderezos para ensaladas (Razavi e Irani, 2019). A valores de τ superiores a τ_0 , al aumentar el cizallamiento, las fuerzas hidrodinámicas inician la ruptura de la red macromolecular en reposo, mostrando en general un índice de flujo $N < 1$ (**Tabla II.4.13**) y, en consecuencia, un comportamiento de flujo pseudoplástico para polisacáridos hidratados en alimentos (Yüceer et al., 2016). En ausencia de iones calcio, sólo las soluciones 1,5% p/v de Mes ($N=0,414$) y 1,50% y 2,0% p/v de MesUS ($N=0,649-0,753$) a 8°C mostraron comportamiento pseudoplástico después de superar el umbral de fluencia τ_0 o límite elástico, y también mostraron los valores más altos del coeficiente de consistencia (K), 132-45,1 y 41mPas^N (**Tabla II.4.13**). En cambio, los valores de índice de flujo N obtenidos fueron en general próximos a 1, lo que significa que los sistemas acuosos de pectinas sin calcio agregado fueron Newtonianos después de superar el valor respectivo de τ_0 (**Tabla II.4.13**). Esto significa que la red macromolecular formada en reposo, que interactuaba físicamente a $\tau < \tau_0$, fue desenredada por las crecientes fuerzas de cizallamiento a valores de $\tau > \tau_0$, y las macromoléculas de pectina finalmente se alinearon en la dirección del flujo. Además, conforme la solución de 1,50% p/v de PC en agua a 20°C no mostró umbral de fluencia, el sistema fue un fluido Newtoniano y, por lo tanto, el coeficiente de consistencia (K) fue la viscosidad del fluido (8,4mPa.s) (**Tabla II.4.13**). Para el resto de los sistemas con comportamiento Newtoniano después de τ_0 (1,50 y 2,0% p/v; 8° y 20°C), la K o viscosidad aparente varió entre 5,55 y 25mPa.s^N. Para la comparación del orden de magnitud de los resultados resumidos en la **Tabla II.4.13**, un jugo de tomate (5,4°Brix; 5,96% p/p de sólidos totales) presentó un esfuerzo de fluencia pequeño pero significativo de 940mPa, sobre el cual el producto fluía como un material pseudoplástico ($N = 0,56$) en este caso, y con un K de 190mPa.s^N a 20°C, después de la eliminación de la tixotropía del producto por cizallamiento a 250s⁻¹ durante 250s (Augusto et al., 2012).

Como una conclusión, la contribución del Ca^{2+} naturalmente presente en las pectinas extraídas (PC, PCUS, Mes, MesUS) a la formación en agua de estructuras pécticas de HG entrecruzadas por iones calcio parece no ser relevante, excepto para algunos sistemas en la condición de reposo ($\tau < \tau_0$), aunque también puede contribuir principalmente a esto el efecto repulsivo electrostático entre los grupos carboxilato.

II.4.13.4. Ensayos dinámicos

II.4.13.4.1. En agua

Sin agregado de iones calcio, los espectros mecánicos revelaron que los sistemas acuosos de PC, PCUS, Mes y MesUS al 1,50% p/v, a 8°C y 20°C, fueron "soluciones diluidas", conforme el módulo de pérdida o módulo viscoso (G'') estuvo por encima del módulo de almacenamiento o elástico (G') y con ambos módulos bien dependientes de la frecuencia ($\tan \delta = G''/G'$ variando de 1,7 a 12-25) en el barrido completo de frecuencia angular (tres ciclos logarítmicos) (**Figura II.4.16**).

Por otro lado, los espectros mecánicos de los sistemas acuosos de PC, PCUS, Mes y MesUS al 2,0% p/v, a 8°C y 20°C, mostraron la formación de redes macromoleculares hidratadas tipo "gel débil" ya que G' estuvo por encima de G'' , ambos módulos dependientes de la frecuencia (especialmente G'') (**Figura II.4.17 A, C**), y separados en menos de un ciclo logarítmico ($\tan \delta > 0,1$) (Ikeda y Nishinari, 2001) en el barrido completo de frecuencia angular (**Figura II.4.17 B, D**).

Tal como se observa para los sistemas Mes (**Figura II.4.17 A**) y PCUS (**Figura II.4.17 C**), los valores de G' en general aumentaron con la disminución de la temperatura, mientras que los valores correspondientes de $\tan \delta$ fueron respectivamente más bajos a la temperatura más baja (**Figura II.4.17 B, D**), lo cual indica un sistema más estructurado conforme existía una mayor separación entre los valores de G' y G'' registrados en el espectro mecánico correspondiente (**Figura II.4.17 A, C**).

Los valores de G' y G'' registrados del sistema acuoso de MesUS a 8°C y 20°C fueron cercanos entre sí (**Figura II.4.17 A**) con valores de $\tan \delta$ similares y, al mismo tiempo, los más

altos (**Figura II.4.17 B**). Esto indicó que MesUS formó en agua las redes macromoleculares menos estructuradas. Por lo contrario, PCUS formó en agua las redes de "gel débil" más estructuradas, tanto a 8°C como a 20°C, ya que los valores de tan delta fueron los más bajos (**Figura II.4.17 D**) y los valores de G' fueron los más altos (28Pa; 15Pa) de todos los registrados (**Figura II.4.17 C**), conforme la temperatura era menor. En cambio, los valores de G' registrados de PC a 8° y 20°C fueron cercanos entre sí (**Figura II.4.17 C**) y estuvieron menos separados con respecto al valor respectivo de G'' registrado, tal como se observa de los valores más altos de tan delta determinados ($\approx 0,402$ para 8°C y $\approx 0,628$ para 20°C) (**Figura II.4.17 D**).

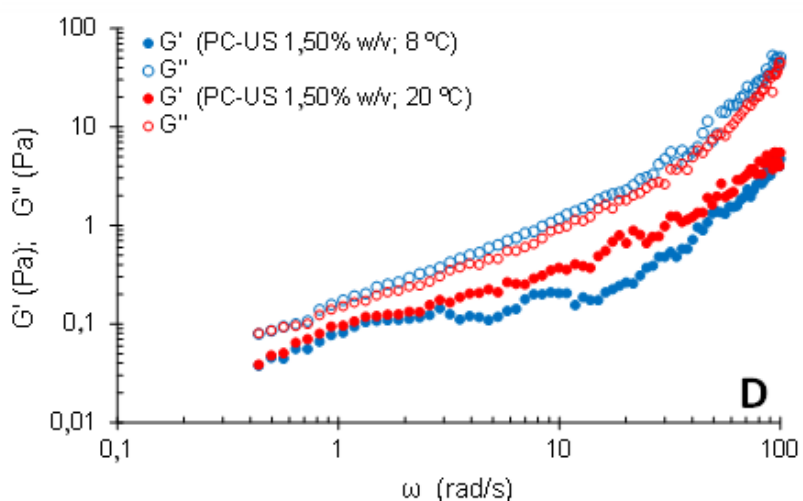
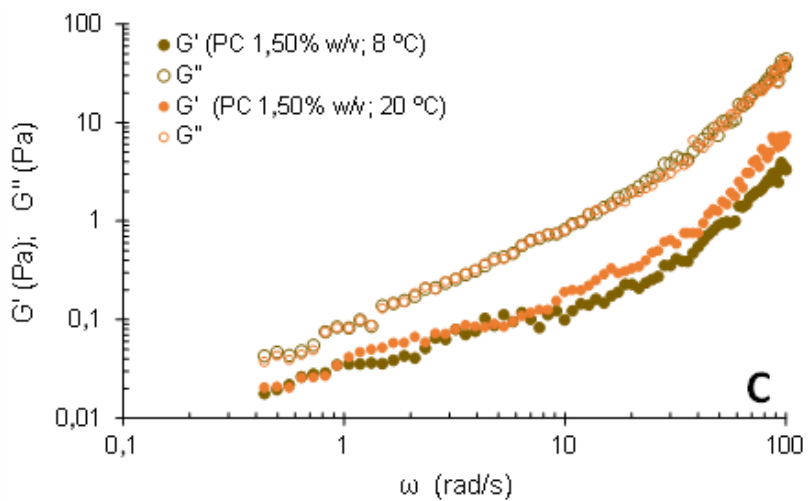
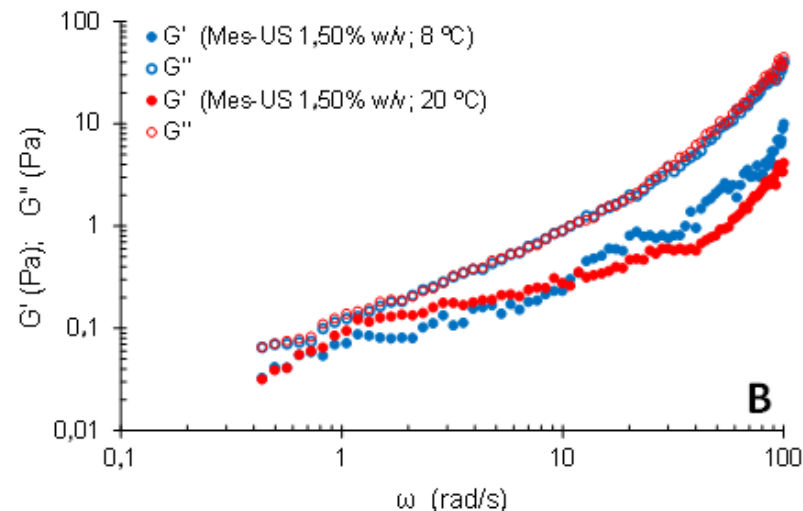
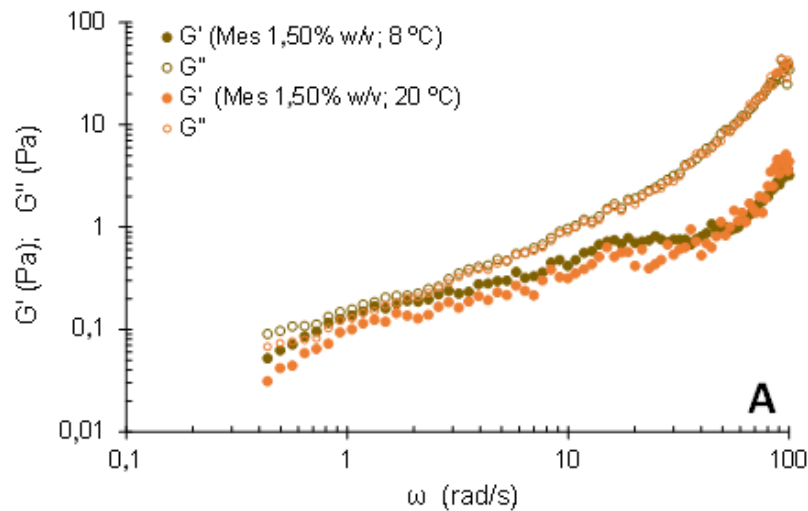


Figura II.4.16. Espectros mecánicos de las pectinas de berenjena al 1,50% p/v en agua (0mg calcio/g ácidos urónicos), denominadas Mes (A), MesUS (B), PC (C) y PCUS (D), 8°C y 20°C. Símbolos rellenos: G' ; símbolos vacíos: G'' . La barra del desvío estándar ($n = 3$) cae dentro de cada símbolo.

A 0,03rad/s, los valores de G' estuvieron entre 2,6 y 12Pa para sistemas acuosos de Mes y MesUS al 2,0% p/v (**Figura II.4.17 A**), y entre 11 y 30Pa para sistemas acuosos de PC y PCUS al 2,0% p/v (**Figura II.4.17 C**), siendo estas últimas las redes de tipo "gel débil" más estructuradas. Previamente, se encontró un peso molecular (M_w) ligeramente mayor para los HGs PC (138184Da) y PCUS (108805Da) que para Mes (119753Da) y MesUS (90214Da), todos ellos con muy baja polidispersidad ($M_w/M_n = 1,32-1,42 \approx 1$) (**Tabla II.4.5**), inusual en pectinas extraídas de fuentes no convencionales tales como los residuos agroindustriales (Zhang et al., 2019). Pesos moleculares mayores para PC y PCUS, con baja polidispersidad, podrían conducir a redes macromoleculares más estructuradas (**Figura II.4.17 C**). Además, las relaciones molares NS/AU de PC (0,05) y PCUS (0,07) fueron menores que aquellas de Mes (0,15) y MesUS (0,22) debido a un menor contenido de AU de Mes (65,8%) y MesUS (69,8%) para el mismo contenido total de carbohidratos (76% para Mes y PC; 82,2-84,2% para MesUS y PCUS) (**Tabla II.4.4**). Relaciones molares NS/AU menores implica un menor número de ramificaciones (RG-I) por cadena de HG en PC y PCUS lo cual puede favorecer las interacciones cadena-cadena a través de puentes de hidrógeno en agua y entrecruzamientos electrostáticos con iones calcio a través del calcio naturalmente contenido en las fracciones pécticas extraídas (**Tabla II.4.11**).

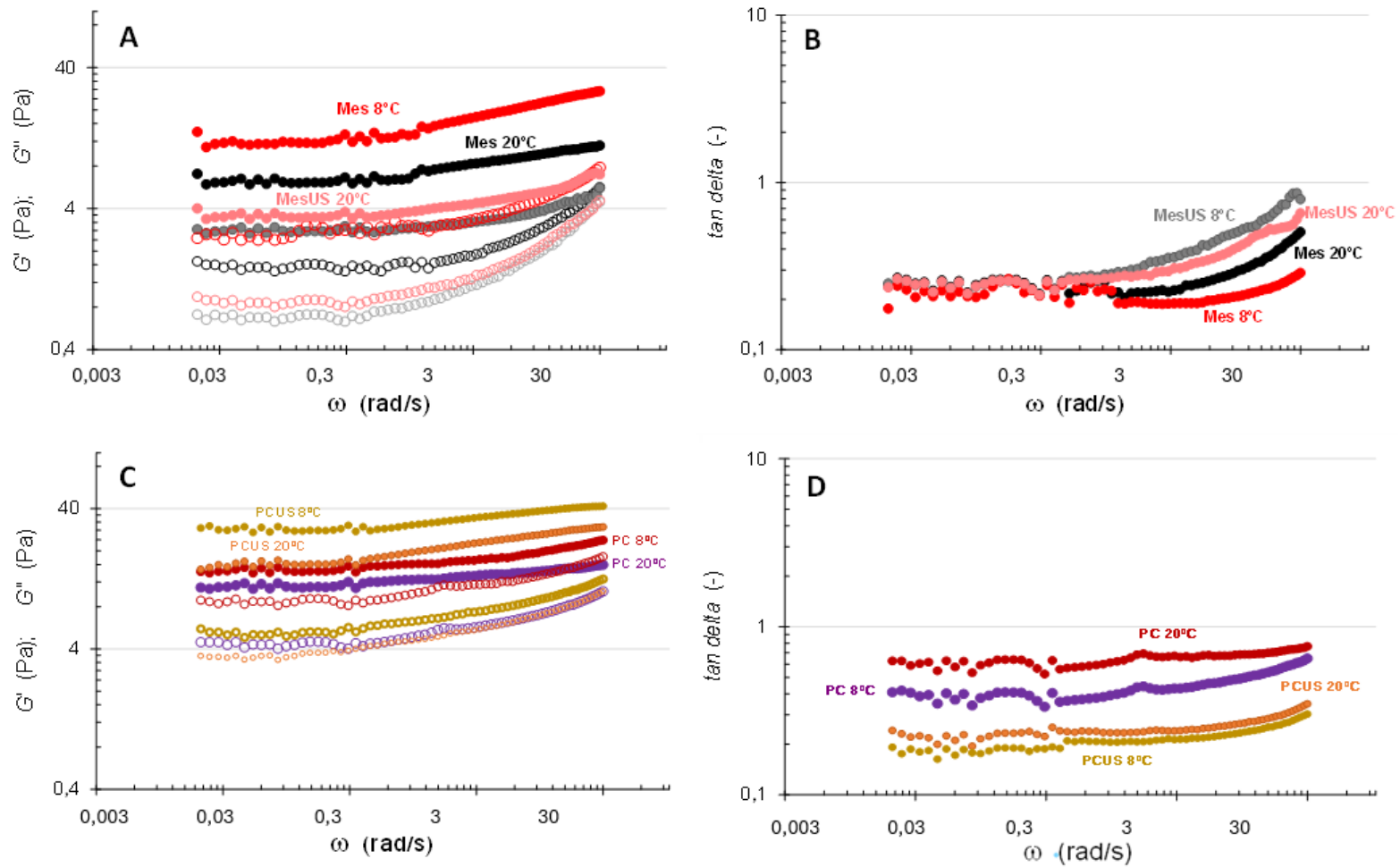


Figura II.4.17. Espectros mecánicos de las pectinas de berenjena al 2,0% p/v en agua (0mg calcio/g ácidos urónicos), denominadas Mes (A), MesUS (B), PC (C) y PCUS (D), 8°C y 20°C. Símbolos rellenos: G' ; símbolos vacíos: G'' . La barra del desvío estándar ($n = 3$) cae dentro de cada símbolo.

II.4.13.4.2. En agua con agregado de iones calcio

Como PC, PCUS, Mes y MesUS estaban constituidas esencialmente por HG con bajo DM (5,37-8,7%) (**Tabla II.4.4**) se estudió el efecto de iones divalentes agregados como el calcio a concentraciones crecientes (0-50mg de calcio/g AU) sobre sistemas acuosos de 1,50% p/v a 20°C.

Sin adición de ion calcio, esto es, a 0mg de calcio/g AU, los espectros mecánicos resultantes a 20°C se muestran en la **Figura II.4.16** y revelan una "solución diluida". Se obtuvieron espectros de "soluciones semidiluidas" para los sistemas acuosos conteniendo entre 5 y 10mg de calcio agregado/g AU, donde G'' estaba por encima de G' hasta un cruce de G' a ≈ 46 rad/s.

Para 15mg de calcio agregado/g AU, se obtuvieron espectros mecánicos que revelan una red macromolecular tipo "gel débil", especialmente para los sistemas acuosos Mes y MesUS, con una importante dependencia de G' y, especialmente, de G'' con la frecuencia angular, lo que condujo a un cruce de G'' a 27,6 rad/s para Mes (**Figura II.4.18 A**). Los módulos estuvieron cerca uno del otro en cada espectro, lo que produjo valores de tan delta por encima de 0,1, variando notablemente de $\approx 0,229$ a 2,993 para Mes, pero de $\approx 0,229$ a 0,520 para MesUS, por lo tanto, se forma una red más estructurada en MesUS que en Mes (**Figura II.4.18 A**). Para 15mg de calcio agregado/g AU, las redes tipo "gel débil" de PC y PCUS tuvieron valores de G' más altos (**Figura II.4.18 B**) que aquellos de Mes y MesUS (**Figura II.4.18 A**).

Los sistemas acuosos de PC y PCUS también formaron redes más estructuradas de tipo "gel débil" con 30mg de calcio agregado/ g de AU, ya que los valores de tan delta fueron ligeramente o muy superiores a 0,1 (Ikeda y Nishinari, 2001) para PC y PCUS, respectivamente. Los respectivos valores de G' fueron casi no dependientes de la frecuencia tanto para PC como para PCUS, mientras que G'' fue dependiente de la frecuencia y separado de G' en casi un ciclo logarítmico, lo que llevaba a valores de tan delta alrededor de 0,1 (**Figura II.4.18 D**). En cambio, MesUS y especialmente Mes fueron "geles débiles" menos estructurados, ya que mostraron un comportamiento más dependiente de la frecuencia y con una menor separación entre G' y G'' , lo que llevó a valores de tan delta por encima de 0,1 (**Figura II.4.18 C**).

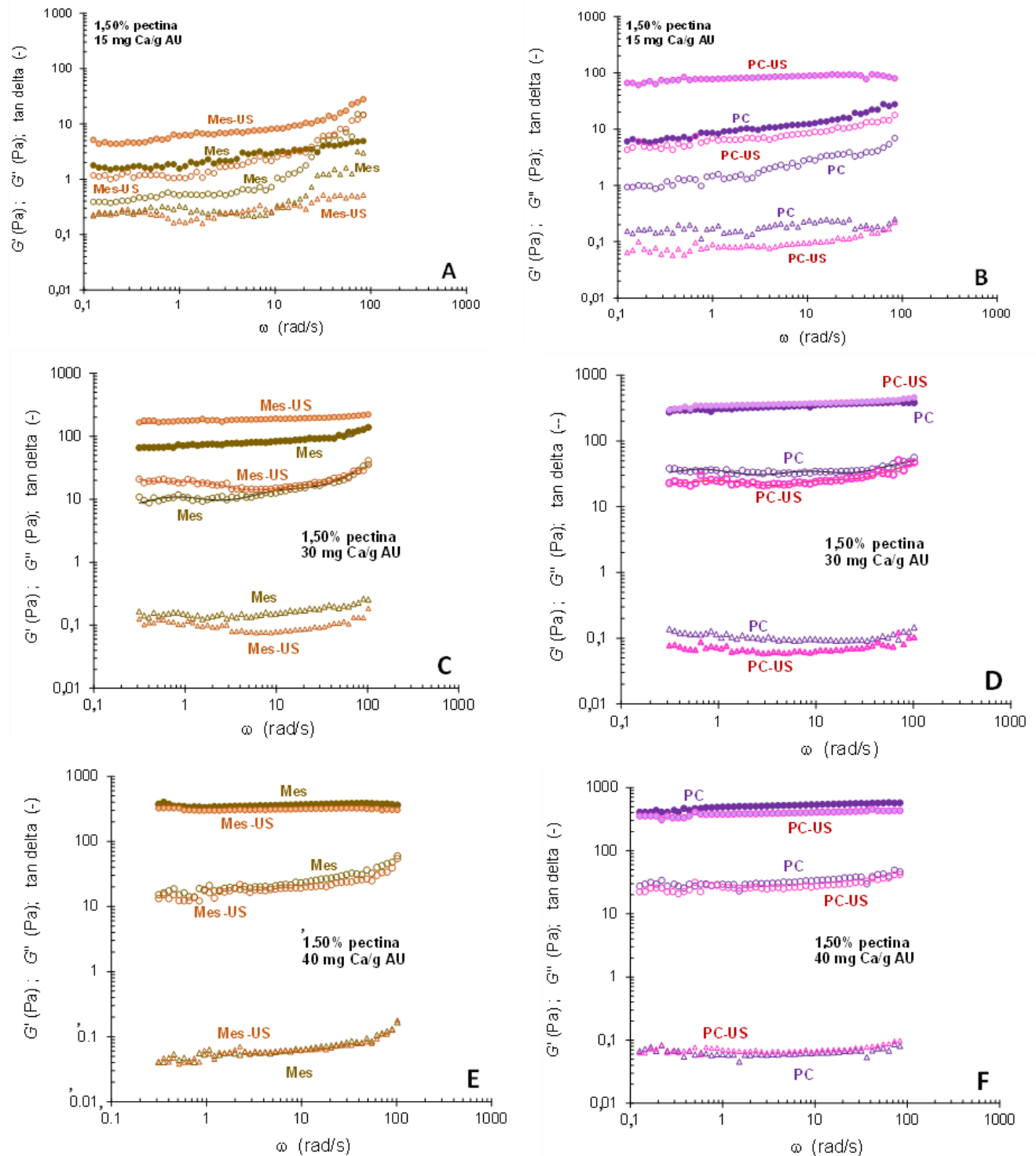


Figura II.4.18. Espectros mecánicos de las pectinas de berenjena al 1,50% p/v en agua denominadas PC, PCUS, Mes y MesUS, con 15 (A,B), 30 (C,D) y 40 (E,F) mg calcio agregado/g ácidos urónicos (AU), a 20°C. Círculos rellenos: G' ; círculos vacíos: G'' ; triángulos vacíos: $\tan \delta$ (G''/G'). La barra del desvío estándar ($n = 3$) cae dentro de cada símbolo.

Según lo revelan los respectivos espectros mecánicos, se obtuvieron microestructuras del tipo "gel verdadero" en los sistemas acuosos de PC y PCUS con 40mg de calcio agregado /g AU, ya que G' y G'' no dependían de la frecuencia y estuvieron separados en más de un ciclo logarítmico, lo que dio valores de $\tan \delta$ por debajo de 0,1 (**Figura II.4.18 F**). Los sistemas acuosos Mes y MesUS con 40mg calcio agregado / g AU también fueron redes del tipo "gel verdadero" pero con un comportamiento más dependiente de la frecuencia (**Figura II.4.18 D**).

No fue posible evaluar concentraciones de calcio más altas (45, 50, 60mg/g AU) para los sistemas acuosos de PC, PCUS, Mes y MesUS al 1,50% p/v debido a la formación de un gel local en el punto donde se añadió la solución de calcio a 85-90°C bajo agitación intensa en vórtex. Por lo tanto, no se obtuvieron geles homogéneos debido a la insolubilización localizada del pectato de calcio (homogalacturonatos de calcio).

II.4.13.5. Sensibilidad al calcio de las pectinas extraídas de los polvos de berenjena

El valor de G' determinado a 5rad/s de frecuencia angular en cada espectro mecánico registrado a partir de los sistemas acuosos al 1,50% p/v de PC, PCUS, Mes y MesUS, a 20°C (**Figura II.4.16; Figura II.4.18**), fue representado gráficamente en función de la concentración de calcio agregado, como se muestra en la **Figura II.4.19**.

Dado que las fracciones pécticas de HGs PC, PCUS, Mes y MesUS evaluadas en este trabajo se obtuvieron a través de una solución de Na_2CO_3 0,1M, el medio alcalino suave alcanzó para hidrolizar ésteres tales como los carboxilatos metilesterificados (Fry, 1986), dando lugar a pectinas con DM muy bajo (5,37-8,7% molar; **Tabla II.4.4**).

Como se puede observar, PCUS fue la pectina más sensible al Ca^{2+} , que coincidió con su más bajo DM (5,37%), seguido en disminución de sensibilidad al calcio por PC (DM 6,5%) y MesUS (DM 7,13%). Mes, cuyo DM fue 8,7% (**Tabla II.4.4**), fue la pectina con la menor sensibilidad al ion calcio (**Figura II.4.19**). Aunque la sensibilidad al calcio parece estar inversamente relacionada al DM, hay que mencionar que PC, PCUS, Mes y MesUS son todos HGs con muy bajo DM, en realidad poligalacturonatos o pectatos, de los cuales se espera una sensibilidad similar a los iones de calcio.

Según la Mortensen (2017), las llamadas “pectinas”, por tener un contenido de AU > 65%, y con un DM inferior al 10% son denominadas “ácido péctico” o “pectato”. Tempranamente, Powell et al. (1982) encontraron que la fuerza del gel de pectato de calcio se redujo drásticamente por la incorporación de segmentos de cadena de HG con interrupciones (*kinks*) de L-ramnosa cuando estos segmentos estuvieron desesterificados, pero no cuando estuvieron esterificados. En el presente caso, las relaciones molares NS/AU fueron notablemente menores en PC (0,05) y PCUS (0,07) que en Mes (0,15) y MesUS (0,22). Además, Mes y MesUS presentaron relaciones molares de AU/Rha de 143 y 62, respectivamente, y el grado de ramificación de los monómeros de Rha, expresado como la relación molar [(Ara+Gal)/Rha] fue de 19,6 y 10,8, respectivamente. Powell et al. (1982) también determinó que el umbral de DM necesario para la formación de geles a partir del pectato por entrecruzamiento con iones calcio, con un umbral de fluencia (τ_0) detectable, fue del 50% para muestras aleatoriamente desesterificadas mediante saponificación suave (Na_2CO_3 0,1M en esta tesis), y que este pectato mostró una sensibilidad mucho mayor a la disminución del DM por debajo de 50% frente el calcio.

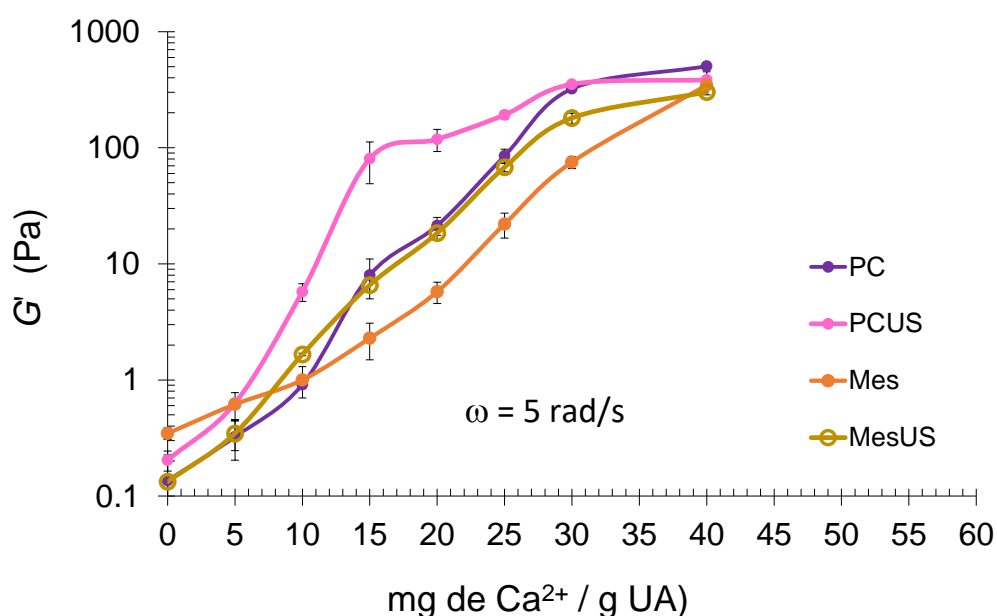


Figura II.4.19. Sensibilidad al ion calcio de sistemas acuosos de pectina de berenjena (Mes, MesUS, PC y PCUS) al 1,50% p/v: módulo dinámico de almacenamiento o elástico (G') registrado a 5rad/s en cada espectro mecánico (20°C). AU: ácidos urónicos. La barra del desvío estándar ($n = 3$) cae dentro de cada símbolo.

II.5. Conclusiones

Parte I

- A partir del polvo RIA-PB (residuo insoluble en etanol de las brácteas deshidratadas del maíz), mediante tratamiento con US antes y después del tratamiento alcalino (NaOH 0,1M; 30min) seguido de agitación en presencia de celulasa (pH 5,2; ácido cítrico), se obtuvo una novedosa pectina, específicamente un HG (MP-US; 67% AU) con bajo DM y una excepcional solubilidad en agua debido a la no agregación de las macromoléculas, tal como se observó mediante AFM.
- MP, obtenida sin tratamiento de US, y MP-US, fueron altamente sensibles al ion calcio, constituyendo redes tipo "gel débil" termo-irreversibles ya con sólo 5mg de Ca^{2+} por gramo de AU. Este comportamiento hace que las pectinas de las brácteas del maíz sean potenciales candidatos a su uso como modificadores de la textura de los alimentos y como matrices portadoras de fármacos para la liberación específica en el colon.
- Tanto MP-US como MP complejaron iones Fe(II) pero con formación de una red tipo "gel débil" termo-reversible. La complejación de Fe(II) por la pectina también puede contribuir a reducir la oxidación lipídica.
- Estos resultados permiten concluir que se pueden recuperar pectinas muy útiles durante la extracción secuencial de los principales biopolímeros de las brácteas del maíz.
- Se necesitarán más estudios sobre la bioaccesibilidad de los minerales esenciales para la salud humana transportados por los geles MP-US para determinar su efectividad biológica para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas.

Parte II

- Los polvos P-CC y P-P constituidos por los tejidos de la berenjena (fruto y cáliz) fueron utilizados para la extracción de pectinas. Se determinó que 10min de tiempo neto de pretratamiento con US de 10g P-CC o P-P:200mL agua, condujo a la mayor eficiencia debida al menor consumo de energía y al mayor rendimiento en pectina (contenido de ácidos urónicos) obtenido (80,25% y 93,8%) después de la posterior agitación con solución de Na_2CO_3 0,1M por 1h.
- Las pectinas (AU > 65% p/p) obtenidas (PC, PCUS, Mes o MesUS) fueron esencialmente HGs con bajo DM y con muy baja proporción de RG-I (NS/AU = 0,05 – 0,22). El peso molecular de las pectinas (90214 - 138184Da) fue menor para aquellas obtenidas con pretratamiento de US (108805Da y 90214Da). Además, todas ellas presentaron baja polidispersidad ($M_w / M_n \approx 1,32-1,40$), cercana a 1,0, lo cual generalmente no se observa en las pectinas extraídas de fuentes no convencionales.
- Las pectinas PC, PCUS, Mes o MesUS mostraron capacidad antioxidante (ensayos DPPH y FRAP) debido principalmente a los compuestos fenólicos coextraídos (ácido cafeoilquínico y fenolamidas de putrescina y espermidina) y bajas cantidades de β -caroteno y luteína.
- A partir de frutos de berenjena desechados, el pretratamiento con US permitió la extracción eficiente de HGs con propiedades antioxidantes que podrían ser utilizados como aditivos funcionales en alimentos.
- A niveles de 1,50 y 2,0% p/v en agua, PC, PCUS, Mes y MesUS mostraron umbral de fluencia (τ_0) seguido, en general, de comportamiento Newtoniano, mientras que los espectros mecánicos dinámicos mostraron "soluciones diluidas" al 1,50% p/v, y redes de tipo "gel débil" al 2,0% p/v, sin adición de calcio. La repulsión entre grupos carboxilato negativos podría contribuir a la existencia de una red estructurada de macromoléculas cuando los sistemas acuosos de las pectinas al 1,50% y 2,0% p/v se encuentran en reposo. Además,

pectinas de mayor peso molecular como PC y PCUS, con muy baja polidispersidad, podrían dar lugar a redes más estructuradas, en comparación con las de 1,50% y 2,0% p/v de Mes y MesUS.

- Las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS, todas con bajo DM, demostraron ser capaces de actuar como espesantes inclusive en ausencia de iones calcio, especialmente a 2,0% p/v en agua, a 8°C y 20°C, al presentar umbral de fluencia (τ_0) con el sistema en reposo.
- En presencia de calcio agregado, a 20°C, las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS al 1,50% p/v formaron redes de tipo "gel débil" para concentraciones de calcio superiores a 10mg/g AU, y redes de tipo "gel verdadero" para concentraciones de calcio superiores a 30mg/g AU. Por encima de 40mg calcio/g AU, no se obtuvieron geles homogéneos debido a la gelificación local en el punto de adición de calcio.
- La sensibilidad al calcio de los HGs PC, PCUS, Mes y MesUS extraídos de los tejidos de berenjena se relacionó inversamente con el DM y con las relaciones molares NS/UA y Rha/AU. Por lo tanto, el orden decreciente de sensibilidad al calcio fue PCUS > PC > MesUS > Mes. La incorporación de segmentos de cadena formados por monómeros alternados de L-ramnosa en la cadena de HG reduce drásticamente la fuerza del gel de pectato cuando estos segmentos de HG están desesterificados, como en los HG de berenjena aquí evaluados.
- Los tejidos desechados de la fruta de la berenjena (cáscara, cálices y pulpa) demostraron ser fuentes naturales de HGs útiles para espesar y gelificar y para actuar simultáneamente como antioxidantes en la formulación de alimentos.

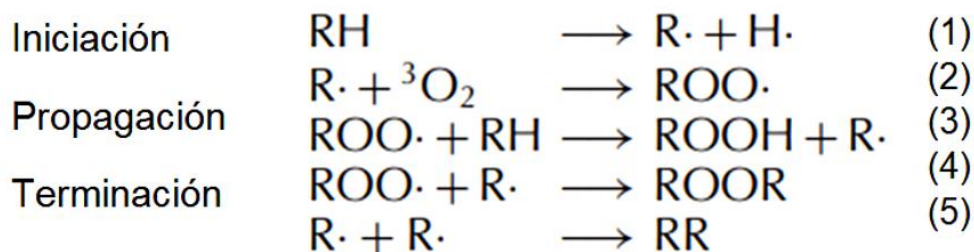
Capítulo III

Polvos y pectinas extraídas a partir de residuos de la berenjena: uso como aditivos alimentarios

III.1. Introducción

III.1.1. Oxidación de lípidos

Los ácidos grasos y los aceites se oxidan a diferentes velocidades, lo que resulta en su deterioro nutricional y sensorial. La estabilidad oxidativa es un parámetro importante para la evaluación de la calidad de grasas y aceites. Uno de los parámetros más importantes que influyen en la oxidación lipídica es el grado de insaturación de los ácidos grasos implicados. La autooxidación se ve afectada por el oxígeno atmosférico y el proceso de oxidación procede a través de reacciones de radicales libres que involucran ácidos grasos insaturados. Los productos primarios formados son hidroperóxidos, que posteriormente se descomponen, por una serie de reacciones complejas, en productos secundarios que incluyen alcoholes y compuestos carbonílicos. Estos pueden oxidarse aún más a ácidos carboxílicos (Kaseke et al., 2020). La autooxidación de ácidos grasos es una reacción en cadena de radicales libres, la cual incluye pasos de iniciación, propagación y terminación. Los mismos pueden explicarse en cinco pasos de reacción (**Figura III.1.1**).



R: Grupo alquilo del lípido

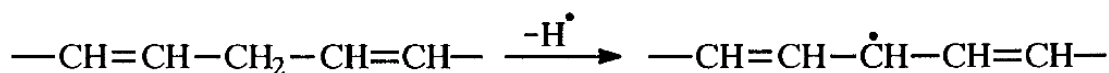


Figura III.1.1. Mecanismo de autooxidación de los ácidos grasos: iniciación, propagación y terminación. Eliminación de un átomo de hidrógeno del carbono adyacente a dobles enlaces C-C, generando un radical alquilo (Kaseke et al., 2020).

Paso número (1): La autooxidación de los aceites requiere que los ácidos grasos estén en forma de radicales libres. Un átomo de hidrógeno en los ácidos grasos se elimina y se producen radicales alquilo en el paso de iniciación. La energía requerida para eliminar ese átomo de hidrógeno depende de su posición en la molécula. Los átomos de hidrógeno adyacentes a dobles enlaces,

especialmente el hidrógeno unido al carbono α , entre los dos enlaces dobles conjugados, se elimina fácilmente. **Paso número (2):** La reacción entre el radical alquilo lipídico y el oxígeno ocurre muy rápidamente y, en consecuencia, la concentración de radical alquilo lipídico es mucho menor que la del radical peroxilipídico. **Pasos número (3) y número (4):** El radical peroxilipídico extrae hidrógeno de otras moléculas lipídicas y reacciona con el hidrógeno para formar hidroperóxido y otro radical alquilo lipídico. Estos radicales catalizan la reacción de oxidación, y la autooxidación se denomina reacción en cadena de radicales libres. Las tasas de formación de radicales peroxilipídicos e hidroperóxidos dependen únicamente de la disponibilidad de oxígeno y de la temperatura. **Paso número (5):** Cuando los radicales reaccionan entre sí, se producen especies no radicales y la reacción se detiene (Domínguez et al., 2019).

Las reacciones de oxidación se ven favorecidas por factores que aceleren la formación de radicales libres, entre los cuales se pueden mencionar la naturaleza del ácido graso, el calor, la luz ultravioleta y visible, y la cantidad de oxígeno (Amaral et al., 2018).

La autooxidación de los ácidos grasos y la descomposición de los hidroperóxidos tienden a aumentar con el incremento de la temperatura. En contraste, la formación de productos de autooxidación durante la etapa de iniciación se desarrolla lentamente a temperaturas más bajas. En presencia de luz, los ácidos grasos también pueden generar hidroperóxidos al reaccionar con oxígeno singlete, producido por otra reacción diferente llamada fotooxidación sensibilizada. La oxidación de los ácidos grasos exhibe un incremento proporcional a la cantidad de oxígeno disuelto, siendo la solubilidad del oxígeno en los aceites vegetales hasta cinco veces mayor que en el agua, a 25°C (Cuvelier et al., 2017). Además, la superficie del recipiente puede actuar como catalizador de reacción, y se ha demostrado que su efecto es directamente proporcional al área del recipiente en contacto con los aceites (Brimberg y Kamal, 2003).

Los aceites que están más insaturados se oxidan más rápidamente que los aceites menos insaturados. A medida que aumenta el grado de insaturación, aumentan tanto la tasa de formación como la cantidad de compuestos de oxidación primaria acumulados al final del período de inducción (Kaseke et al., 2020).

Los productos primarios de oxidación, los hidroperóxidos lipídicos (**Figura III.1.1**), son relativamente estables a temperatura ambiente. Sin embargo, a altas temperaturas, se descomponen fácilmente en radicales alcoxilo y luego forman aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, alcoholes e hidrocarburos de cadena corta, con aromas particulares. La peroxidación de lípidos conduce a menudo a la formación de especies tóxicas alquenas reactivas, tales como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), (2-propano-1-al) acroleína y malondialdehído (MDA) (**Figura III.1.2**) (Castillo et al., 2019).

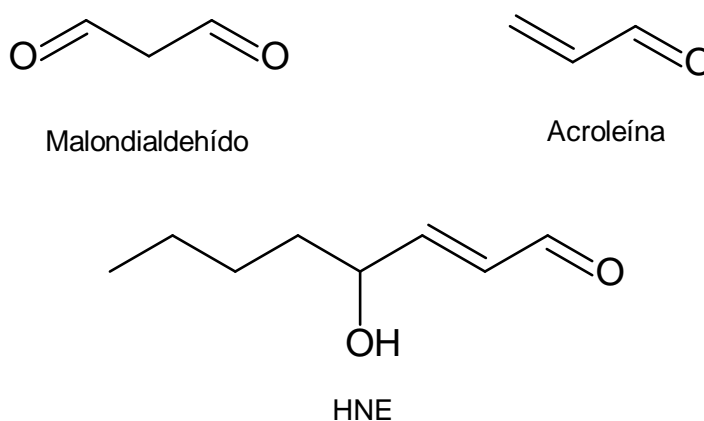


Figura III.1.2. Compuestos de oxidación de las reacciones de peroxidación (Dalle-Donne et al., 2006).

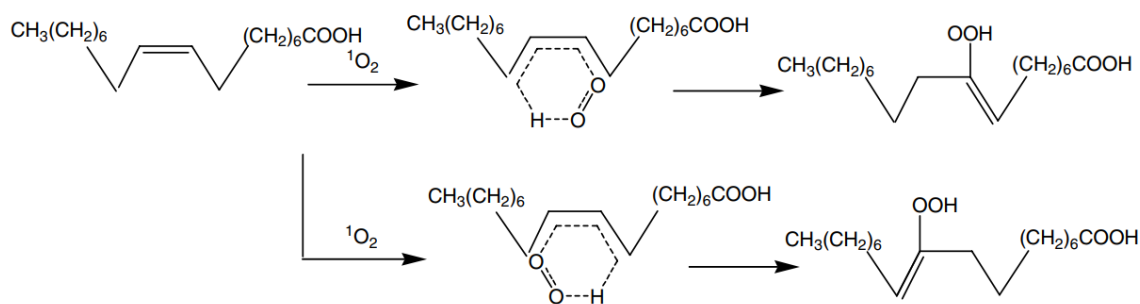


Figura III.1.3. Formación de alquil hidroperóxido en el ácido oleico (Choe y Min, 2006).

III.1.2. Oxidación de aminoácidos y proteínas

Las proteínas en alimentos son propensas a reacciones de oxidación. Se produce oxidación de los aminoácidos y de las proteínas por medio de la reacción con radicales libres generados como subproductos de los procesos normales, o por factores externos tales como reacciones fotoquímicas

o la interacción con compuestos químicos. Los radicales libres pueden reaccionar directamente con la proteína o pueden reaccionar con otras moléculas tales como lípidos y carbohidratos, formando productos que reaccionarán luego con las proteínas (Hellwig, 2019).

Las cadenas laterales de los aminoácidos son los sitios de oxidación de las proteínas, lo cual provoca la fragmentación de la cadena polipeptídica, la formación de agregados proteína-proteína y la formación de entrecruzamientos, que a menudo cambian la conformación, incluyendo la desnaturalización de la proteína (Hellwig, 2019).

La carbonilación es una modificación irreversible a través de la cual se forman y/o introducen grupos de carbonilo en las proteínas. Esta reacción tiene lugar bajo varios mecanismos de diversa naturaleza, aunque generalmente se acepta que la carbonilación tiene lugar típicamente en un ambiente prooxidativo y como resultado del estrés oxidativo. Su formación puede darse:

1) por ruptura oxidativa de la cadena de aminoácidos por el mecanismo de reacción de la α -amidación, o por la ruptura asociada con la oxidación de residuos glutámicos;

2) por reacciones secundarias de las cadenas laterales de los aminoácidos con productos de oxidación lipídica (por ejemplo: MDA y HNE; **Figura III.1.2**), por medio de reacciones de adición de Michael con aminoácidos lisina, histidina y cisteína, y por reacciones de glicación/glicosilación de los grupos amino de aminoácidos básicos (ej. lisina) con azúcares reductores, formando productos finales de glicosilación avanzada (Estévez et al., 2022).

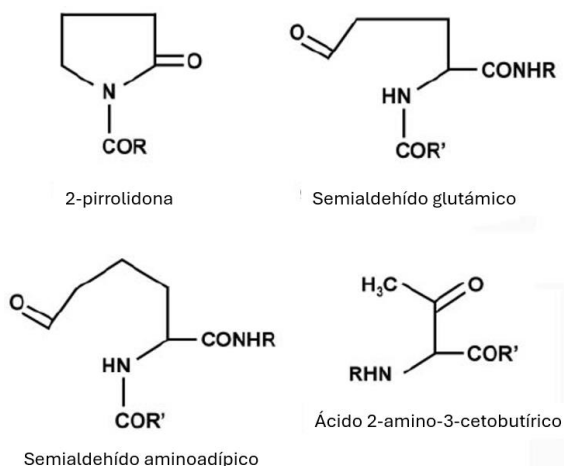


Figura III.1.4. Productos de oxidación de las proteínas (Dalle-Donne et al., 2006).

Dentro de los carbonilos principales generados por la oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos se encuentra la 2-pirrolidona, obtenida a partir de la oxidación directa de residuos prolina, semialdehído glutámico a partir de prolina y arginina, semialdehído aminoadípico a partir de lisina, el ácido 2-amino-3-cetobutírico resultante de la oxidación directa de residuos treonina, y 2-oxohistidina a partir de histidina (**Figura III.1.4**) (Dalle-Donne et al., 2006).

Por otro lado, los aminoácidos que absorben la radiación UV como la tirosina, el triptofano o la histidina son objetivos importantes de los procesos fotooxidativos de las proteínas. Las reacciones pueden ocurrir sin la participación del oxígeno por formación directa de radicales o por formación intermedia de oxígeno singlete (1O_2) que reacciona sobre la proteína. La fotooxidación se vuelve importante cuando los alimentos se exponen a la luz ultravioleta directa en recipientes inadecuados, como botellas de vidrio blanco (Pattison et al., 2012; Gayán et al., 2014).

La fotooxidación directa del triptofano (**Figura III.1.5**) ocurre con la reacción inicial del oxígeno singlete en el nitrógeno indol que conduce a la formación de un radical triptofanilo, el cual permite la formación de un intermediario dioxetano. Por ruptura del anillo de dioxetano se forma N-formilquinurenina (NFK), la cual a su vez se descompone en quinurenina (Bellmaine et al., 2020).

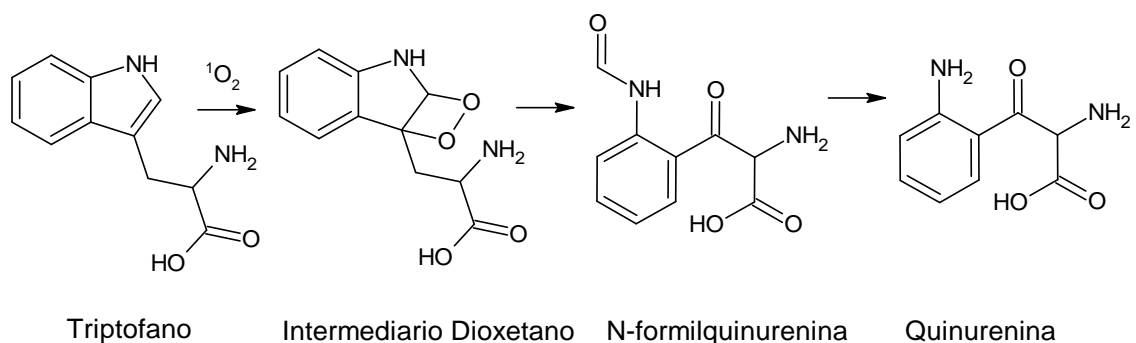


Figura III.1.5. Formación de la N-formilquinurenina a partir del triptofano (Bellmaine et al., 2020).

Otro producto de oxidación de las proteínas es la ditirosina, que se forma a partir de radicales tirosilo (**Figura III.1.6**), responsable de disminuir la digestibilidad de las proteínas y, así, el suministro nutricional. Se trata de la unión covalente orto-orto entre los carbonos de los anillos fenólicos de dos monómeros de tirosina de la proteína (estructuras **A** y **B**; **Figura III.1.6**). El grado de formación de la

ditirosina a partir de las proteínas de la leche varía en función de la estructura de dichas proteínas, siendo la caseína el principal precursor, ya que es una de las proteínas con mayor cantidad relativa de tirosina. Por lo tanto, la formación de ditirosina en las caseínas es un tema importante en el estudio de la oxidación de las proteínas lácteas. La generación de enlaces ditirosina se produce *in vitro* por distintos agentes tales como la irradiación ultravioleta y los radicales libres. La formación de ditirosina aumenta como consecuencia de los tratamientos térmicos o la fotooxidación en muestras de leche expuestas a radiación UV o la luz fluorescente (Fuentes-Lemus et al., 2018). La *o,o'*-ditirosina (**B, Figura III.1.6**) es el producto final cuando los radicales hidroxilo reaccionan entre sí formando una unión entre dos tirosinas (**Figura III.1.6**).

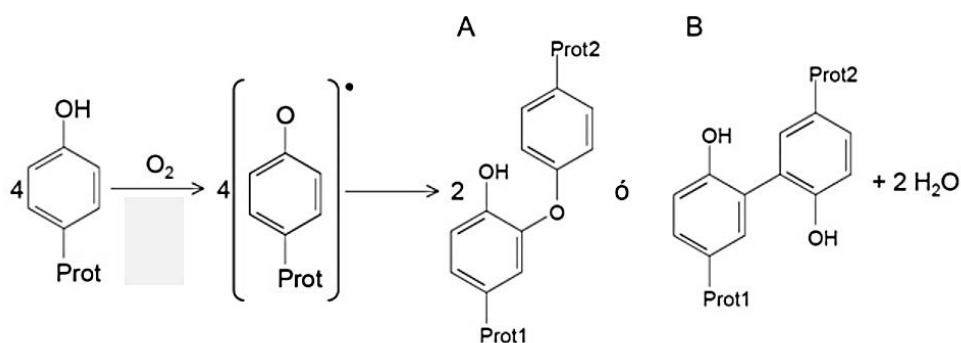


Figura III.1.6. Mecanismo de formación de la ditirosina a partir de radicales tirosilo de la proteína (Prot) (Ludviková et al., 2018).

III.1.3. Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos

El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos depende del número y disposición de los grupos hidroxilo en las moléculas. Los antioxidantes fenólicos (AH) (**Figura III.1.7 A**) pueden donar átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos y producir derivados lipídicos moleculares y radicales antioxidantes (A^\bullet) (**Figura III.1.7 A**), que son más estables (mayor vida media) y están menos disponibles para promover la autooxidación. El radical libre antioxidante puede interferir aún más con las reacciones de propagación en cadena (**Figura III.1.7 B y C**). A medida que disminuye la energía de enlace del hidrógeno en un eliminador de radicales libres (A-H), la transferencia de hidrógeno al radical libre alquilo (R^\bullet), alcoxilo (RO^\bullet) e hidroxiperoxilo (ROO^\bullet) es energéticamente más favorable y, por lo tanto, más rápida (Zeb, 2020).

Cualquier compuesto que tenga un potencial de reducción menor que el de un radical libre (o

una especie oxidada) es capaz de donar su átomo de hidrógeno al radical libre a menos que la reacción sea cinéticamente inviable. El efecto de la concentración de antioxidantes en las tasas de autooxidación depende de muchos factores, incluida la estructura del antioxidante, las condiciones de oxidación y la naturaleza de la muestra que se oxida (Shahidi y Ambigaipalan., 2015).

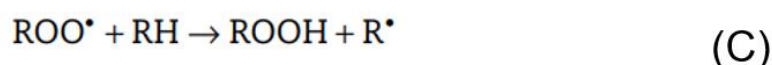
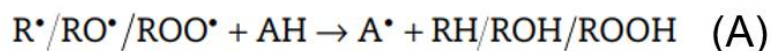


Figura III.1.7. Mecanismo de captura de radicales libres por los antioxidantes fenólicos (Zeb, 2020).

A menudo, los antioxidantes fenólicos pierden su actividad a altas concentraciones y se comportan como prooxidantes al participar en las reacciones de iniciación. Son más efectivos para extender el período de inducción cuando se agregan a cualquier aceite que no se haya deteriorado en gran medida. Sin embargo, son ineficaces para retardar la descomposición de lípidos ya deteriorados. Por lo tanto, los antioxidantes deben agregarse a los alimentos lo antes posible durante el procesamiento y el almacenamiento para lograr la máxima protección (Zeb, 2020).

III.1.4. Mecanismo de acción de los carotenoides y tocoferoles

Los carotenoides son esenciales para la protección contra el daño fotooxidativo. Los mismos funcionan como *quencher*s de oxígeno singlete y eliminadores de los radicales peroxilo. El *quenching* físico del oxígeno singlete se lleva a cabo mediante la transferencia de energía de excitación del oxígeno singlete a la molécula del carotenoide, para generar β -caroteno en estado triplete excitado y oxígeno en estado fundamental (**Figura III.1.8 A**). Posteriormente, la energía se disipa entre el β -caroteno excitado (${}^3\text{Caroteno}^*$) y el entorno para producir un estado de energía normal del carotenoide y energía térmica. El *quenching* químico del oxígeno singlete se lleva a cabo mediante oxigenación del β -caroteno con la formación de endoperóxidos de β -caroteno (**Figura III.1.8 B**) (Pérez-Gálvez et al., 2020).

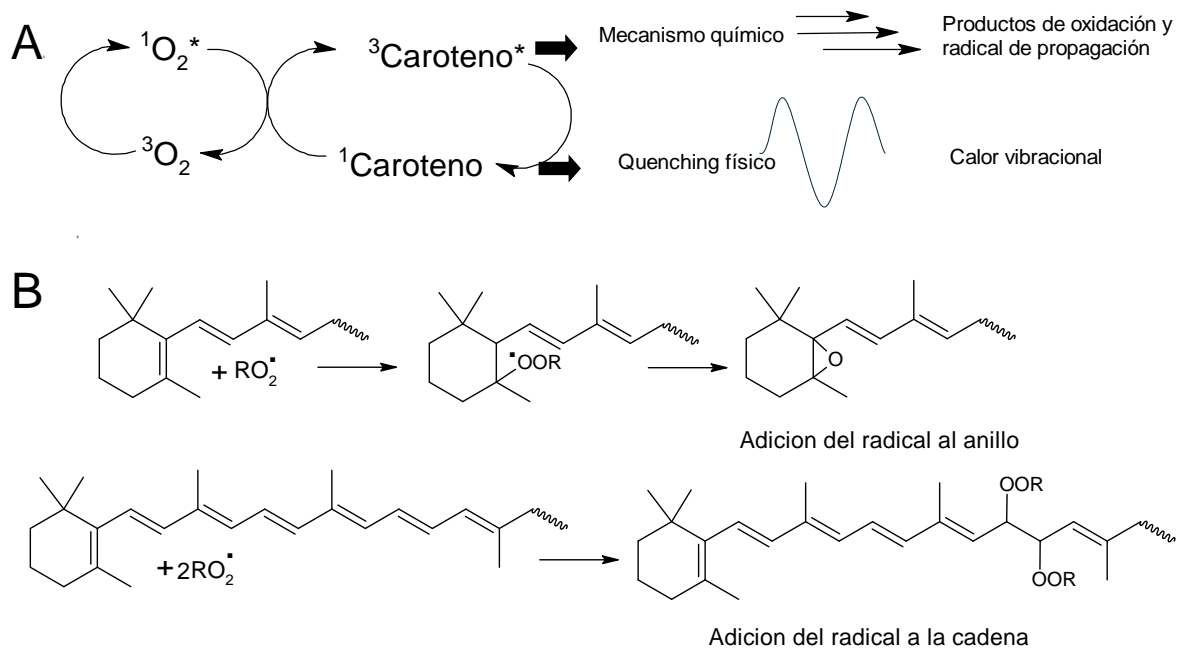


Figura III.1.8. Mecanismos de la acción antioxidante ejercida por los carotenoides en diferentes procesos. *Quenching* físico del oxígeno singlete (**A**). Transferencia de electrones, abstracción de hidrógeno y adición de radicales en la actividad antioxidante frente a los radicales peroxilo (**B**) (Pérez-Gálvez et al., 2020).

Por otro lado, los tocoferoles son antioxidantes que actúan durante la peroxidación lipídica en las membranas celulares. El α -tocoferol termina las reacciones en cadena de peroxidación lipídica donando su átomo de hidrógeno fenólico a un radical peroxilo lipídico (LOO^{\bullet}), lo que conduce a la formación del hidroperóxido lipídico ($LOOH$) y del radical α -tocoferoxilo. El radical α -tocoferoxilo formado, insuficientemente reactivo para iniciar la peroxidación lipídica, puede reaccionar con otro radical peroxilo lipídico (LOO^{\bullet}) para producir un producto no radical, la α -tocoferilquinona. El radical α -tocoferoxilo también puede regenerarse a α -tocoferol mediante la reducción por ascorbato y glutatión, como se muestra en la **Figura III.1.9** (Miazek et al., 2022).

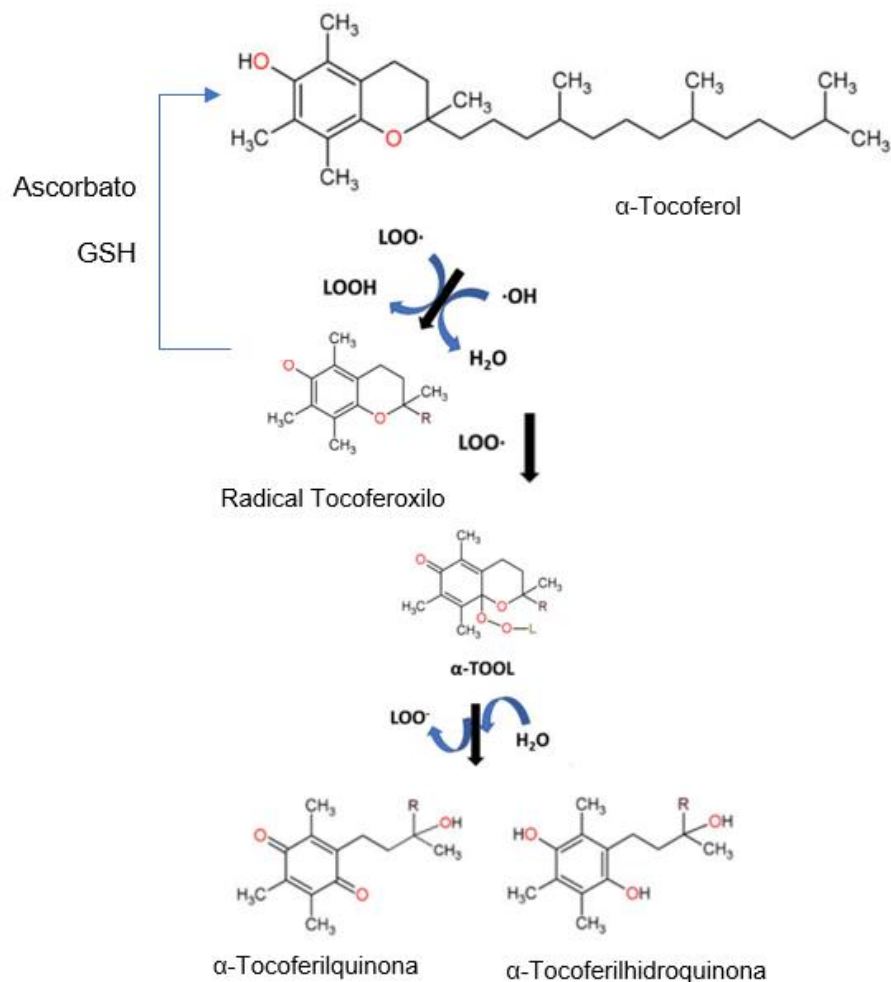


Figura III.1.9. Mecanismos de la acción antioxidante ejercida por los tocoferoles en diferentes procesos (Miazek et al., 2022).

III.1.5. Queso crema vegano a partir de frutos secos

Los frutos secos, en su mayoría, presentan un elevado contenido de ácidos grasos, variando desde el 31,6% en las castañas de cajú hasta el 62,4% en la nuez de pecan. Se caracterizan por ser bajos en ácidos grasos saturados y ricos en ácidos grasos insaturados, especialmente monoinsaturados, además de contener pequeñas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados. Esta diversidad nutricional los posiciona como una opción saludable para integrar en una dieta equilibrada (Shakerardekani et al., 2013).

Los ácidos grasos insaturados presentes en los frutos secos los hacen vulnerables a la oxidación, lo que lleva al deterioro de la calidad nutricional y sensorial si se almacenan mal o durante períodos prolongados. La rancidez oxidativa, una de las principales causas de deterioro de la calidad de los alimentos, es ocasionada por la oxidación de los lípidos debido al oxígeno atmosférico. El cambio más evidente es el desarrollo de olores rancios y sabores desagradables, aunque también pueden ocurrir cambios en el color, pérdida de volátiles de sabor deseables y alteraciones nutritivas, como la destrucción de ácidos grasos esenciales y de vitaminas liposolubles (Maestri et al., 2020).

La oxidación tiene lugar en diferentes etapas, dependiendo de las condiciones de procesamiento, envasado y almacenamiento. Los factores que afectan el desarrollo de rancidez oxidativa en los frutos secos pueden clasificarse en externos, como la concentración de oxígeno, la temperatura, la luz y la humedad relativa, entre otros, y factores intrínsecos como la composición lipídica, el grado de insaturación, los ácidos grasos libres, los metales traza y los antioxidantes. La reacción entre los lípidos de los frutos secos y el oxígeno forma peróxidos que se descomponen en aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos, generando *flavors* desagradables (Miraliakbari y Shahidi, 2008).

El queso crema vegano es un producto untable hecho de frutos secos molidos en pasta. Se puede producir a partir de almendras, castañas de cajú, entre otros. El queso crema vegano puede ser utilizado como aderezos para galletas, panificados o verduras. Es popular y ampliamente aceptado por los consumidores debido a su sabor y buenos valores nutricionales (Shakerardekani et al., 2013). El tamaño del mercado mundial de queso vegano se estimó en 9160 millones de dólares en 2022, y se proyecta que crezca un 10,22% para alcanzar los 14938 millones para 2027. Las partes secas y molidas de berenjena desechadas, como la cáscara y los cálices (P-CC) y el mesocarpio, la placenta y núcleo (P-P), pueden ser útiles como fibra natural y aditivos/ingredientes para la formulación y preservación de alimentos de origen vegetal como el queso crema vegano de castañas de cajú, satisfaciendo la creciente demanda de una alimentación saludable que desalienta el consumo de todos los alimentos refinados y procesados, especialmente con aditivos sintéticos (Tuso et al., 2013).

III.2. Objetivos

Debido a la alta actividad antioxidante observada en los polvos de berenjena obtenidos en el **Capítulo I** y de las pectinas extraídas en el **Capítulo II** se propone:

Objetivo principal

- Evaluar la funcionalidad de los polvos y de las pectinas obtenidos de la berenjena como aditivos antioxidantes y modificadores de la textura en alimentos.

Objetivos secundarios

- Desarrollar un queso vegano untable de castañas de cajú utilizando los polvos de la berenjena como aditivos, evaluando los cambios en las propiedades reológicas y la eficiencia antioxidante durante el almacenamiento (30 días).
- Evaluar las pectinas extraídas de la berenjena como aditivo antioxidante en leche fluida entera mediante su exposición a la radiación UV-C.

III.3. Materiales y Métodos

III.3.1. Reactivos

Se utilizó agua desionizada (Milli-Q, EE.UU.). Los reactivos fueron de grado analítico, provistos ya sea por Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE.UU.) como el 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y el ácido tiobarbitúrico, como por Merck Química (Argentina).

Se utilizó leche descremada fluida (La Serenísima®, Buenos Aires, Argentina) cuya composición fue 1,0% p/v de grasa total; 0,6% de grasas saturadas; 3,0% p/v de proteínas; 4,8% p/v de hidratos de carbono; 0% p/v de fibra dietaria; 105mg de calcio/100mL; 49mg de sodio/100mL; 64µg de vitamina A/100mL; 1,0µg de vitamina D/100mL.

III.3.2. Preparación de queso vegano untable de castañas de cajú con polvos de berenjena (P-CC y P-P) como aditivos antioxidantes

El queso untable de castañas de cajú se formuló de acuerdo con recetas comerciales. Las castañas fueron procesadas en una licuadora (Facilic Glass, Moulinex, Francia) junto con una solución acuosa que contenía vinagre, sacarosa y ácido cítrico, para lograr la disgregación y homogeneización (**Tabla III.3.1**). Se añadió uno u otro polvo de berenjena, P-CC o P-P (**sección I.3.3**), hasta un contenido de 5,0% p/p en la formulación total (**Tabla III.3.1**). Cada polvo fue hidratado previamente por 12h utilizando parte del agua (30-40mL) contabilizada en la formulación. También se produjo un sistema control sin polvo de berenjena agregado (**Tabla III.2.1**).

Tabla III.3.1. Composición del queso vegano untable de castañas de cajú.

Componentes	Cantidad		
	Control	P-P	P-CC
Castaña de cajú (g)	300	300	300
Vinagre (mL)	18	18	18
Sacarosa (g)	8.5	8.5	8.5
Agua (mL)	165	135	125
Ácido cítrico 5,0% p/v (mL)	36	36	36
P-P (g)	—	5 ^a	—
P-CC (g)	—	—	5 ^b

^a Luego fue hidratado en 30mL de agua.

^b Luego fue hidratado en 40mL de agua.

III.3.2.1. Determinaciones de propiedades físicas

Las muestras de los quesos veganos untables control, P-CC y P-P (1g) se vertieron en placas de vidrio de 40mm de diámetro, fueron cubiertas con una tapa y almacenadas bajo refrigeración ($8,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). A los 0, 15 y 30 días de almacenamiento se tomaron tres placas de vidrio de cada tipo de muestra para la medición de cada una de las propiedades que a continuación se detallan.

III.3.2.1.1. Medición del pH

El pH se midió con un electrodo combinado de vidrio/Ag⁰-AgCl (Mettler Inlab Viscous Pro, Alemania) conectado al pH-ímetro (Mettler S220 Kit, Alemania). Para la calibración se utilizaron soluciones tampón estándar de pH 4,00 y 7,02.

III.3.2.1.2. Actividad de Agua

La actividad de agua de cada muestra de queso untable de castañas de cajú se realizó siguiendo la metodología mencionada anteriormente en la **sección I.3.5**.

III.3.2.1.3. Color

Los parámetros de color (espacio CIELab) de cada muestra de queso vegano untable de castañas de cajú se determinaron siguiendo la metodología mencionada anteriormente en la **sección I.3.6.**

III.3.2.1.4. Caracterización reológica

Los espectros mecánicos (G' , G'' , tan delta vs frecuencia) se registraron a la deformación constante elegida del rango viscoelástico lineal previamente determinado a través de un barrido de amplitud oscilatoria (esfuerzo tangencial vs. deformación relativa) a frecuencia constante de 0,5Hz (**sección II.3.12.3**). Se utilizó un reómetro MCR300 Paar Physica (Austria) después de un período de 10 minutos de reposo de la muestra en la placa estacionaria a temperatura constante de 20,0°C (unidad Peltier Viscotherm VT2 Physica, Austria), con una geometría de platos paralelos dentados de 25mm de diámetro (PP25/S) con un gap de 1000 μ m.

III.3.2.2. Estabilidad química a la oxidación del queso vegano untable de castañas de cajú

Las muestras de los quesos untables control, P-CC y P-P (1g), se vertieron en placas de vidrio de 40mm de diámetro, fueron cubiertas con una tapa y almacenadas bajo refrigeración (8°C \pm 0,5°C). A los 0, 15 y 30 días de almacenamiento se tomaron tres placas de vidrio de cada tipo de muestra para la medición de cada una de las siguientes propiedades:

III.3.2.2.1. Índice de peróxidos (PI)

Se pesó 1g de cada muestra en tubos de centrifuga, se añadieron 10mL de cloroformo, se agitó vigorosamente en vórtex y luego se centrifugó por 10min a 8000rpm. Una alícuota de 1mL del sobrenadante fue colocada en un tubo y se añadieron 0,2mL de KI dejándose reposar durante 1min, agregando luego 2mL de agua destilada. Se agitó y se tituló con una solución de Na₂S₂O₃ 0,01N hasta la desaparición del color amarillo. Luego se agregaron 0,2mL de una solución de almidón (1g/100mL) y se continuó titulando con hasta la desaparición del color azul. Se calculó el PI,

expresados en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de la fase oleosa de la emulsión, mediante la siguiente relación:

$$PI \left(\frac{\text{meq.peróxido}}{\text{kg muestra}} \right) = \frac{(M-B).N.f.1000}{m}$$

Ecuación III.3.1

Donde:

M = mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en la titulación de la muestra.

B = mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

f = factor de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

m = masa de muestra (g)

III.3.2.2.2. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se pesó 1g de cada muestra en tubos de centrifuga, se añadieron 10mL de cloroformo, se agitó vigorosamente y luego se centrifugó por 10min a 8000rpm. Se tomaron alícuotas de 20 μ L del sobrenadante y se mezclaron con 730 μ L de etanol absoluto. Se agregaron 1500 μ L de una mezcla de ácido tiobarbitúrico 0,01M en ácido tricloroacético al 10% (p/v) y se agitó en vórtex. Las muestras se incubaron a 70°C durante 1h hasta el desarrollo de color rosa. Luego de este tiempo, se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 6000rpm durante 15min a 4°C. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 530nm. Las concentraciones de TBARS fueron calculadas a partir de una curva de calibración utilizando 1,1,3,3-tetra-etoxipropano como estándar.

III.3.3. Preparación de sistemas de leche descremada con pectina de berenjena

Las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS, extraídas anteriormente (**sección II.3.4**), fueron separadamente disueltas en leche descremada a una concentración de 0,5% p/v con el uso de una procesadora de alimentos. Posteriormente, se dispensaron 5mL de cada una de estas muestras o de leche descremada (0% p/v pectina) en placas de vidrio de 40mm de diámetro. Luego, las placas fueron colocadas en la línea central de la bandeja ubicada dentro de la cámara (25°C) y se las

expuso a radiación UV de onda corta en el rango de 200 - 280nm (UV-C) durante 0, 3 o 6h, como lo describen Scheidegger et al. (2010). Las muestras fueron luego congeladas (-20°C) hasta su posterior análisis. El experimento se realizó por triplicado para cada fracción de pectina.

III.3.3.1. Determinaciones de propiedades físicas

III.3.3.1.1. Color

Los parámetros de color (espacio CIELab) de los sistemas de leche-pectina y leche descremada se determinaron siguiendo la metodología mencionada anteriormente en la sección **sección I.3.6.**

III.3.3.1.2. Caracterización reológica

El comportamiento del flujo se determinó en las muestras a través de experimentos rotacionales mediante el registro de la viscosidad (η) en función de la velocidad de cizallamiento ($\dot{\gamma}$) (0,001–300s⁻¹) durante 50min en un reómetro tangencial MCR300 Paar Physica (Anton Paar, Austria) equipado con un cono de 25mm de diámetro y 2° de ángulo. La temperatura se mantuvo constante a 8,0°C o a 20°C a través del sistema Peltier. Cada punto se registró en estado estacionario. Los datos se ajustaron según el modelo de Carreau:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{[1 + (\tau_c \cdot \dot{\gamma})^2]^M} \quad \text{Ecuación III.3.2}$$

Donde:

η_0 (Pa·s) es la viscosidad Newtoniana o registrada en condiciones *at rest*,

η_{∞} (Pa·s) es la viscosidad límite (tiempo $t \rightarrow \infty$),

τ_c (s) es la constante de tiempo característica,

M es una constante adimensional.

III.3.3.2. Estabilidad química a la oxidación de los sistemas leche-pectina bajo luz UV-C

A cada una de las muestras de leche-pectina y leche descremada, luego de ser expuestas a radiación UV de onda corta de 200 a 280nm (UV-C) durante 0, 3 o 6h, se le realizaron las siguientes determinaciones:

III.3.3.2.1. Determinación de grupos carbonilo en las proteínas

El contenido de grupos carbonilo generados en las proteínas en cada muestra de los sistemas leche-pectina y control (leche descremada) se determinó con un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu, Japón) a 370nm por su reacción con DNPH, y utilizando un coeficiente de extinción de $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para su cuantificación.

Para ello, se tomaron alícuotas de las muestras de leche preparadas (1mg de proteína, ~30 μ L de leche) fueron incubadas con 10mM de 2,4-DNPH en HCl 2M por 30min a temperatura ambiente. Las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) 10% (concentración final) y luego recuperadas por centrifugación. Los precipitados fueron lavados tres veces con de etanol/acetato de etilo 1:1 v/v, y finalmente disueltos en 1mL de hidrocloreuro de guanidina 6M (pH 2,3). Los resultados fueron expresados como nmoles de grupos carbonilo/mg de proteínas.

III.3.3.2.2. Determinación de la oxidación de grupos sulfhidrilos

El contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas en cada muestra de los sistemas leche-pectina se determinó a 412nm con un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu, Japón) utilizando el procedimiento de Ellman con el reactivo DTNB utilizando un coeficiente de extinción de $1,37 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para su cuantificación.

Para ello, se tomaron alícuotas de las muestras de leche preparadas (1mg de proteína, ~30 μ L de leche) fueron precipitadas con TCA 10% (concentración final) y recuperadas por centrifugación.

Los precipitados fueron lavados tres veces con etanol/acetato de etilo 1:1 v/v, y finalmente disueltos en hidrocloreto de guanidina 6M (pH 6,0). Posteriormente se agregó una solución al 0,5% del reactivo de Ellman y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 15min. Los resultados fueron expresados como nanomoles de sulfhidrilos/mg de proteína.

III.3.3.2.3. Determinación de ditirosina y N'-formilquinurenina

El contenido de ditirosina de las proteínas generadas en cada muestra de leche se determinó mediante el aumento de la fluorescencia (espectrofluorómetro AMINCO-Bowman Serie 2, Thermo Electron Corp., EE.UU.) utilizando longitudes de onda de excitación y de emisión de 325 y 410nm, respectivamente. La ditirosina tiene un espectro de emisión característico de estándar auténtico con un máximo a 410nm. El contenido de N-formilquinurenina (Y = AFU o unidades de fluorescencia arbitrarias) se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 325nm y una longitud de onda de emisión de 435nm. La leche fue precipitada con TCA al 10% (5% concentración final) y centrifugada. El precipitado fue lavado con etanol/acetato de etilo 1:1 v/v y se lo resuspendió en 1mL de clorhidrato de guanidina 6M (pH 6,0), quedando en solución la proteína. Las soluciones anteriores (1mg/mL) fueron analizadas para determinar la presencia de ditirosina por fluorometría. La expresión de los resultados de ditirosina se realizó como la relación entre la intensidad emitida a 410nm y 350nm, la cual fue expresada como Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (AFU).

III.3.4. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se reportan como la media aritmética y el desvío estándar para n replicados. Los resultados fueron analizados a través de ANOVA ($<0,05$) seguido del test de comparaciones múltiples LSD (*Least significant difference*). Se utilizó el software GraphPad Prism (versión 8, 2019, EE.UU.).

III.4. Resultados y Discusión

III.4.1. Aplicación de los polvos de berenjena P-P y P-CC

III.4.1.1. P-CC y P-P como aditivos antioxidantes de queso vegano untado de castañas de cajú

Los quesos veganos untados o cremas de castañas de cajú fueron preparados de acuerdo con la formulación resumida en la **Tabla III.3.1** utilizando los polvos de berenjena P-P y P-CC obtenidos según se explica en I.3.3.2 y I.3.3.3. Las muestras fueron almacenadas durante 30 días en recipientes cerrados, protegidos de la luz y a 8°C. La actividad de agua fue de aproximadamente 0,962 para el sistema control y para la crema de castañas de cajú conteniendo P-P, y de 0,978 para el sistema conteniendo P-CC (**Figura III.4.1**). Durante el almacenamiento refrigerado no se observó un cambio significativo de la actividad de agua para los quesos de castañas de cajú control y P-CC, mientras que aumentó ligeramente para el sistema P-P (**Figura III.4.1**). La acidificación del queso con ácido cítrico para mayor estabilidad y requerimientos sensoriales dio un pH inicial de 4,75, y disminuyó significativamente a 4,32-4,35 a 30 días de almacenamiento refrigerado debido a la difusión y homogenización del ácido cítrico.

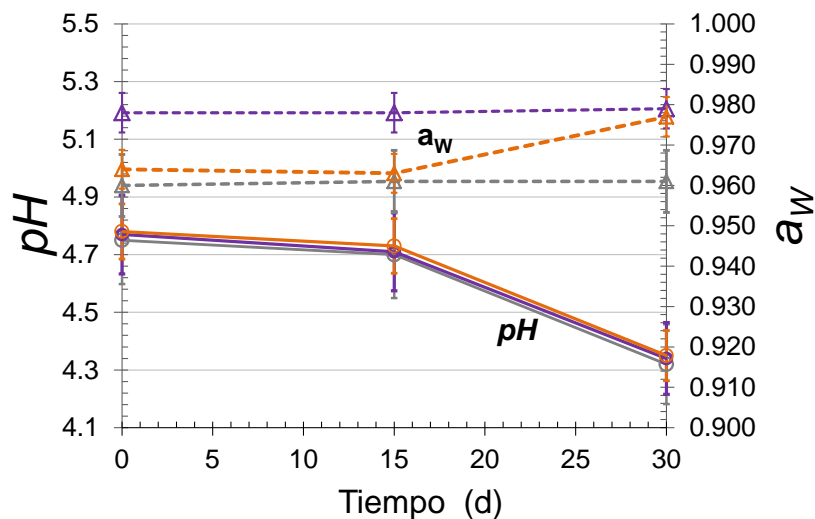


Figura III.4.1. Actividad de agua y pH en función del tiempo de almacenamiento a 8°C de los quesos de castañas de cajú control (—), así como con el polvo de berenjena agregado P-CC (—) o P-P (—) al 5%

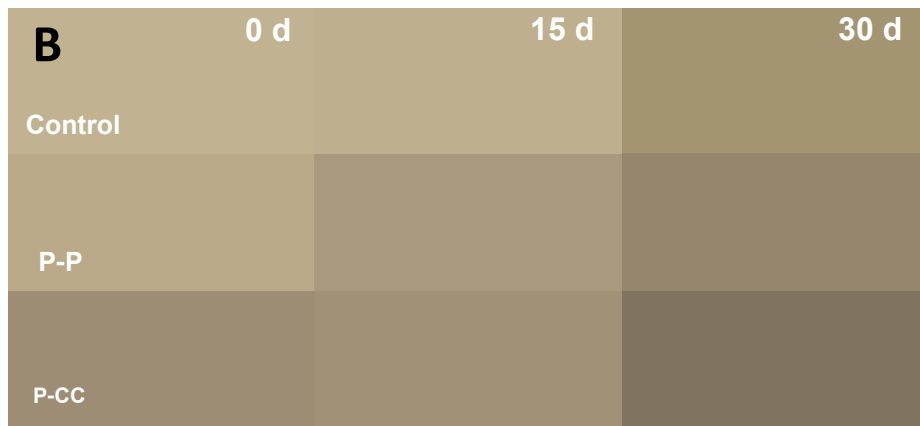
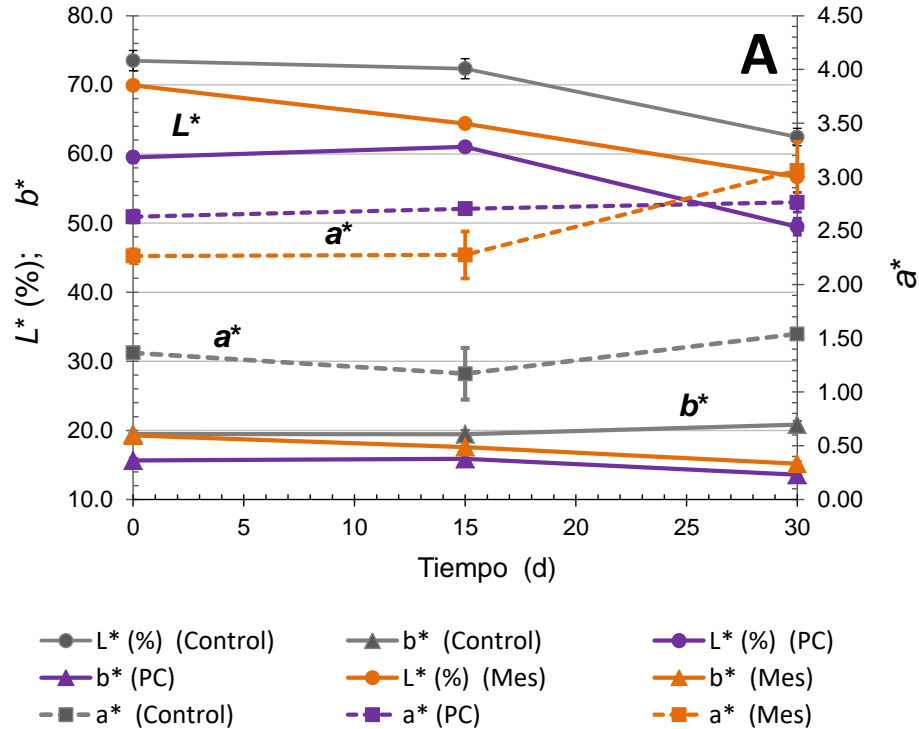


Figura III.4.2. Coordenadas de color del espacio CIELab (L^* , a^* y b^*) en función del tiempo de almacenamiento a 8°C (A) de los quesos veganos unttables de castañas de cajú control y conteniendo el polvo de berenjena P-CC o P-P agregados al 5% p/p, así como los correspondientes colores visualmente observados (B).

La presencia de 5,0% de PC o Mes en el queso vegano de castañas de cajú disminuyó leve pero significativamente la luminosidad (L^*) del 73,5% (control) al 60% para el queso PC (Figura III.4.2), y el valor b^* de + 19,27 a +15,65 para el queso PC, mientras que el parámetro de color a^* fue +1,37 para el queso control, aumentando a +2,27 y +2,63 para los quesos Mes y PC (Figura III.4.2).

III.4.1.2. Efectos antioxidantes de los polvos de berenjena

Los frutos secos se utilizan regularmente para la preparación de análogos de quesos para veganos, siendo especialmente saludables por sus altos niveles en ácidos grasos poliinsaturados, pero por ello inestables a la oxidación. La grasa es reportada como el componente principal de las castañas de cajú, con 48,3% del peso total, 79,7% de los cuales son ácidos grasos insaturados, incluyendo el ácido oleico, que es el más abundante (60,7%), seguido de linoleico (17,8%) y una baja cantidad de ácido linolénico (0,13%) (Rico et al., 2016).

El estado oxidativo de las muestras de queso untable de castaña de cajú control, P-P y P-CC (5,0% p/p) se evaluaron durante el almacenamiento refrigerado (8°C) por 30 días mediante la determinación del índice de peróxidos (PI) y de las TBARS. Para el sistema control, se observa un aumento del PI (**Figura III.4.3**) con valor inicial de 0,080 meq oxígeno/kg a valores de 2,3 y 3,7 meq oxígeno/kg después de 15 y 30d de almacenamiento, respectivamente. P-P y especialmente P-CC retrasaron el aumento de índice de peróxidos con respecto a la muestra control. Esta última contiene los antioxidantes naturales propios de las castañas de cajú como los tocoferoles (Rico et al., 2016). La misma conclusión puede obtenerse del muy alto aumento del MDA determinado a través del ensayo de TBARS (**Figura III.4.4**) para el sistema control durante el almacenamiento por 30d (desde 3,7 hasta 52,7 y 94,7 mg MDA/kg queso untable) y el efecto antioxidante relevante mostrado por P-P y especialmente por P-CC. El aporte de antioxidantes lipofílicos, tocoferoles, luteína y β -caroteno (**Tabla I.4.2**), y de compuestos fenólicos extraíbles (**Tabla I.4.3**) propios de P-CC y de P-P evidentemente sumaron actividad antioxidante a las muestras de queso vegano untable. Por lo tanto, los polvos de berenjena se comportaron como preservadores antioxidantes eficientes del queso crema de castañas de cajú cuando se usaron al 5,0% p/p. Estos resultados tienen también una correlación con la alta actividad antioxidante obtenida para los polvos de berenjena (**Tabla I.4.5**), siendo la actividad antioxidante de P-CC mayor que la de P-P, debido al mayor contenido de antioxidantes lipofílicos (**Tabla I.4.2**) y de compuestos fenólicos extraíbles (**Tabla I.4.3**) en P-CC.

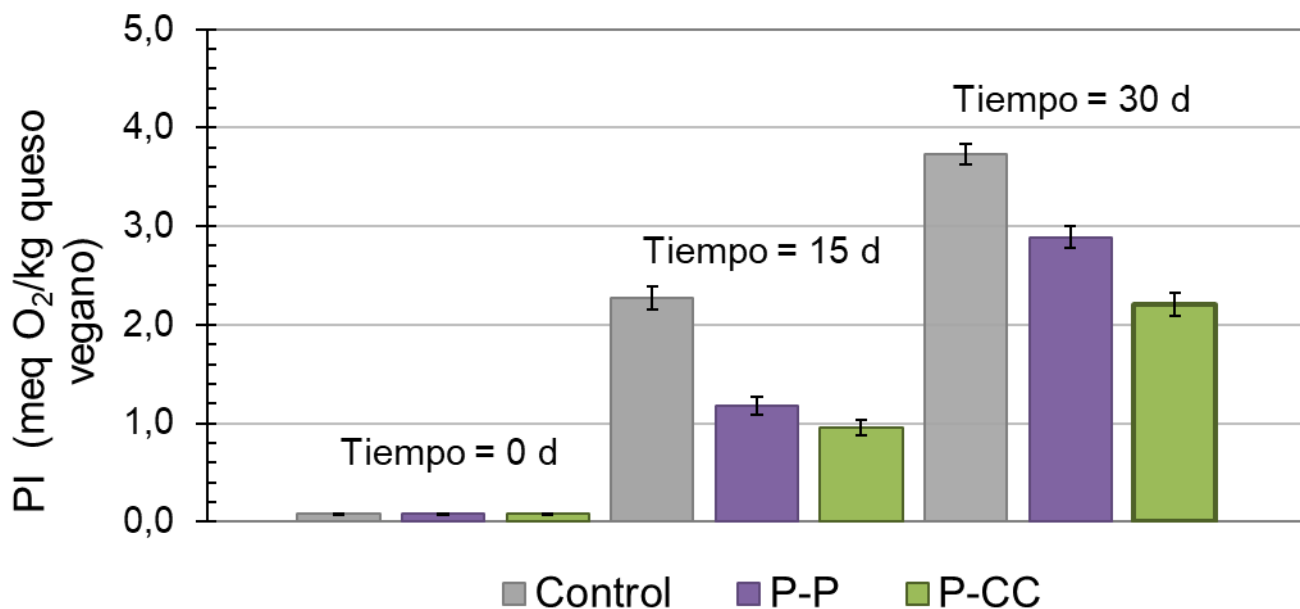


Figura III.4.3. Índice de peróxidos para los quesos de castañas de cajú control, los preparados con los polvos de berenjena P-P y P-CC al 5% p/p.

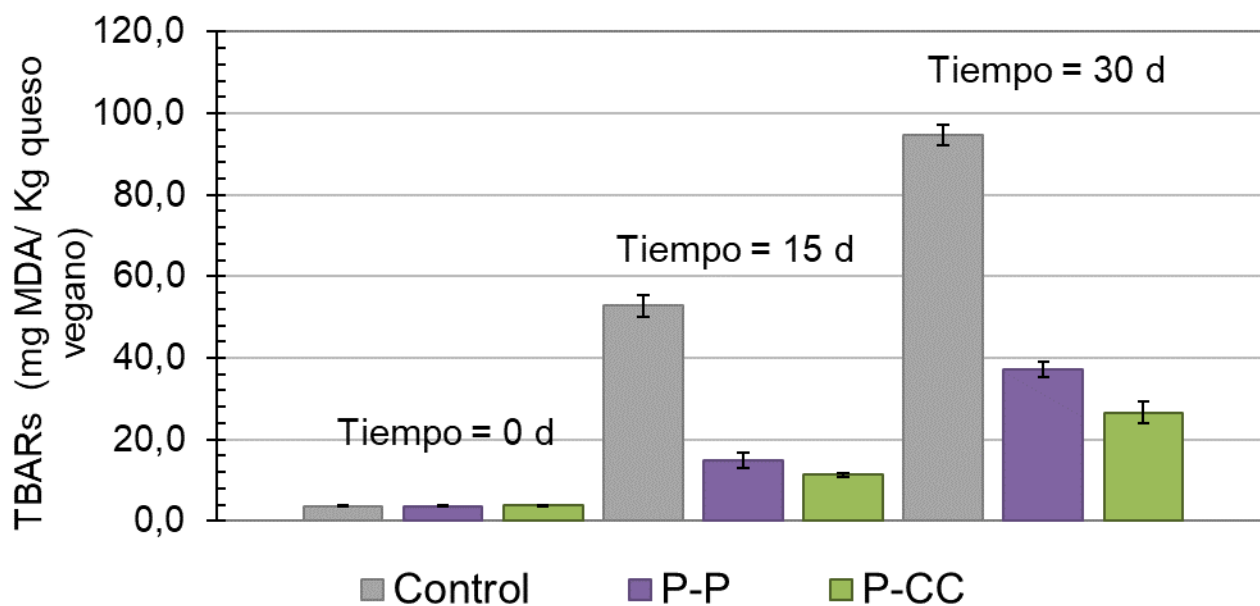


Figura III.4.4. Especies reactivas al TBARs para los quesos de castañas de cajú control, y los preparados con los polvos de berenjena P-P y P-CC al 5% p/p. Letras iguales sobre las barras indica diferencia no significativa.

En el momento en que muchos alimentos entran en almacenamiento, hay suficientes peróxidos presentes para la iniciación de reacciones vía radical libre. Una multitud de productos saturados podrían formarse a temperaturas normales de almacenamiento, como en la oxidación de lípidos. Una vez que se produce un radical libre, su alta reactividad al oxígeno provoca una rápida conversión a un peróxido o hidroperóxido radicalario de los ácidos grasos insaturados, los cuales son bastante inestables y pueden descomponerse para producir más radicales libres, iniciando así una reacción en cadena. Es este mecanismo de descomposición el responsable de los sabores y aromas (*flavors*) rancios que se producen, así como de la cantidad de otras reacciones que reducen la vida útil y el valor nutricional de los alimentos. En muchos casos, los alimentos se mantienen en condiciones en las que se vuelven nutricionalmente inadecuados o inseguros debido a la formación de compuestos tóxicos (Labuza et al., 1971). Los ácidos grasos insaturados oxidados pueden a su vez descomponerse en productos de oxidación secundaria como el 4-hidroxinonenal (HN) y el malondialdehído (MDA). El MDA puede formarse a partir de los ácidos grasos poliinsaturados, y es uno de varios productos finales formados a través de la descomposición de productos de peroxidación lipídica. El método TBARS no es específico para MDA. Los productos de degradación de peróxidos grasos distintos del MDA también son positivos para la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Catalán et al., 2018). Zacheo et al. (2000) estudiaron los cambios en la composición de los aceites de avellanas y almendras, los cuales presentan contenidos altos de ácido oleico y ácido linoleico. Los datos que reportan demuestran que, en las almendras, durante el envejecimiento natural, hay una reducción en la concentración de lípidos, la formación de HP y la acumulación de MDA. La evidencia adicional de que la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ocurre en el almacenamiento a largo plazo surge de la disminución de los de ácidos grasos. Como resultado, no solamente se destruyen los lípidos, sino que también se desencadenan reacciones complejas que generan una variedad de productos con sabores desagradables y potencialmente tóxicos.

III.4.1.3. Estudio reológico del queso vegano untable de castañas de cajú

Las mediciones reológicas son importantes en la industria alimentaria como herramienta para la caracterización física de los alimentos. Su comportamiento reológico depende de sus componentes químicos, estructuras moleculares, interacción intra e intermolecular y dispersión (Jiang et al., 2015). La reología de productos alimenticios complejos juega un papel importante en el control de calidad, en muchos casos determinando la aceptación del consumidor (Diaz-Ocampo et al., 2014). Desde el punto de vista de la ingeniería, las propiedades viscoelásticas son muy útiles en el diseño y predicción de la estabilidad del producto (Augusto et al., 2013) y son muy sensibles a la composición química y a las interacciones entre los componentes.

Se puede observar en la **Figura III.4.5** los espectros mecánicos de los diferentes quesos untables en el momento inicial del almacenamiento. Los valores de G' fueron superiores a los de G'' en todo el rango de frecuencia estudiado y separados en menos de un ciclo logarítmico, indicativo de la existencia de una red tipo “gel débil” formada por agregados de partículas. G'' es dependiente de la frecuencia en todo el rango de frecuencia angular. G' está directamente relacionado con la densidad de enlaces o entrecruzamientos, físicos o químicos, en la red constituyente del gel (Alvarez et al., 2017). Se reportó el mismo comportamiento reológico para formulaciones de tahini de girasol industrial (Muresan et al., 2014) y para geles de garbanzo desarrollados con diferentes formulaciones (Canet et al., 2015).

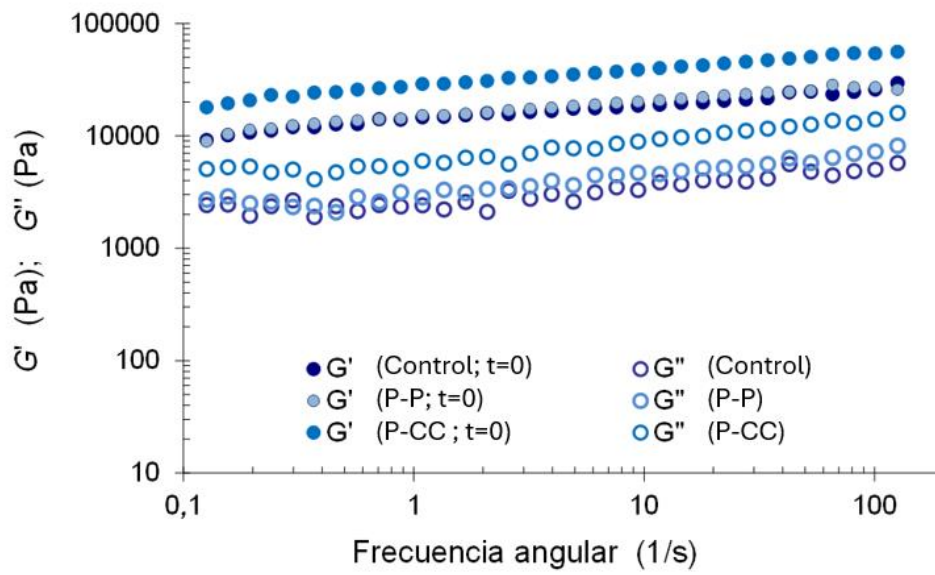


Figura III.4.5. Espectros mecánicos del queso vegano untable de castaña de cajú control y con la adición de 5% p/p de polvo de berenjena P-CC o P-P a tiempo cero de almacenamiento a 8°C.

En el caso de P-P, sus fibras no modificaron el espectro mecánico al ser comparado con el queso análogo control, mientras que la presencia de las fibras de P-CC aumentó los módulos elástico (G') y viscoso (G'') del queso vegano untable, aunque en la misma proporción ($\tan \delta \approx 0,228$) que en los otros sistemas ($\tan \delta \approx 0,233$). Este efecto puede deberse al mayor contenido de pectina y celulosa de P-CC (**Tabla I.4.1**). Por otro lado, los módulos G' y G'' no cambiaron durante el almacenamiento de 15 y 30 días para el control (**Figura III.4.6 A**) ni para P-CC (**Figura III.4.4 B**), mientras que los módulos G' y G'' disminuyeron, y en la misma proporción ($\tan \delta \approx 0,215$), después de 30 días de almacenamiento para el queso untable con P-P (**Figura. III.4.6 C**). Este último resultado podría deberse probablemente al aumento de la actividad del agua después de 30 d de almacenamiento. Se pudo observar que, en el tiempo de almacenamiento, no hubo una variación significativa en los espectros mecánicos de los sistemas (**Figura III.4.6**), lo cual indica que la formulación del queso untable de castañas de cajú conteniendo P-CC es reológicamente estable bajo las condiciones de almacenamiento y por el tiempo estudiado.

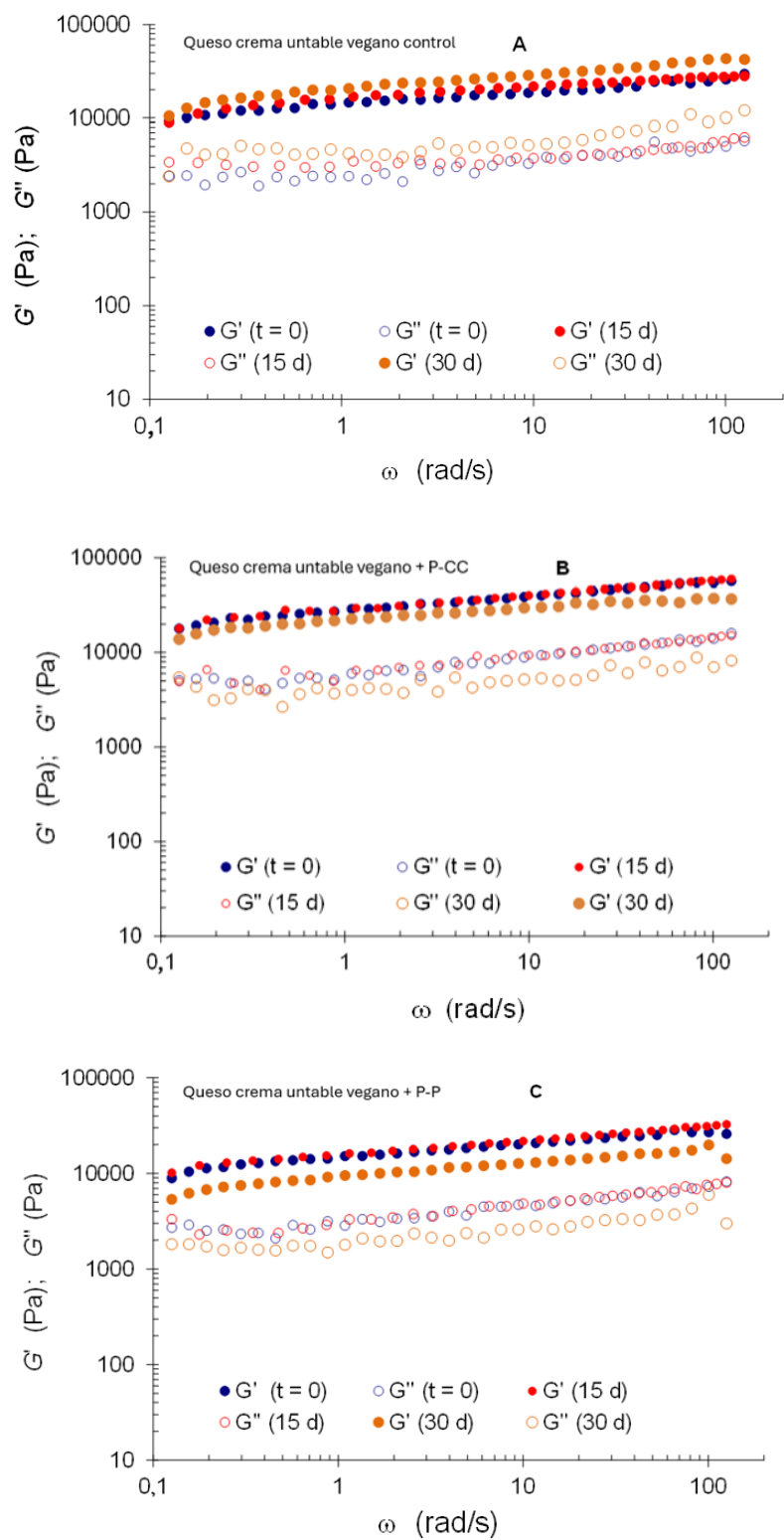


Figura III.4.6. Espectros mecánicos del queso vegano unttable de castaña de cajú control (**A**) y con la adición de 5% p/p de polvo de berenjena P-CC (**B**) o P-P (**C**) a 0, 15 y 30 días de almacenamiento a 8°C.

III.4.2. Pectinas extraídas de los polvos de berenjena P-P y P-CC

III.4.2.1. Pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS en leche descremada

Se prepararon sistemas de leche descremada con cada pectina de bajo DM (PC, PCUS, Mes y MesUS), a una concentración de 0,5% p/v, pectinas que fueron extraídas de los polvos de berenjena (sección II.3.3). La composición de la leche descremada utilizada fue, resumidamente, de 1,0% p/v de grasa total con 0,6% de grasas saturadas; 3,0% p/v proteínas y 105mg de calcio/100mL de leche (sección III.3.1). Se usó la mayor concentración posible de pectina sin que se observara la formación de agregados, obteniendo soluciones homogéneas, con la finalidad de tener la mayor cantidad de compuestos fenólicos extraíbles posible disueltos en el suero de la leche.

Tabla III.4.1. Coordenadas CIE-Lab de color de los sistemas de leche sin y con 0,5% p/v de pectina PC, PCUS, Mes o MesUS agregada, antes de la exposición con luz UV-C.

	Leche	Leche + PC	Leche + PCUS	Leche + Mes	Leche + MesUS
L^{*a}	85,5 ^A ± 0,03	67,5 ^B ± 0,01	64,3 ^C ± 0,04	68,7 ^D ± 0,02	70,1 ^E ± 0,2
a^{*a}	-3,5 ^A ± 0,01	0,8 ^B ± 0,01	1,3 ^C ± 0,01	-0,6 ^D ± 0,01	-1,1 ^E ± 0,02
b^{*a}	6,4 ^A ± 0,01	10,2 ^B ± 0,02	10,3 ^B ± 0,01	9,4 ^C ± 0,1	10,6 ^B ± 0,03

^aSe notifican las medias y las desviaciones estándar para $n = 10$. Diferentes letras mayúsculas como superíndices en una fila dada indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los resultados.

Las coordenadas de color de las soluciones preparadas con la leche, sin y con agregado de 0,5% p/v de pectina se informan en la **Tabla III.4.1**. El parámetro L^* estuvo entre el 64,3 y el 70,1%, siendo menor para los sistemas PC y PCUS, con mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles (**Tabla I.4.3**). Por otro lado, los valores a^* estuvieron entre -1,1 y +1,1, mientras que los de b^* variaron entre +9,4 y +10,6. De acuerdo con estos resultados, las soluciones lácteas presentaron diferentes tonalidades de marrón (**Figura III.4.7**).

Se midieron los parámetros de color de los sistemas de leche preparados antes de ser expuestos a UV-C. Al comparar los cuatro sistemas de pectina + leche descremada con el sistema control (leche), se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) del parámetro L^* debido a la coloración aportada por los compuestos fenólicos presentes en las pectinas. El parámetro a^* aumentó, desplazándose hacia tonalidades violetas, mientras que el parámetro b^* también aumentó, desplazándose hacia tonos amarillos. Por otro lado, no se detectaron cambios significativos en la coloración al exponer los sistemas de leche + pectina y la leche descremada control a las 6 horas de exposición a la luz UV-C.

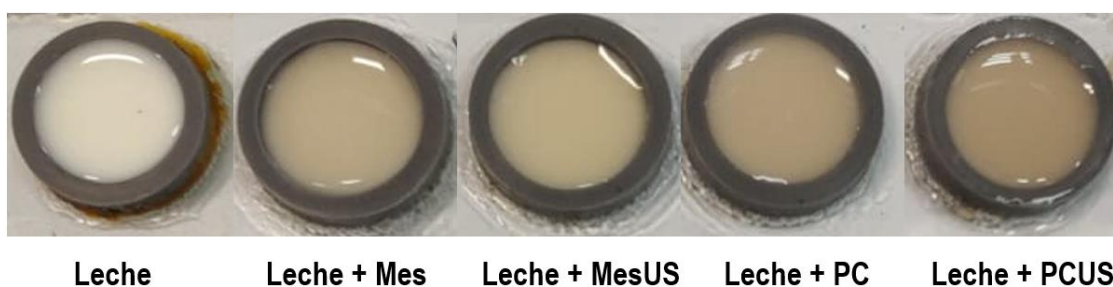


Figura III.4.7. Color de los diferentes sistemas de leche sin y con agregado de la pectina (0,5% p/v) de bajo grado de metilesterificación aislada de la berenjena.

Las interacciones entre las proteínas y los polisacáridos se pueden clasificar ampliamente en dos situaciones, repulsivas y atractivas, dependiendo de la naturaleza de los biopolímeros, sus concentraciones, así como las condiciones de la solución. Cuando la proteína y el polisacárido llevan carga opuesta pueden formar un complejo o agregado soluble (un sistema monofásico) o precipitados insolubles (un sistema bifásico). Cuando la proteína y el polisacárido llevan la misma carga, se consideran biopolímeros que no interactúan. En tales circunstancias, pueden formar una sola fase si los dos biopolímeros se distribuyen uniformemente a lo largo del medio o dos fases distintas con cada biopolímero, distribuyéndose principalmente en una fase. Generalmente, el primer fenómeno ocurre cuando ambos biopolímeros están a baja concentración, diluida, mientras que el segundo fenómeno ocurre cuando ambos están altamente concentrados. Se ha demostrado que la pectina se adsorbe a través de las interacciones electrostáticas entre grupos carboxilato de la pectina y los grupos catiónicos ($-NH_4^+$) de los aminoácidos de la caseína en sistemas de leche acidificada diluida, donde la adsorción tiene lugar a pH 5 o inferior. El pH, la fuerza iónica, la densidad de carga en los polisacáridos y la concentración de los polisacáridos, así como factores de

procesamiento, se consideran variables importantes para influir en las interacciones pectina-caseína (Liang y Luo., 2020). Dado que la adsorción de pectina sobre micelas de caseína es un comportamiento interfacial, también está fuertemente dictada por la concentración de pectina. En general, el porcentaje en peso de micelas de caseína en la leche descremada es de aproximadamente 2,5%. La pectina no se adsorbe sobre las micelas de caseína en la leche descremada a su pH natural de 6,7. A una concentración de pectina más baja ($< 0,5\%$), la mezcla será cosoluble y formará una solución estable. La adición excesiva de pectina podría, en consecuencia, resultar en incompatibilidad termodinámica, lo que llevaría a una floculación por agotamiento con una fase rica en partículas de proteínas y una fase rica en el exceso de polisacárido (Marozziene y De Kruif, 2000).

III.4.2.2. Comportamientos reológicos de los sistemas Leche-Pectina

El contenido de calcio propio de la leche descremada (**sección III.3.1**) y el contenido de ácidos urónicos de las pectinas analizadas (**Tabla II.4.4**) implican que había disponible entre 13,8 y 16,0mg de ión calcio/g ácidos urónicos en las muestras de leche y pectina agregada (5mL leche/placa conteniendo 0,5% p/v de cada pectina) (**sección III.3.3**). Por lo tanto, el contenido de ión calcio de las muestras de leche no resultaba suficiente para que gelificara la pectina agregada.

En curvas de flujo, esto es, de viscosidad *versus* velocidad de corte (**Figura III.4.8**), la leche descremada (pH $6,65 \pm 0,02$) mostró un comportamiento de fluido Newtoniano a $8,0^{\circ}\text{C}$, con una viscosidad constante, independiente de la velocidad de corte, de $0,0012\text{Pa}\cdot\text{s}$ o $0,012\text{Poise}$. En cambio, la adición de pectina PC, PCUS, Mes o MesUS modificó el comportamiento reológico de la leche al de fluido pseudoplástico, con caída de la viscosidad al aumentar la velocidad de corte por encima de $0,003\text{s}^{-1}$ (**Figura III.4.8**). Esto sería debido a la formación de una red a través de la interacción electrostática entre al menos 14 grupos carboxilato contiguos (pK_a de la pectina $\approx 3,5-4,5$; Zhang et al., 2015) pertenecientes a cadenas de pectina vecinas y iones calcio en una conformación similar caja de huevos, la cual sería degradada por cizalla a velocidades de corte encima de $0,003\text{s}^{-1}$. El ajuste ($R^2 \approx 0,975-0,988$) (**Figura III.4.8**; líneas continuas) de los datos experimentales al modelo de Carreau (**Ecuación III.3.2**) mostró valores de viscosidad Newtoniana (η_0) entre 60 y $275\text{Pa}\cdot\text{s}$, valores de viscosidad infinita (η_{∞}) de $\approx 0,016\text{Pa}\cdot\text{s}$ a velocidades de

cizallamiento terminal, tiempos de relajación característicos (τ_c) entre 215 y 300s, y un exponente M de $\approx 0,54$.

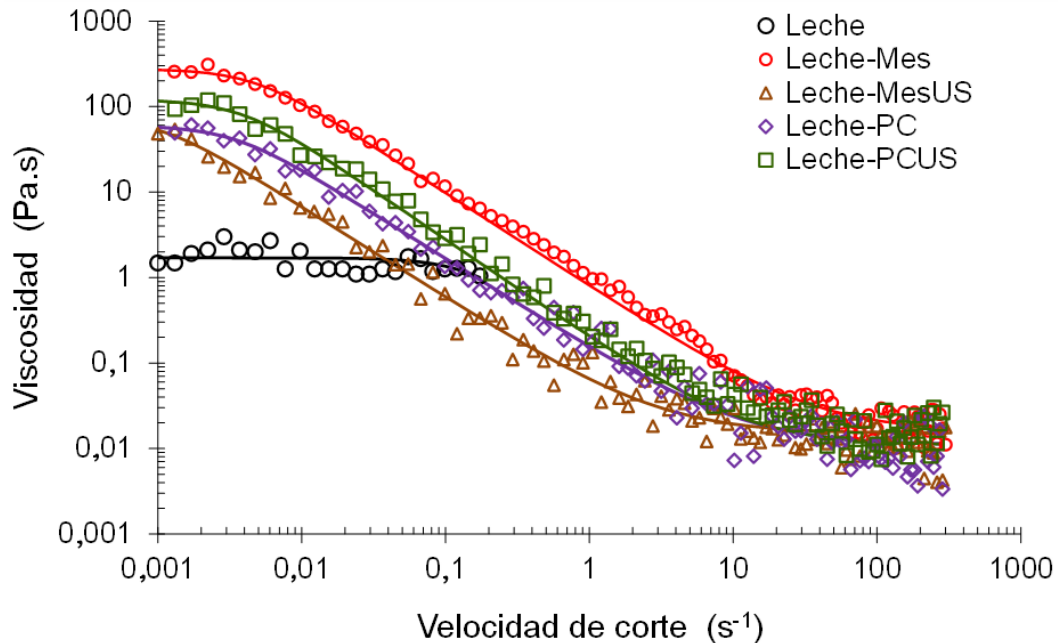


Figura III.4.8. Curvas de flujo a 8°C de los diferentes sistemas de leche descremada y de leche + pectina de berenjena al 0,5% (p/v).

La formación de gel depende principalmente de la interacción calcio-pectina con micelas de caseína que sólo reducen el agua libre disponible para la gelificación. Al pH de la leche, la κ -caseína actúa como una barrera electrostática y física hacia la agregación de micelas de caseína adyacentes (de Kruif, 1999) y las pectinas de bajo metoxilo permanece dispersa en la fase acuosa del suero de leche.

Harte et al. (2007) estudiaron el comportamiento reológico de pectinas de bajo DM y leche descremada. Observaron que la migración iónica de calcio de las micelas de caseína al suero lácteo durante la acidificación promueve la interacción entre las pectinas de bajo metoxilo antes de que ocurra la agregación isoelectrónica de las micelas de caseína. Los resultados indicaron que a medida que el pH disminuye de 5,0 a 4,9, las propiedades reológicas de las mezclas de micela de caseína - pectina de bajo DM dependen principalmente de la concentración de calcio iónico en el suero. La interacción pectina-caseína en productos lácteos es un proceso de 2 pasos: primero la interacción

pectina-caseína micelar, dependiente del calcio, solubilizada a medida que el pH se acerca de 5,0 a 4,9, y segundo la interacción pectina-caseína en el rango de pH 4,9 a 4,0. A medida que el pH se acerca a 6 los iones calcio migran de la micela de caseína a la fase acuosa del suero y promueven el entrecruzamiento entre las cadenas de pectina de bajo DM. Cerca de pH 5,0, las micelas se vacían de calcio iónico, la κ -caseína colapsa y se produce una agregación maximizada de pectina inducida por calcio. Una disminución adicional en el pH a \sim 4,6, promueve la agregación isoeléctrica de micelas de caseína y contribuye a la formación de complejos caseína-pectina.

Zidi et al. (2019) realizaron estudios de pectina de bajo DM en leche de camello. Observaron que la presencia de pectina de bajo DM tuvo un impacto no sólo en la viscosidad aparente sino también en el tamaño de las partículas de caseína, y una influencia importante en sus propiedades reológicas durante la formación de geles ácidos de leche. La adición de pectina aumentó la viscosidad de todos los sistemas y las propiedades reológicas dependían de la concentración de la pectina de bajo DM agregada.

Aunque la caseína y la pectina han recibido su interés respectivo como ingredientes alimentarios bioactivos, a menudo también se estudian juntas para mejorar las propiedades fisicoquímicas a fin de complementar la funcionalidad de cada una y dar lugar a nuevas aplicaciones tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria (Liang y Luo, 2020).

III.4.2.3. Efecto antioxidante de las pectinas

El efecto antioxidante de las pectinas PC, PCUS, Mes y MesUS fue evaluado a través de su potencial para evitar que las proteínas de la leche descremada (1,0% de grasa láctea; 0,6% p/v grasas saturadas; 3,0% p/v proteínas; **sección III.3.1**) se fotooxidaran (radiación UV-C: 200-280nm) en el aire a 25°C.

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o inhibir la oxidación de proteínas al inhibir el inicio o la propagación de las reacciones de oxidación en cadena. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que pueden

desempeñar un papel importante en la fijación y neutralización de radicales libres, la extinción del oxígeno singlete y triplete, o la descomposición de los peróxidos (Zheng y Wang, 2001).

Se sabe que los compuestos fenólicos típicos que poseen actividad antioxidante son principalmente ácidos fenólicos y flavonoides. Los ácidos fenólicos han sido repetidamente implicados como antioxidantes naturales en verduras, hortalizas y frutas como la berenjena. Por ejemplo, el ácido cafeico y el ácido ferúlico y sus respectivos derivados están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Como se reportó en el **Capítulo I**, el polvo de berenjena está constituido principalmente por derivados de ácidos hidroxicinámicos (**Tabla I.4.3**), al igual que las pectinas extraídas en el **Capítulo II (Tabla II.3.7)**. Se ha encontrado que el ácido cafeico y derivados tienen una alta actividad, comparable a la del flavonoide quercetina (Larson, 1988).

La oxidación es el resultado de procesos metabólicos naturales, pero la formación excesiva de especies reactivas como los radicales libres puede dañar biomoléculas importantes en el organismo vivo. La oxidación de proteínas se define como la modificación covalente de una proteína inducida directamente por ROS ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$, $\text{RO}_2\bullet$, $\text{RO}\bullet$, HO_2^-). El daño oxidativo a las proteínas puede afectar sus funciones estructurales, como receptores, enzimas, transporte (Celi y Gabai, 2015).

La fotooxidación de la caseína ocurre comunmente durante el procesamiento y almacenamiento de la leche (Rossi et al., 2022). Principalmente la riboflavina (vitamina B2 $\approx 5\mu\text{M}$ en la leche) pero también las porfirinas (protoporfirina IX) son los fotosensibilizadores naturalmente presentes que inducen la formación de ROS en estado excitado bajo la luz, incluido el oxígeno singlete.

Después de la exposición a la radiación de longitud de onda corta, en el rango UV-C (200 a 280nm), a 25°C, en presencia del oxígeno molecular (O_2) del aire, se produjo la fotooxidación de las proteínas de la leche descremada como se infiere de la disminución más rápida de su contenido de grupos sulfhidrilo o tiol ($-\text{SH}$) (**Figura III.4.9 A**) y, especialmente, en la generación más rápida de grupos carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$) (**Figura III.4.9 B**), de N-formilquinurena (**Figura III.4.10 A**) y de ditirosina (**Figura III.4.10 B**). El entrecruzamiento de las proteínas en la caseína y su agregación es una

consecuencia importante de la exposición de las proteínas de la leche a la luz en presencia de aire (Rossi et al., 2022).

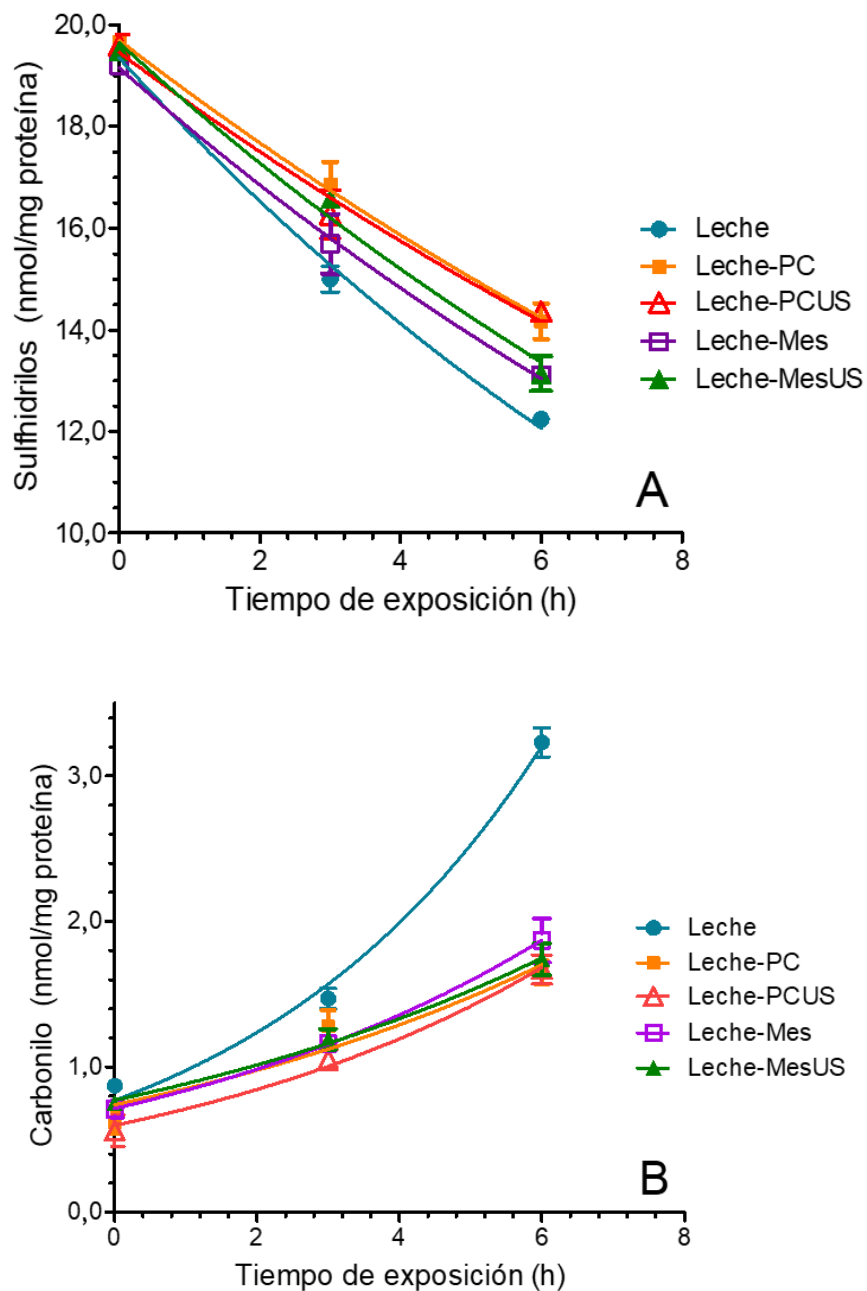


Figura III.4.9. Cinética de pérdida del grupo sulfhidrilo (A) y de formación del grupo carbonilo (B) en leche descremada para los tiempos de exposición a radiación UV-C (25°C) trazados en las abscisas. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

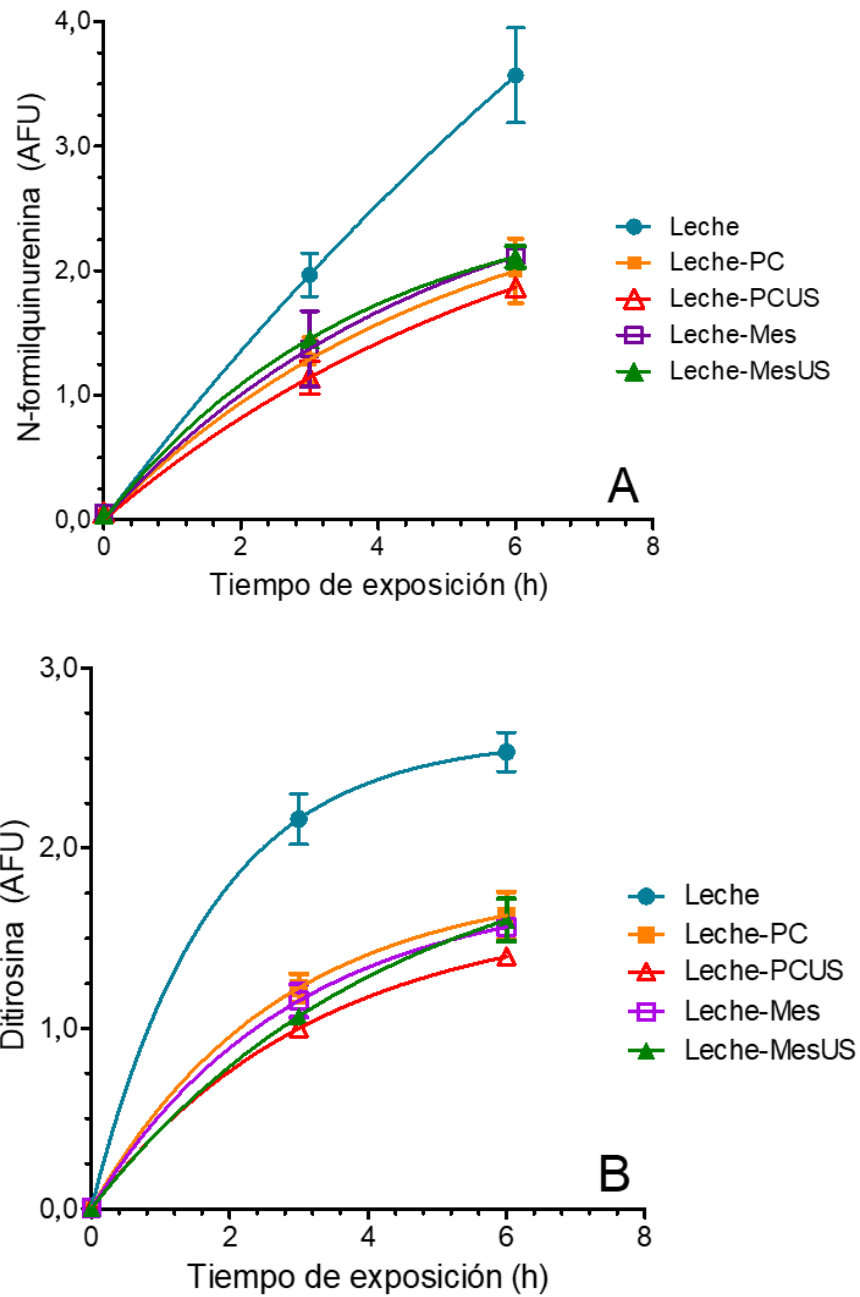


Figura III.4.10. Cinética de formación de N-formilquinurena (A) y de ditirosina (B) en leche descremada para los tiempos de exposición a radiación UV-C (25°C) trazados en las abscisas. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

Para la leche descremada, el contenido de sulfhidrilo (Y) decae en el momento de la exposición (t), con respecto a su contenido inicial (Y_0), ajustándose a una cinética de primer orden (**Ecuación III.4.1**) (**Figura III.4.9 A**; línea continua) con una constante cinética de velocidad (k) de $0,079\text{h}^{-1}$ (**Tabla III.4.2**). La misma cinética se determinó para muestras de leche descremada con pectina agregada, aunque con valores significativamente ($p < 0,05$) menores de k , entre $0,053\text{h}^{-1}$ y $0,064\text{h}^{-1}$. Por otro lado, la generación de carbonilo también se ajusta, estadísticamente, al mismo orden cinético (**Figura III.4.9 B**; línea continua), y con un valor k de $0,24\text{h}^{-1}$ para la leche descremada (**Tabla III.4.2**). La adición de pectinas ralentizó las constantes de velocidad hasta $0,136\text{--}0,17\text{h}^{-1}$.

$$Y = Y_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{Ecuación III.4.1})$$

La formación de grupos carbonilo en las proteínas es la transformación irreversible más frecuente y también la más estudiada. La acumulación de carbonilos se ha observado en varias enfermedades humanas. Las proteínas pueden oxidarse de más de 35 maneras, y muchas de estas modificaciones implican alguna forma de carbonilo (Celi y Gabai, 2015). Los grupos carbonilo (**Figura III.4.9 B**) resultan de la oxidación (mediada por radicales libres) de las cadenas laterales alifáticas de los aminoácidos componentes de las proteínas (Hawkins y Davies, 2019).

La cisteína de la caseína y la metionina, aminoácidos que contienen átomos de azufre (**Figura III.4.9 A**), son particularmente propensas al daño por estrés oxidativo. En el caso de la cisteína, la oxidación conduce a la formación de enlaces disulfuro, disulfuros mixtos y radicales tihilo, mientras que el sulfóxido es el principal producto de oxidación de la metionina (Celi y Gabai, 2015). Las reacciones secundarias que ocurren entre las cadenas laterales de las proteínas oxidadas y el -SH de los monómeros de cisteína de la caseína, a través de la adición de Michael a las quinonas que se forman de la tirosina, producen especies glutationiladas o aductos de proteínas covalentes. Por lo tanto, la α -caseína oxidada reacciona con la κ -caseína nativa para generar agregados de alta masa molecular (Rossi et al., 2022). Otros entrecruzamientos novedosos pueden formarse mediante una reacción similar a la adición de Michael que involucra otros aminoácidos oxidados en proteínas componentes de la caseína (Rossi et al., 2022).

El grupo tiol libre de la cisteína sufre fácilmente una oxidación reversible para formar un puente disulfuro (-S-S-) que puede ser "reparado" en presencia de un donante de tiol como el glutatión. Pero también son susceptibles a daños irreversibles por condiciones oxidativas. En ausencia de una protección antioxidante adecuada, estos sitios reactivos pueden volverse inútiles debido a este daño irreversible (Griffiths, 2000).

Por otro lado, la formación de N-formilquinurenina (**Figura III.4.10 A**; línea continua) y de ditirosina (**Figura III.4.10 B**; línea continua) en leche descremada se ajusta estadísticamente a una cinética de primer orden, pero los productos se generan por separado mediante reacciones competitivas (**Ecuación III.4.2**). Por lo tanto, se alcanza una concentración de equilibrio (Y_{max}) en el tiempo $t \rightarrow \infty$ que fue mayor para la formación de N-formilquinurenina (10,52AUF) que para la de ditirosina (2,61AUF) (**Tabla III.4.2**).

$$Y = Y_{max} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Ecuación III.4.2})$$

Los valores de k determinados para la generación separada de N-formilquinurenina ($0,069\text{h}^{-1}$) y de ditirosina ($0,58\text{h}^{-1}$) (**Tabla III.4.2**) mostraron una generación más rápida de ditirosina. En cambio, las muestras de leche con pectina agregada mostraron valores más bajos de Y_{max} , entre 2,6AUF y 3,1AUF para N-formilquinurenina, y entre 1,66AUF y 2,1AUF para la ditirosina (**Tabla III.4.2**).

La N-formilquinurenina (**Figura III.4.10. A**) es un producto de carbonilación de la oxidación del triptofano (Scheidegger et al., 2010). La energía emitida por la radiación UV puede ser absorbida directamente por el triptofano, produciendo un intermediario excitado. El radical puede disiparse a través de la transferencia a oxígeno disuelto, produciendo $\bullet\text{O}_2^-$, por antioxidantes o mediante la transferencia de carga. En ausencia de transferencia de carga, el triptofano sufre una abertura del anillo después del ataque por radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) para producir predominantemente N-formilquinurenina y quinurenina (Griffiths, 2000).

Según Rossi et al. (2022), la mayoría de los trabajos anteriores se han centrado en detectar y cuantificar la ditirosina (**Figura III.4.10 B**) que se forma en la dimerización de dos radicales fenoxilo

derivados de la tirosina. Las reacciones secundarias que ocurren entre las cadenas laterales de las proteínas oxidadas y el grupo –SH de las cisteína de la caseína vía adición de Michael a las quinonas formadas a partir de las tirosinas, producen especies glutationiladas o aductos covalentes de proteínas. La ditirosina es una molécula fluorescente que representa una de las modificaciones normales de las proteínas, lo que implica un entrecruzamiento proteína-proteína a través de la unión tirosina-tirosina (ditirosina). Además, la ditirosina se puede encontrar como el producto del estrés oxidativo o nitrativo en una serie de enfermedades como en la placa aterosclerótica, el tejido cerebral del Alzheimer, el plasma sanguíneo humano y la orina (Baptista et al., 2017).

Yildirim et al. (2018) estudiaron los efectos de una variedad de compuestos fenólicos en la estabilidad de la leche y encontraron una mayor estabilidad de la leche descremada después de la adición de extractos de té verde. Además, reportaron una mayor estabilidad de la leche cuando se la fortifica con café, cacao, té, vino tinto, cáscara de coco, hojas de roble. Se informó que la oxidación de compuestos fenólicos a o-quinonas y una mayor interacción con los residuos de aminoácidos podría ser la razón de una mayor estabilización de las micelas de caseína.

Las pectinas PC y PCUS parecieron ser más efectivas ($k \approx 0,053\text{h}^{-1}$) para ralentizar la pérdida de cisteína (grupos –SH) de las proteínas lácteas (**Figura III.4.9 A**) que las pectinas Mes y MesUS ($k = 0,064\text{h}^{-1}$ para ambas pectinas). Este resultado coincidió con una mayor capacidad antioxidante (ensayos DPPH y FRAP) de PC y PCUS pectina (**Tabla II.4.10**), que puede reflejar mayores contenidos de tocoferoles, β -caroteno y luteína (**Tabla II.4.6**), y el mayor contenido de algunos compuestos fenólicos (**Tabla II.4.8**). Se cree que el oxígeno singlete es responsable de la oxidación de la metionina a metional (reacción de tipo II), mientras que la formación de ditirosina es principalmente el resultado del mecanismo de tipo I sin ningún papel significativo del oxígeno singlete (Scheidegger et al., 2010; Baptista et al., 2017).

Zheng y Wang (2001) observaron que hubo una correlación lineal positiva entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de una serie de hierbas las cuales, mediante su estudio, resultaron ser una fuente potencial eficaz de antioxidantes naturales.

Tabla III.4.2. Parámetros cinéticos de degradación fotooxidativa de grupos sulfhidrilo y de formación de carbonilo, ditirosina y N-formilquinurena a partir de leche descremada tal cual o con agregado de 0,5% p/v de pectina extraída de la berenjena (PC, PCUS, Mes y MesUS) luego de expuesta a radiación UV-C en aire a 25°C.

	Leche	Leche-PC	Leche-PCUS	Leche-Mes	Leche-MesUS
$Y = Y_0 \cdot e^{-k \cdot t}$ (cinética de primer orden)					
Sulfhidrilo					
Y_0 (h)	19,35±0,15	19,70±0,17	19,46±0,21	19,15±0,18	19,64±0,20
k (h) ⁻¹	0,079±0,002	0,054±0,003	0,053±0,003	0,064±0,003	0,064±0,003
$t_{1/2}$ (h) ⁻¹	8,80	12,81	13,1	10,82	10,80
R^2	0,9937	0,9843	0,9743	0,9859	0,9846
$Y = Y_0 \cdot e^{k \cdot t}$ (cinética de primer orden)					
Carbonilo					
Y_0 (h)	0,77±0,05	0,74±0,07	0,60±0,04	0,71±0,04	0,77±0,04
k (h) ⁻¹	0,24±0,01	0,14±0,02	0,17±0,01	0,16±0,01	0,136±0,009
$t_{1/2}$ (h) ^a	2,91	5,00	4,02	4,31	5,08
R^2	0,9897	0,8956	0,9658	0,9728	0,9727
$Y(AFU) = Y_{max} \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$ (cinética de asociación de pseudo-primer orden)					
Ditirosina					
$Y_{MAX}(AFU)$	2,61±0,08	1,82±0,12	1,66±0,06	1,79±0,09	2,1±0,2
k (h) ⁻¹	0,59±0,08	0,37±0,06	0,31±0,02	0,35±0,04	0,23±0,04
$t_{1/2}$ (h) ^b	1,18	1,87	2,26	2,00	3,00
R^2	0,9944	0,9893	0,9983	0,9953	0,9927
$Y(AFU) = Y_{max} \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$ (cinética de asociación de pseudo-primer orden)					
N-formilquinurena					
$Y_{MAX}(AFU)$	10,52±7,08	2,87±0,72	3,12±0,60	2,99±0,69	2,66±0,15
k (h) ⁻¹	0,069±0,056	0,20±0,08	0,15±0,04	0,21±0,08	0,26±0,03
$t_{1/2}$ (h) ²	10,04	3,49	4,55	3,38	2,63
R^2	0,9814	0,9669	0,9894	0,9691	0,9965

^aTiempo de vida media ($t_{1/2}$): $t_{1/2} = \ln(2)/k$

^bTiempo de vida media ($t_{1/2}$): $Y = 0.5 \cdot Y_{MAX}$ cuando $t = \ln(2)/k$ ($t_{1/2}$)

III.5. Conclusiones

- Tanto el polvo de berenjena P-P como el polvo P-CC fueron antioxidantes naturales eficientes en el queso vegano untable de castañas de cajú durante el almacenamiento por 30 días a 8°C ($a_w > 0,9600$, $pH \approx 4,75$) cuando se usaron al 5,0% p/p.
- La adición de polvo P-P al 5% p/p en el queso vegano untable de castañas de cajú no modificó el espectro mecánico en el momento inicial del almacenamiento en comparación con el sistema de control, mientras que el agregado de P-CC aumentó ligeramente los módulos elásticos (G') y viscoso (G''), aunque manteniendo la relación entre ellos ($\tan \delta$). Los módulos G' y G'' no cambiaron en el queso vegano untable conteniendo PC durante los 30 días de almacenamiento a 8°C, mientras que ambos módulos disminuyeron ligeramente para el queso con 5% p/p de P-P agregado.
- Los antioxidantes coextraídos en las pectinas de berenjena (PC, PCUS, MES y MesUS) dieron un valor adicional a las pectinas desde un punto de vista tecnológico ya que mostraron actividad antioxidante sobre las proteínas de la leche descremada al protegerlas de la fotooxidación por radiación UV-C (200 a 280nm), especialmente a través de la preservación del triptofano, de la tirosina, de los aminoácidos con cadenas laterales alifáticas y de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína.
- El polvo de berenjena (cáliz, exocarpio y mesocarpio-placenta-núcleo) y las pectinas extraídas de los mismos mostraron ser buenos aditivos en alimentos, los cuales podrían ser agregados en formulaciones para mejorar las propiedades reológicas, organolépticas y nutricionales.

Conclusiones Generales

Se realizaron estudios conducentes a la recuperación de la biomasa residual de la cosecha, industrialización y comercialización del maíz (*Zea mays*) y de la berenjena (*Solanum melongena* L), agregándole valor al convertirla en pectinas antioxidantes y polvos con fibra dietariay antioxidantes, útiles como nutrientes y aditivos alimentarios.

El polvo RIA-PB, obtenido por deshidratación del residuo insoluble en etanol de las brácteas del maíz, estaba compuesto principalmente de polímeros de la pared celular, con bajo contenido de pectina (4,5%), alto contenido de arabinoxilanos (<31,7%) y celulosa (29,8%), además de estar constituido por ácidos ferúlicos. Dada su composición, el RIA-PB fue utilizado para la obtención de pectinas, donde se incluyó una etapa de hidrólisis alcalina por la presencia de los esterres de ácido ferulico para así lograr la liberación de las pectinas. A partir del polvo RIA-PB se logró obtener pectinas (MP y MP-US). A través del tratamiento con ultrasonido (US) y alcalino, seguido de agitación en presencia de la enzima celulasa, se logró obtener MP-US, la cual se caracterizó por tener bajo grado de metilesterificación y una excepcional solubilidad en agua, sin agregación de macromoléculas, según lo observado mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Tanto la pectina MP-US como la pectina MP (obtenida sin tratamiento de US) mostraron alta sensibilidad al ion calcio, formando redes tipo "gel débil" termo-irreversibles incluso con bajos niveles de Ca^{2+} (5mg/g AU). Por otro lado demostraron capacidad para formar quelatos con iones Fe(II), formando redes tipo "gel débil" termo-reversibles. Estas propiedades sugieren la aplicación potencial de estas pectinas como modificadores de textura en alimentos y matrices portadoras de fármacos.

Los polvos preparados a partir de la cáscara y cálices (P-CC) y del resto del fruto de la berenjena (P-P) fueron caracterizados químicamente donde: P-CC exhibió mayores contenidos de pectina y celulosa, así como menor contenido de lignina en comparación con P-P. Esta composición explicaría las mejores propiedades de hidratación de P-CC. Ambos polvos, demostraron propiedades antioxidantes significativas debido a su composición alta en compuestos fenólicos extraíbles, carotenoides y luteína. P-CC se destacó por su mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles, mientras que P-P mostró un alto contenido de ácido cafeoilquínico, relacionado con citotoxicidad. P-CC presentó una antocianina, delfinidina-3-rutinósido, sin citotoxicidad en el rango

de concentración estudiado. Tanto P-P como P-CC demostraron ser eficientes antioxidantes naturales y podrían valorizarse como aditivos alimentarios, mejorando las propiedades reológicas, organolépticas y nutricionales en productos veganos como el análogos de queso, desarrollados a base de frutos secos.

El pretratamiento con ultrasonido de alta potencia causó un mayor daño en la estructura de la pared celular de P-CC en comparación con P-P. Debido al contenido de ácido ferúlico esterificado, los métodos de extracción de pectinas incluyeron una etapa de hidrólisis alcalina (fuerte como el NaOH o suave, con Na₂CO₃) para liberar las pectinas. El pretratamiento con ultrasonido durante 10 minutos para una relación de 10g P-CC o P-P:200mL agua mostró ser la condición más eficiente para la extracción de pectina, logrando un alto rendimiento y bajo consumo de energía. Las pectinas obtenidas fueron principalmente homogalacturónanos (HGs) con bajo grado de metilesterificación y baja proporción de RG-I. El pretratamiento con ultrasonido resultó en pectinas con menor peso molecular y menor polidispersidad. Las pectinas, obtenidas con o sin pretratamiento con ultrasonido, mostraron capacidad antioxidante debido a los compuestos fenólicos coextraídos, junto con niveles bajos de β -caroteno y luteína. Sin agregado de calcio, las pectinas de la berenjena, a concentraciones de 1,50 y 2,0% p/v, exhibieron comportamientos de flujo con umbral de fluencia seguido, en general, de flujo Newtoniano, habiendo formado redes estructuradas en reposo. En presencia de calcio agregado, las pectinas de berenjena se entrecruzaron con calcio, actuando como espesantes inclusive en ausencia de iones calcio. Los antioxidantes coextraídos hicieron que las pectinas mostraran actividad antioxidante sobre las proteínas de la leche descremada, protegiéndolas de la fotooxidación por radiación UV-C.

Las brácteas del maíz y los tejidos desechados de la berenjena pueden ser valorizados eficientemente para la obtención de polvos ricos en fibras y antioxidantes y pectinas antioxidantes útiles que podrían mejorar las características reológicas y nutricionales de los alimentos, destacando su potencial como aditivos alimentarios naturales.

Bibliografía

Agricultural Marketing Resource Center (2021). Eggplant. <https://www.agmrc.org/commodities-products/vegetables/eggplants>. accedido: 11/03/2023.

Agunloye, O. M., Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Ademosun, A. O., Akindahunsi, A. A., Oyagbemi, A. A., ... & Adedapo, A. A. (2019). Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: Mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 450-458.

Ahmad, A., & Khalid, N. (2018). Dietary Fibers in Modern Food Production: A Special Perspective With β -Glucans. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Handbook of Food Bioengineering: Biopolymers for Food Design* (pp. 125-156). Academic Press.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.

Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1), 14-29.

Alessandro, M. S., Lopez, F., & González, M. (2014). Carrot cultivar evaluation in Uco Valley, Mendoza. *Horticultura Argentina*, 33(81), 22-30.

Alharbi, A., Boguslavskiy, A. E., Austin, D., Thiré, N., Wood, D., Hawkins, P., ... & Bhardwaj, R. (2018). Femtosecond laser mass spectrometry and high harmonic spectroscopy of xylene isomers. *Scientific Reports*, 8(1), 3789.

Alvarenga, N., & Sousa, I. (2011). Effect of freezing on the rheological, chemical and colour properties of Serpa cheese. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 80-87.

Alvarez, M. D., Fuentes, R., Guerrero, G., & Canet, W. (2017). Characterization of commercial Spanish hummus formulation: Nutritional composition, rheology, and structure. *International Journal of Food Properties*, 20(4), 845-863.

Amaral, A. B., Silva, M. V. D., & Lannes, S. C. D. S. (2018). Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors—a review. *Food Science and Technology*, 38, 1-15.

Anderson, C. T., & Kieber, J. J. (2020). Dynamic construction, perception, and remodeling of plant cell walls. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 39-69.

Al Nachar, K. (2019). Investigation and measurement of some mineral and vitamins in eggplant fruit calyx, and the possibility of being used as food supplements and alternative medicine. *Journal of Food Nutrition*, 5, 1-10.

Aramburu, A., Bonifazi, E. L., Gerschenson, L. N., Rojas, A. M., & Basanta, M. F. (2020). Sweet cherry (*Prunus avium*) fibers extracted from microwave-and steam-blanched recovered fruits: photo-antioxidant activity in milk proteins. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 24, 100247.

Arruda, H. S., Pereira, G. A., & Pastore, G. M. (2017). Optimization of extraction parameters of total phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (*Araticum*) fruits using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 10, 100-110.

Augusto, P. E., Falguera, V., Cristianini, M., & Ibarz, A. (2012). Rheological behavior of tomato juice: steady-state shear and time-dependent modeling. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1715-1723.

Augusto, P. E., Ibarz, A., & Cristianini, M. (2013). Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Viscoelastic properties and the Cox–Merz rule. *Journal of Food Engineering*, 114(1), 57-63.

Baptista, M. S., Cadet, J., Di Mascio, P., Ghogare, A. A., Greer, A., Hamblin, M. R., ... & Yoshimura, T. M. (2017). Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochemistry and Photobiology*, 93(4), 912-919.

Barber, T. M., Kabisch, S., Pfeiffer, A. F., & Weickert, M. O. (2020). The health benefits of dietary fibre. *Nutrients*, 12(10), 3209.

- Basanta, M. F., de Escalada Plá, M. F., Stortz, C. A., & Rojas, A. M. (2013). Chemical and functional properties of cell wall polymers from two cherry varieties at two developmental stages. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 830-841.
- Basanta, M. F., de Escalada Plá, M. F., Raffo, M. D., Stortz, C. A., & Rojas, A. M. (2014). Cherry fibers isolated from harvest residues as valuable dietary fiber and functional food ingredients. *Journal of Food Engineering*, 126, 149-155.
- Basanta, M. F., Marin, A., De Leo, S. A., Gerschenson, L. N., Erlejman, A. G., Tomás-Barberán, F. A., & Rojas, A. M. (2016). Antioxidant Japanese plum (*Prunus salicina*) microparticles with potential for food preservation. *Journal of Functional Foods*, 24, 287-296.
- Bellmaine, S., Schnellbaecher, A., & Zimmer, A. (2020). Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 160, 696-718.
- Bendicho, C., Lavilla, I., (2013). Extraction/ultrasound extractions. En: Reedijk, J. (Ed.), *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, Amsterdam.
- Bernhardt, D. C., Ponce, N. M., Basanta, M. F., Stortz, C. A., & Rojas, A. M. (2019). Husks of Zea mays as a potential source of biopolymers for food additives and materials' development. *Heliyon*, 5(3).
- Bhargava, N., Mor, R. S., Kumar, K., & Sharanagat, V. S. (2021). Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105293.
- Bhaskar, B., & Ramesh Kumar, P. (2015). Genetically modified (GM) crops face an uncertain future in India: Bt brinjal appraisal—a perspective. *Annals of Plant Sciences*, 4(2), 960-975.
- Bohn, T., Bonet, M. L., Borel, P., Keijer, J., Landrier, J. F., Milisav, I., ... & Dulińska-Litewka, J. (2021). Mechanistic aspects of carotenoid health benefits—where are we now?. *Nutrition Research Reviews*, 34(2), 276-302.
- Braccini, I., & Pérez, S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089-1096.
- Briggs, J. A., Grondin, J. M., & Brumer, H. (2021). Communal living: glycan utilization by the human gut microbiota. *Environmental Microbiology*, 23(1), 15-35.
- Brimberg, U. I., & Kamal-Eldin, A. (2003). On the kinetics of the autoxidation of fats: influence of pro-oxidants, antioxidants and synergists. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(2), 83-91.
- Broxterman, S. E., & Schols, H. A. (2018). Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. *Carbohydrate polymers*, 192, 263-272.
- Canet, W., Jiménez, M. J., Fuentes, R., & Álvarez, M. D. (2015). Formulation development of a new chickpea gel using response surface methodology and instrumental and sensory data. *Journal of Food Process Engineering*, 38(3), 271-289.
- Cann, I., Bernardi, R. C., & Mackie, R. I. (2016). Cellulose degradation in the human gut: *Ruminococcus champanellensis* expands the cellulosome paradigm. *Environmental Microbiology*, 18(2), 307-310.
- Castillo-Zamudio, R. I., Paniagua-Martínez, I., Ortuño-Cases, C., García-Alvarado, M. A., Larrea, V., & Benedito, J. (2021). Use of high-power ultrasound combined with supercritical fluids for microbial inactivation in dry-cured ham. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 67, 102557.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
- Capuano, E. (2017). The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3543-3564.
- Cassidy, A. (2018). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 76-82.
- Castillo, M., Iriando-DeHond, A., Fernández-Gómez, B., Martínez Sáez, N., Rebollo-Hernanz, M., Martín-Cabrejas, M. A., & Farah, A. (2019). Coffee: Consumption and Health Implications. En A. Farah & A. Farah (Eds.), *The Royal Society of Chemistry* (pp. 20-56).

- Catalán, V., Frühbeck, G., & Gómez-Ambrosi, J. (2018). Inflammatory and oxidative stress markers in skeletal muscle of obese subjects. In *Obesity* (pp. 163-189). Academic Press.
- Celi, P., & Gabai, G. (2015). Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 48.
- Celus, M., Kyomugasho, C., Van Loey, A. M., Grauwet, T., & Hendrickx, M. E. (2018). Influence of pectin structural properties on interactions with divalent cations and its associated functionalities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6), 1576-1594.
- Cerri, M., Reale, L., & Zadra, C. (2019). Metabolite storage in *Theobroma cacao* L. seed: Cyto-histological and phytochemical analyses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1599.
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. (2017). Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 161, 118-139.
- Chandel, V., Biswas, D., Roy, S., Vaidya, D., Verma, A., & Gupta, A. (2022). Current advancements in pectin: Extraction, properties and multifunctional applications. *Foods*, 11(17), 2683.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cheng, X., Bi, L., Zhao, Z., & Chen, Y. (2015, August). Advances in enzyme assisted extraction of natural products. En *3rd International conference on material, mechanical and manufacturing engineering (IC3ME 2015)* (pp. 371-375). Atlantis Press.
- Cho, E. H., Jung, H. T., Lee, B. H., Kim, H. S., Rhee, J. K., & Yoo, S. H. (2019). Green process development for apple-peel pectin production by organic acid extraction. *Carbohydrate Polymers*, 204, 97-103.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Delisi, R., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2016). Pectin production and global market. *Agro Food Industry. Hi-Tech*, 27(5), 17-20.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362-372.
- Clifford, M. N. (2000a). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033-1043.
- Clifford, M. N. (2000b). Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Coimbra, M. A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1998). Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 37(3), 241-248.
- Coimbra, M. A., Barros, A., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1999). FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate Research*, 317(1-4), 145-154.
- Colak, N., Kurt-Celebi, A., Gruz, J., Strnad, M., Hayirlioglu-Ayaz, S., Choung, M. G., ... & Ayaz, F. A. (2022). The phenolics and antioxidant properties of black and purple versus white eggplant cultivars. *Molecules*, 27(8), 2410.
- Combo, A. M. M., Dakia, P. A., Kobi, O. H. J. G., & Angaman, D. M. (2020). Investigating Eggplant Fruit (*Solanum* spp.) Cultivated in Côte d'Ivoire for Their Physicochemical and Antioxidant Characteristics. *Food Science and Quality Management*, 102, 1-8.

- Corredor, Y. A. V., & Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 59-72.
- Cosgrove, D. J. (2022). Building an extensible cell wall. *Plant Physiology*, 189(3), 1246-1277.
- Cui, J., Zhao, C., Feng, L., Han, Y., Du, H., Xiao, H., & Zheng, J. (2021). Pectins from fruits: Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 39-54.
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564-578.
- Cuvelier, M. E., Soto, P., Courtois, F., Broyart, B., & Bonazzi, C. (2017). Oxygen solubility measured in aqueous or oily media by a method using a non-invasive sensor. *Food control*, 73, 1466-1473.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), 601-623.
- Dangi, N., Yadav, B. S., & Yadav, R. B. (2020). Pectin and its acid hydrolysate for the modification of hydration, pasting, thermal and rheological properties of barley starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 969-980.
- Das, A. K., Nanda, P. K., Madane, P., Biswas, S., Das, A., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2020). A comprehensive review on antioxidant dietary fibre enriched meat-based functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 323-336.
- de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535.
- de Escalada Pla, M., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2013). Effect of butternut (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) fibres on bread making, quality and staling. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 828-838.
- De Kruij, C. G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 183-188.
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. En E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead publishing.
- de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., de Araujo, F. F., & Pastore, G. M. (2020). A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. *Food chemistry*, 306, 125630.
- Delmas, H., Le, N. T., Barthe, L., & Julcour-Lebigue, C. (2015). Optimization of hydrostatic pressure at varied sonication conditions—power density, intensity, very low frequency—for isothermal ultrasonic sludge treatment. *Ultrasonics sonochemistry*, 25, 51-59.
- Díaz, J. V., Anthon, G. E., & Barret, D. M. (2007). Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: effects of pH, temperature, and degree of methylesterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5131-5136.
- Díaz-Ocampo, R., Sánchez, R., & Franco, J. M. (2014). Rheology of commercial and model borjón jam formulations. *International Journal of Food Properties*, 17(4), 791-805.
- do Nascimento Oliveira, A., de Almeida Paula, D., de Oliveira, E. B., Saraiva, S. H., Stringheta, P. C., & Ramos, A. M. (2018). Optimization of pectin extraction from Ubá mango peel through surface response methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 395-402.
- Dobberstein, D., & Bunzel, M. (2010). Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 8927-8935.
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 429.
- Doublier, J. L., Launay, B., & Cuvelier, G. (1992). Viscoelastic properties of food gels. En M. A. Rao, & J. F. Steffe (Eds.), *Viscoelastic properties of food*. New York: Elsevier Applied Science.

- Dranca, F., & Oroian, M. (2019). Optimization of pectin enzymatic extraction from *malus domestica* 'fálticeni' apple pomace with Celluclast 1.5 L. *Molecules*, 24(11), 2158.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6(3), 44.
- Estévez, M., Díaz-Velasco, S., & Martínez, R. (2022). Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update. *Amino Acids*, 1-15.
- European Food Safety Authority (2010). EFSA Journal, 8(10), 1747. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1747>
- EFSA (2017) Re-evaluation of pectin (E 440i) and amidated pectin (E 440ii) as food additives. *EFSA J* 15(7):4866.
- FAO. (2021). FAOSTAT, Food Supply. Recuperado de <http://faostat.fao.org/site/345/default.aspx> [Consultado el 10 de octubre de 2022].
- Filgueiras, A. V., Capelo, J. L., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2000). Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 53(2), 433-441.
- Filisetti-Cozzi, T. M., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197(1), 157-162.
- Fissore, E. N., Ponce, N. M., Stortz, C. A., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2007). Characterisation of fiber obtained from pumpkin (*Cucumis moschata* Duch.) mesocarp through enzymatic treatment. *Food Science and Technology International*, 13(2), 141-151.
- Fissore, E. N., Ponce, N. M. A., Matkovic, L., Stortz, C. A., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2011). Isolation of pectin-enriched products from red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) wastes: composition and functional properties. *Food Science and Technology International*, 17(6), 517-527.
- Fleurence, J., Massiani, L., Guyader, O., & Mabeau, S. (1995). Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. *Journal of Applied Phycology*, 7, 393-397.
- Flutto, L. (2003). Pectin Properties and determination. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2, 4440-4449.
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & function*, 10(2), 514-528.
- Fraikue, F. B. (2016, August). Unveiling the potential utility of eggplant: a review. En: *Conference Proceedings of INCEDI* (Vol. 1, pp. 883-895).
- Frary, A., Doganlar, S., Daunay, M.C. (2007). Eggplant. In: Kole, C. (eds.), *Vegetables. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, vol 5. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Freitas, L. C., Barbosa, J. R., da Costa, A. L. C., Bezerra, F. W. F., Pinto, R. H. H., & de Carvalho Junior, R. N. (2021). From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products?. *Resources, Conservation and Recycling*, 169, 105466.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 165-186.
- Fry, S. C. (2010). Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Annual plant reviews: plant polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering*, 41, 1-42.
- Fry, S. C. (2011). Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Annual Plant Reviews: Plant Polysaccharides, Biosynthesis and Bioengineering*, Volume 41, 1-42. Chapter 1. Editado por Peter Ulvskov.

- Fuentes-Lemus, E., Silva, E., Leinisch, F., Dorta, E., Lorentzen, L. G., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2018). α - and β -casein aggregation induced by riboflavin-sensitized photo-oxidation occurs via di-tyrosine cross-links and is oxygen concentration dependent. *Food Chemistry*, 256, 119-128.
- Gacetilla Informativa del Sector Agroalimentario. Berenjena - Situación de Mercado, NOVIEMBRE 2007. www.sagpya.mecon.gov.ar/dimeagro consultado 10/2023
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*, 9(5), 455.
- Garcia, A. C., Jesper, S. H., Bailey, N., Skibsted, L. H. (2020) Slow lactate gluconate exchange in calcium complexes during precipitation from supersaturated aqueous solutions. *Food Research International*, 137, 109539.
- Garcia-Perez, J. V., Puig, A., Perez-Munuera, I., Carcel, J. A., & Riera, E. (2010). Kinetic and microstructural changes induced by power ultrasound application on convective drying of eggplant. En: *Proceedings of the 20th International Congress on Acoustics (ICA 2010)*, Sydney, Australia.
- Garcia-Salas, P., Gómez-Caravaca, A. M., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Identification and quantification of phenolic compounds in diverse cultivars of eggplant grown in different seasons by high-performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electrospray-quadrupole-time of flight-mass spectrometry. *Food Research International*, 57, 114-122.
- Gavilighi, H. A., Tabarsa, M., You, S., Surayot, U., & Ghaderi-Ghahfarokhi, M. (2018). Extraction, characterization and immunomodulatory property of pectic polysaccharide from pomegranate peels: Enzymatic vs conventional approach. *International journal of biological macromolecules*, 116, 698-706.
- Gayán, E., Condón, S., & Álvarez, I. (2014). Biological aspects in food preservation by ultraviolet light: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1-20.
- Gerschenson, L. N., Fissore, E. N., Rojas, A. M., Encalada, A. M. I., Zukowski, E. F., & Coelho, R. A. H. (2021). Pectins obtained by ultrasound from agroindustrial by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106799.
- Giummarella, N., Pu, Y., Ragauskas, A. J., Lawoko, M. (2019). A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chemistry*, 21, 1573-1595.
- Golbargi, F., Gharibzahedi, S. M. T., Zoghi, A., Mohammadi, M., & Hashemifesharaki, R. (2021). Microwave-assisted extraction of arabinan-rich pectic polysaccharides from melon peels: optimization, purification, bioactivity, and techno-functionality. *Carbohydrate Polymers*, 256, 117522.
- González Aguilar, G., Blancas Bénitez, F., & Sáyago-Ayerdi, S. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84-88.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and Chemistry*, 81(1), 89.
- Griffiths, H. R. (2000). Antioxidants and protein oxidation. *Free Radical Research*, 33(Supple), S47-S58.
- Gürbüz, N., Uluişik, S., Frary, A., Frary, A., & Doğanlar, S. (2018). Health benefits and bioactive compounds of eggplant. *Food Chemistry*, 268, 602-610.
- Güzel, M., & Akpınar, Ö. (2019). Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. *Food and Bioproducts Processing*, 115, 126-133.
- Hamidon, N. H., & Zaidel, D. N. A. (2017). Effect of extraction conditions on pectin yield extracted from sweet potato peels residues using hydrochloric acid. *Chemical Engineering Transactions*, 56, 979-984.
- Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits—an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044.
- Harte, F. M., Montes, C., Adams, M., & San Martin-Gonzalez, M. F. (2007). Solubilized micellar calcium induced low methoxyl-pectin aggregation during milk acidification. *Journal of dairy science*, 90(6), 2705-2709.

- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2019). Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19683-19708.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food Science and Technology*, 1, 163-187.
- Hecht, A. A., & Neff, R. A. (2019). Food rescue intervention evaluations: A systematic review. *Sustainability*, 11(23), 6718.
- Hellwig, M. (2019). The chemistry of protein oxidation in food. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(47), 16742-16763.
- Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*, 8(2), 172-184.
- Hotchkiss, A. T., Savary, B. J., Cameron, R. G., Chau, H. K., Brouillette, J., Luzio, G. A., & Fishman, M. L. (2002). Enzymatic modification of pectin to increase its calcium sensitivity while preserving its molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2931-2937.
- Huang, H., & Huang, G. (2020). Extraction, separation, modification, structural characterization, and antioxidant activity of plant polysaccharides. *Chemical Biology & Drug Design*, 96(5), 1209-1222.
- Idrovo Encalada, A. M. I., Basanta, M. F., Fissore, E. N., De'Nobili, M. D., & Rojas, A. M. (2016). Carrot fiber (CF) composite films for antioxidant preservation: Particle size effect. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1041-1051.
- Idrovo Encalada, A. M. I., Pérez, C. D., Calderón, P. A., Zukowski, E., Gerschenson, L. N., Rojas, A. M., & Fissore, E. N. (2019a). High-power ultrasound pretreatment for efficient extraction of fractions enriched in pectins and antioxidants from discarded carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Engineering*, 256, 28-36.
- Idrovo Encalada, A. M. I., Pérez, C. D., Flores, S. K., Rossetti, L., Fissore, E. N., & Rojas, A. M. (2019b). Antioxidant pectin enriched fractions obtained from discarded carrots (*Daucus carota* L.) by ultrasound-enzyme assisted extraction. *Food chemistry*, 289, 453-460.
- Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). "Weak gel"-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated κ-carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4436-4441.
- Ishii, K. (2015). Relationship between Pectic Substances and Strand Separation of Cooked Spaghetti Squash. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/233225174.pdf>
- Ishwarya S, P., & Nisha, P. (2022). Advances and prospects in the food applications of pectin hydrogels. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 62(16), 4393-4417
- Iwashina, T. (2015). Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. *Natural product communications*, 10(3).
- Jaeschke, D. P., Menegol, T., Rech, R., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2016). Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. *Process Biochemistry*, 51(10), 1636-1643.
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food chemistry*, 175, 556-567.
- Jaramillo, Á., Briones, L., Andrews, M., Arredondo, M., Olivares, M., Brito, A., & Pizarro, F. (2015). Effect of phytic acid, tannic acid and pectin on fasting iron bioavailability both in the presence and absence of calcium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 112-117.
- Jara-Rojas, R., Guerra, A., Adasme-Berrios, C., Engler, A., & Valdes, R. (2015). Harvest Labor Quality and Productivity: Case study of cherry growing in Chile. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37, 423-431.
- Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., & Knox, J. P. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment*, 26(7), 977-989.
- Jiang, B., Li, W., Hu, X., Wu, J., & Shen, Q. (2015). Rheology of mung bean starch treated by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Properties*, 18(1), 81-92.

- Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Bimbela, F., Gandía, L. M., & Ancín-Azpilicueta, C. (2020). Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(20), 2061-2108.
- Kalogeropoulos, N., Mylona, A., Chiou, A., Ioannou, M. S., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Retention and distribution of natural antioxidants (α -tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6), 1008-1017.
- Kamble, P. B., Gawande, S., & Patil, T. S. (2017). Extraction of pectin from unripe banana peel. *International Research Journal of Engineering and Technology*, 4(7), 2259-2264.
- Karimi, A., Kazemi, M., Samani, S. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Bioactive compounds from by-products of eggplant: Functional properties, potential applications and advances in valorization methods. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 518-531.
- Kaseke, T., Opara, U. L., & Fawole, O. A. (2020). Fatty acid composition, bioactive phytochemicals, antioxidant properties and oxidative stability of edible fruit seed oil: Effect of preharvest and processing factors. *Heliyon*, 6(9).
- Katsaros, G., Tsoukala, M., Giannoglou, M., & Taoukis, P. (2020). Effect of storage on the rheological and viscoelastic properties of mayonnaise emulsions of different oil droplet size. *Heliyon*, 6(12).
- Kesten, C., Wallmann, A., Schneider, R., McFarlane, H. E., Diehl, A., Khan, G. A., ... & Persson, S. (2019). The companion of cellulose synthase 1 confers salt tolerance through a Tau-like mechanism in plants. *Nature Communications*, 10(1), 857.
- Khamsucharit, P., Laohaphatanalert, K., Gavinlertvatana, P., Sriroth, K., & Sangseethong, K. (2018). Characterization of pectin extracted from banana peels of different varieties. *Food Science and Biotechnology*, 27, 623-629.
- Khedmat, L., Izadi, A., Mofid, V., & Mojtahedi, S. Y. (2020). Recent advances in extracting pectin by single and combined ultrasound techniques: A review of techno-functional and bioactive health-promoting aspects. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115474.
- Khodaei, N., & Karboune, S. (2013). Extraction and structural characterisation of rhamnogalacturonan I-type pectic polysaccharides from potato cell wall. *Food Chemistry*, 139(1-4), 617-623.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779.
- Kirby, A. R., MacDougall, A. J., & Morris, V. J. (2008). Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 640-647.
- Knott, M., Ani, M., Kroener, E., & Diehl, D. (2022). Effect of changing chemical environment on physical properties of maize root mucilage. *Plant and Soil*, 478(1-2), 85-101.
- Kofod, L. V., Mathiasen, T. E., Heldt-Hansen, H. P., & Dalbøge, H. (1995). Application of cloned monocomponent carbohydrases for modification of plant materials. In S. B. Petersen, B. Svensson, & S. Pedersen (Eds.), *Progress in Biotechnology* (Vol. 10, pp. 321-342). Elsevier.
- Kumar, S., Konwar, J., Purkayastha, M. D., Kalita, S., Mukherjee, A., & Dutta, J. (2023). Current progress in valorization of food processing waste and by-products for pectin extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124332.
- Kyomugasho, C., Christiaens, S., Van de Walle, D., Van Loey, A. M., Dewettinck, K., & Hendrickx, M. E. (2016). Evaluation of cation-facilitated pectin-gel properties: Cryo-SEM visualisation and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 61, 172-182.
- Labuza, T. P., & Dugan Jr, L. R. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2(3), 355-405.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969-978.

- Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Fundamentals of ultrasound-assisted extraction. In *Water extraction of bioactive Compounds* (pp. 291-316). Elsevier.
- Lee, M. W., Hung, C. L., Cheng, J. C., & Wang, Y. J. (2005). A new anti-adhesion film synthesized from polygalacturonic acid with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide crosslinker. *Biomaterials*, 26(18), 3793-3799.
- Lee, S. Y., Yim, D. G., Kim, O. Y., Kang, H. J., Kim, H. S., Jang, A., ... & Hur, S. J. (2020). Overview of the effect of natural products on reduction of potential carcinogenic substances in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 568-579.
- Li, D. Q., Li, J., Dong, H. L., Li, X., Zhang, J. Q., Ramaswamy, S., & Xu, F. (2021). Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 49-65.
- Li, G., Wang, F., Wang, M. M., Tang, M. T., Zhou, T., & Gu, Q. (2022). Physicochemical, structural and rheological properties of pectin isolated from citrus canning processing water. *International Journal of Biological Macromolecules*, 195, 12-21.
- Li, J., Zhang, L., Li, J. F., & Li, D. Q. (2019). Comparative studies of combined influence of variables on the esterification degree of pectin extracted by sulfuric acid and citric acid. *Advances in Polymer Technology*, 2019, 1-8.
- Liang, L. I., & Luo, Y. (2020). Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 391-403.
- Liang, W. L., Liao, J. S., Qi, J. R., Jiang, W. X., & Yang, X. Q. (2022). Physicochemical characteristics and functional properties of high methoxyl pectin with different degree of esterification. *Food Chemistry*, 375, 131806.
- Liao, J., Qu, B., Liu, D., & Zheng, N. (2015). New method to enhance the extraction yield of rutin from *Sophora japonica* using a novel ultrasonic extraction system by determining optimum ultrasonic frequency. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 110-116.
- Liu, X., Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. (2020). Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols: Effect of molecular internal structure. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3574-3617.
- Löfgren, C., Guillotin, S., Evenbratt, H., Schols, H., & Hermansson, A. M. (2005). Effects of calcium, pH, and blockiness on kinetic rheological behavior and microstructure of HM pectin gels. *Biomacromolecules*, 6(2), 646-652.
- Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., & Cuypers, A. (2017). Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 1867.
- Lopresti, A. L. (2020). The effects of psychological and environmental stress on micronutrient concentrations in the body: a review of the evidence. *Advances in Nutrition*, 11(1), 103-112.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lu, J., Li, J., Jin, R., Li, S., Yi, J., & Huang, J. (2019). Extraction and characterization of pectin from *Premna microphylla* Turcz leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 323-328.
- Ludvíková, L., Stacko, P., Sperry, J., & Klán, P. (2018). Photosensitized cross-linking of tryptophan and tyrosine derivatives by rose Bengal in aqueous solutions. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(18), 10835-10844.
- Maestri, D., Cittadini, M. C., Bodoira, R., & Martínez, M. (2020). Tree nut oils: Chemical profiles, extraction, stability, and quality concerns. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(6), 1900450.
- Mamman, A. S., Lee, J. M., Kim, Y. C., Hwang, I. T., Park, N. J., Hwang, Y. K., ... & Hwang, J. S. (2008). Furfural: Hemicellulose/xyloxyderived biochemical. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation For a Sustainable Economy*, 2(5), 438-454.
- Mamvura, T. A., Paterson, A. E., & Iyuke, S. E. (2018). Energy changes during use of high-power ultrasound on food grade surfaces. *South African Journal of Chemical Engineering*, 25(1), 62-73.

- Mao, G., Wu, D., Wei, C., Tao, W., Ye, X., Linhardt, R. J., ... & Chen, S. (2019). Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste: Targeting rhamnogalacturonan I. *Trends in Food Science & Technology*, 94, 65-78.
- Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Dubey, K. K., & Singhal, R. S. (2019). Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 25, 62-72.
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Brnčić, S. R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 28-37.
- Marreto, R. N., Ramos, M. F., Silva, E. J., de Freitas, O., & de Freitas, L. A. (2013). Impact of cross-linking and drying method on drug delivery performance of casein-pectin microparticles. *AAPS PharmSciTech*, 14, 1227-1235.
- Marozzene, A., & De Kruif, C. G. (2000). Interaction of pectin and casein micelles. *Food hydrocolloids*, 14(4), 391-394.
- Marry, M., Roberts, K., Jopson, S. J., Huxhamc, I. M., Jarvis, M. C., Corsar, J., Robertson, E., & McCann, M. C. (2006). Cell-cell adhesion in fresh sugar-beet root parenchyma requires both pectin esters and calcium cross-links. *Physiologia Plantarum*, 126, 243-256.
- Martínez, S. L., Fornaris, G. J., Rivera, L. E., Lugo, M. D. L., Armstrong, A., Cabrera, I., ... & Irizarry, M. (2006). Conjunto Tecnológico para la Producción de Berenjena. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.
- May, C. D. (1990). Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12(1), 79-99.
- Mendoza, J., Pina, F., Basílio, N., Guimarães, M., de Freitas, V., & Cruz, L. (2018). Extending the stability of red and blue colors of malvidin-3-glucoside-lipophilic derivatives in the presence of SDS micelles. *Dyes and Pigments*, 151, 321-326.
- Meyer, R. S., Whitaker, B. D., Little, D. P., Wu, S. B., Kennelly, E. J., Long, C. L., & Litt, A. (2015). Parallel reductions in phenolic constituents resulting from the domestication of eggplant. *Phytochemistry*, 115, 194-206.
- Miazek, K., Beton, K., Śliwińska, A., & Brożek-Pluska, B. (2022). The Effect of β -Carotene, Tocopherols and Ascorbic Acid as Anti-Oxidant Molecules on Human and Animal In Vitro/In Vivo Studies: A Review of Research Design and Analytical Techniques Used. *Biomolecules*, 12(8), 1087.
- Micard, V., Renard, C. M. G. C., & Thibault, J. F. (1994). Studies on enzymic release of ferulic acid from sugar-beet pulp. *LWT-Food Science and Technology*, 27(1), 59-66.
- Minzanova, S. T., Mironov, V. F., Arkhipova, D. M., Khabibullina, A. V., Mironova, L. G., Zakirova, Y. M., & Milyukov, V. A. (2018). Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: A review. *Polymers*, 10(12), 1407.
- Miraliakbari, H., & Shahidi, F. (2008). Oxidative stability of tree nut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4751-4759.
- Miyada, T., Nakajima, A., & Ebihara, K. (2011). Iron bound to pectin is utilised by rats. *British Journal of Nutrition*, 106(1), 73-78.
- Moore, J. P., Farrant, J. M., & Driouich, A. (2008). A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signaling & Behavior*, 3(2), 102-104.
- Moorthy, I. G., Maran, J. P., Muneeswari, S., Naganyashree, S., & Shivamathi, C. S. (2015). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1323-1328.
- Morris, E. R., Powell, D. A., Gidley, M. J., & Rees, D. A. (1982). Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of Molecular Biology*, 155(4), 507-516.
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., ... & Woutersen, R. A. (2017). Re-evaluation of pectin (E 440i) and amidated pectin (E 440ii) as food additives. *EFSA Journal*, 15(7), e04866.
- Murakami, A. (2014). Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 557, 3-10.

- Muresan, V., Danthine, S., Racolta, E., Muste, S., & Blecker, C. (2014). The influence of particle size distribution on sunflower tahini rheology and structure. *Journal of Food Process Engineering*, 37(4), 411-426.
- Nabilah, U. U., Sitanggang, A. B., & Purnomo, E. H. (2021). Rheological method for determination of critical concentration of pectin dispersion—A review. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology*, 45(2), 180-202.
- Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, 309-330.
- Naeem, M. Y., & Ugur, S. (2019). Nutritional content and health benefits of eggplant. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7, 31-36.
- Nascimento Oliveira, A., de Almeida Paula, D., de Oliveira, E. B., Saraiva, S. H., Stringheta, P. C., & Ramos, A. M. (2018). Optimization of pectin extraction from Ubá mango peel through surface response methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 395-402.
- Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Chapter 6 - Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. En M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi, & M. Atarod (Eds.), *Interface Science and Technology* (Vol. 28, pp. 199-322). Elsevier.
- Nateghi, L., Zarei, F., & Zarei, M. (2022). Optimize the extraction conditions of pectin extracted from Saveh pomegranate peels. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, (Articles in Press).
- Nath, P. C., Ojha, A., Debnath, S., Sharma, M., Nayak, P. K., Sridhar, K., & Inbaraj, B. S. (2023). Valorization of Food Waste as Animal Feed: A Step towards Sustainable Food Waste Management and Circular Bioeconomy. *Animals*, 13(8), 1366.
- Naumenko, I. V., & Phillipov, M. P. (1992). Colorimetric method for determination of acetyl groups in pectic substances. *Akademi Nauk Republi Moldova Biologi i Khimie Nauki*, 1, 56-59.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of biological Chemistry*, 153(2), 375-380.
- Nemudzivhadi, V., & Masoko, P. (2014). In vitro assessment of cytotoxicity, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) leaf extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Neto, M. L., Agra, K. L., Suassuna Filho, J., & Jorge, F. E. (2018). TDDFT calculations and photoacoustic spectroscopy experiments used to identify phenolic acid functional biomolecules in Brazilian tropical fruits in natura. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 193, 249-257.
- Ng, A., Parr, A. J., Ingham, L. M., Rigby, N. M., & Waldron, K. W. (1998). Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* Cv. Amstrong) during maturation and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2933-2939.
- Noreen, A., Akram, J., Rasul, I., Mansha, A., Yaqoob, N., Iqbal, R., ... & Zia, K. M. (2017). Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 254-272.
- Ojha, S., Bußler, S., & Schlüter, O. K. (2020). Food waste valorisation and circular economy concepts in insect production and processing. *Waste Management*, 118, 600-609.
- Ooi, J. K., Woon, K. S., & Hashim, H. (2021). A multi-objective model to optimize country-scale municipal solid waste management with economic and environmental objectives: A case study in Malaysia. *Journal of Cleaner Production*, 316, 128366.
- Owen, J. L., Kent, L. M., Ralet, M. C., Cameron, R. G., & Williams, M. A. K. (2017). A tale of two pectins: Diverse fine structures can result from identical processive PME treatments on similar high DM substrates. *Carbohydrate Polymers*, 168, 365-373.
- Pacheco, M. T., Villamiel, M., Moreno, R., & Moreno, F. J. (2019). Structural and rheological properties of pectins extracted from industrial sugar beet by-products. *Molecules*, 24(3), 392.

- Padayachee, A., Day, L., Howell, K., & Gidley, M. J. (2017). Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 59-81.
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S., & Davies, M. J. (2012). Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(1), 38-53.
- Parr, A. J., Ng, A., & Waldron, K. W. (1997). Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 7, 2468-2471.
- Perez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1-2), 109-121.
- Pérez-Gálvez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants*, 9(6), 505.
- Piaskowski, J., Hardner, C., Cai, L., Zhao, Y., Lezzoni, A., & Peace, C. (2018). Genomic heritability estimates in sweet cherry reveal non-additive genetic variance is relevant for industry-prioritized traits. *BMC Genetics*, 19(1), 1-16.
- Picot-Allain, M. C. N., Ramasawmy, B., & Emmambux, M. N. (2022). Extraction, characterisation, and application of pectin from tropical and sub-tropical fruits: a review. *Food Reviews International*, 38(3), 282-312.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control*, 31(2), 593-606.
- Powell, D. A., Morris, E. R., Gidley, M. J., & Rees, D. A. (1982). Conformations and interactions of pectins: II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *Journal of Molecular Biology*, 155(4), 517-531.
- Presello, D. A., Giménez, F. J., & Ferraguti, F. J. (2022). La producción de maíz en Argentina. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 14(1).
- Puig, A., Perez-Munuera, I., Carcel, J. A., Hernando, I., & Garcia-Perez, J. V. (2012). Moisture loss kinetics and microstructural changes in eggplant (*Solanum melongena* L.) during conventional and ultrasonically assisted convective drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 624-632.
- Purcell, J. M., & Fishman, M. L. (1987). Dissociation of dissolved pectins: Fourier-transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 159(2), 185-190.
- Qiao, L., Ye, X., Sun, Y., Ying, J., Shen, Y., & Chen, J. (2013). Sonochemical effects on free phenolic acids under ultrasound treatment in a model system. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1017-1025.
- Raghavendra, S. N., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Tharanathan, R. N. (2004). Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *European Food Research and Technology*, 218, 563-567.
- Ralet, M. C., Dronnet, V., Buchholt, H. C., & Thibault, J. F. (2001). Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*, 336(2), 117-125.
- Ralph, J., Lapierre, C., & Boerjan, W. (2019). Lignin structure and its engineering. *Current opinion in biotechnology*, 56, 240-249.
- Razavi, S. M. A., & Irani, M. (2019). Rheology of food gum. *Bioactive molecules in food. Reference Series in Phytochemistry*. Cham: Springer, 1959-85.
- Renard, C. M., Watrelot, A. A., & Le Bourvellec, C. (2017). Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 43-51.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rico, R., Bulló, M., & Salas-Salvadó, J. (2016). Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin. *Food Science & Nutrition*, 4(2), 329-338.

- Rizzi, L. G. (2017). On the relationship between the plateau modulus and the threshold frequency in peptide gels. *The Journal of Chemical Physics*, 147(24).
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Robertson, J. A., de Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., & Thibault, J. F. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. *LWT-Food Science and Technology*, 33(2), 72-79.
- Rolin, C., & de Vries, J. O. O. P. (2012). Copenhagen Pectin, DK-4623 Lille Skensved, Denmark. *Food Gels*, 401.
- Rosa-Martínez, E., García-Martínez, M. D., Adalid-Martínez, A. M., Pereira-Dias, L., Casanova, C., Soler, E., ... & Prohens, J. (2021). Fruit composition profile of pepper, tomato and eggplant varieties grown under uniform conditions. *Food Research International*, 147, 110531.
- Rossi, C., Fuentes-Lemus, E., & Davies, M. J. (2022). Reaction of cysteine residues with oxidized tyrosine residues mediates cross-linking of photo-oxidized casein proteins. *Food Chemistry*, 385, 132667.
- Rouf Shah, T., Prasad, K., & Kumar, P. (2016). Maize—A potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1166995.
- Roumani, M., Duval, R. E., Ropars, A., Risler, A., Robin, C., & Larbat, R. (2020). Phenolamides: Plant specialized metabolites with a wide range of promising pharmacological and health-promoting interests. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110762.
- Roy, P., Mohanty, A. K., Dick, P., & Misra, M. (2023). A review on the challenges and choices for food waste valorization: Environmental and economic impacts. *ACS Environmental Au*, 3(2), 58-75.
- Ruiz Diaz, D. A., Sawyer, J. E., & Mallarino, A. P. (2008). Poultry manure supply of potentially available nitrogen with soil incubation. *Agronomy Journal*, 100(5), 1310-1317.
- Saeed, F., Hussain, M., Arshad, M. S., Afzaal, M., Munir, H., Imran, M., ... & Anjum, F. M. (2021). Functional and nutraceutical properties of maize bran cell wall non-starch polysaccharides. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 233-248.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512-531.
- SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos). (2007, noviembre). Berenjena - Situación de Mercado, NOVIEMBRE 2007. Recuperado de <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/dimeagro> [Consultado en octubre de 2022].
- Saini, P., Islam, M., Das, R., Shekhar, S., Sinha, A. S. K., & Prasad, K. (2023). Wheat bran as potential source of dietary fiber: Prospects and challenges. *Journal of Food Composition and Analysis*, 116, 105030.
- Saini, R. K., Prasad, P., Lokesh, V., Shang, X., Shin, J., Keum, Y. S., & Lee, J. H. (2022). Carotenoids: Dietary sources, extraction, encapsulation, bioavailability, and health benefits—A review of recent advancements. *Antioxidants*, 11(4), 795.
- San José, R., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., & Prohens, J. (2014). Eggplant fruit composition as affected by the cultivation environment and genetic constitution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13), 2774-2784.
- Santos, H. M., Lodeiro, C., & Capelo-Martínez, J. L. (2009). Ultrasonic energy as a tool for sample treatment for the analysis of elements and elemental speciation. *Ultrasound in Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 17-54.
- Sasikala, V., Rooban, B. N., Priya, S. S., Sahasranamam, V., & Abraham, A. (2010). Moringa oleifera prevents selenite-induced cataractogenesis in rat pups. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 26(5), 441-447.
- Saulite, L., Jekabsons, K., Klavins, M., Muceniece, R., & Riekstina, U. (2019). Effects of malvidin, cyanidin and delphinidin on human adipose mesenchymal stem cell differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. *Phytomedicine*, 53, 86-95.

- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Scheidegger, D., Pecora, R. P., Radici, P. M., & Kivatinitz, S. C. (2010). Protein oxidative changes in whole and skim milk after ultraviolet or fluorescent light exposure. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5101-5109.
- Segneanu, A. E., Velciov, S. M., Olariu, S., Cziplu, F., Damian, D., & Grozescu, I. (2017). Bioactive molecules profile from natural compounds. *Amino Acid—New Insights and Roles in Plant and Animal*; Asao, T., Ed, 209-228.
- Serial, M. R., Arnaudov, L. N., Stoyanov, S., Dijkman, J. A., Terenzi, C., & van Duynhoven, J. P. (2022). Non-invasive rheo-MRI study of egg yolk-stabilized emulsions: Yield stress decay and protein release. *Molecules*, 27(10), 3070.
- Shah, S. R., Ukaegbu, C. I., Hamid, H. A., & Alara, O. R. (2018). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the stems of *Flammulina velutipes* and *Hypsizygus tessellatus* (white and brown var.) extracted with different solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1947-1961.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Shahidi, F., & Hossain, A. (2022). Role of lipids in food flavor generation. *Molecules*, 27(15), 5014.
- Shakerardekani, A., Karim, R., Ghazali, H. M., & Chin, N. L. (2013). Textural, rheological and sensory properties and oxidative stability of nut spreads—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 4223-4241.
- Sharma, M., & Kaushik, P. (2021). Biochemical composition of eggplant fruits: A review. *Applied Sciences*, 11(15), 7078.
- Shea, E. M., & Carpita, N. C. (1988). Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *Journal of Chromatography A*, 445, 424-428.
- Shi, Q., Zou, M. Y., Wang, J. H., Song, M. M., Xiong, S. Q., & Liu, Y. (2022). Ultrasonic effects on molecular weight degradation, physicochemical and rheological properties of pectin extracted from *Premna microphylla* Turcz. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 1065-1076.
- Shin, A., & Kashyap, P. C. (2023). Promote or Prevent? Gut Microbial Function and Immune Status May Determine the Effect of Fiber in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 164(2), 182-184.
- Sinanoglou, V. J., Kavga, A., Strati, I. F., Sotiroidis, G., Lantzouraki, D., & Zoumpoulakis, P. (2019). Effects of infrared radiation on eggplant (*Solanum melongena* L.) greenhouse cultivation and fruits' phenolic profile. *Foods*, 8(12), 630.
- Singh, A. P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G. S., & Pasakdee, S. (2009). Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*, 114(3), 955-961.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- Stoddart, R. W., Spires, I. T., & Tipton, K. F. (1969). Solution properties of polygalacturonic acid. *Biochemical Journal*, 114(4), 863-870.
- Stribling, P., & Ibrahim, F. (2023). Dietary fibre definition revisited-The case of low molecular weight carbohydrates. *Clinical Nutrition ESPEN*.
- Stuart, T. (2009). *Waste: Uncovering the global food scandal*. WW Norton & Company.
- Stuble, S. J., Cayre, O. J., Murray, B. S., & Torres, I. C. (2022). Pectin-based microgels for rheological modification in the dilute to concentrated regimes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 628, 684-695.
- Subiria-Cueto, R., Coria-Oliveros, A. J., Wall-Medrano, A., Rodrigo-Garcia, J., González-Aguilar, G. A., Martínez-Ruiz, N. D. R., & Alvarez-Parrilla, E. (2021). Antioxidant dietary fiber-based bakery products: a new alternative for using plant-by-products. *Food Science and Technology*, 42.
- Sulli, M., Barchi, L., Toppino, L., Diretto, G., Sala, T., Lanteri, S., ... & Giuliano, G. (2021). An eggplant recombinant inbred population allows the discovery of metabolic QTLs controlling fruit nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*, 12, 638195.

- Sun, J. X., Sun, R., Sun, X. F., & Su, Y. (2004). Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research*, 339(2), 291-300.
- Sun, T., Rao, S., Zhou, X., & Li, L. (2022). Plant carotenoids: Recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, 2(1), 3.
- Tan, X., Li, K., Wang, Z., Zhu, K., Tan, X., & Cao, J. (2019). A review of plant vacuoles: formation, located proteins, and functions. *Plants*, 8(9), 327.
- Tanchev, S. S., Ruskov, P. J., & Timberlake, C. F. (1970). The anthocyanins of Bulgarian aubergine (*Solanum melongena*). *Phytochemistry*, 9, 1681-2.
- Tchonkouang, R. D., Onyeaka, H., & Miri, T. (2023). From Waste to Plate: Exploring the Impact of Food Waste Valorisation on Achieving Zero Hunger. *Sustainability*, 15(13), 10571.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., & Rao, M. A. (1997). Chemistry and uses of pectin—A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(1), 47-73.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Torkova, A. A., Lisitskaya, K. V., Filimonov, I. S., Glazunova, O. A., Kachalova, G. S., Golubev, V. N., & Fedorova, T. V. (2018). Physicochemical and functional properties of *Cucurbita maxima* pumpkin pectin and commercial citrus and apple pectins: A comparative evaluation. *PLoS one*, 13(9), e0204261.
- Torres-Gallo, R., Bayuelo-Bonilla, S., Carpio-Ortiz, L., Barreto-Rodríguez, G., & Tirado, D. F. (2022). High-intensity ultrasound-assisted extraction of pectin from mango wastes at different maturity. *International Journal of Food Science*, 2022.
- Tuso, P. J., Ismail, M. H., Ha, B. P., & Bartolotto, C. (2013). Nutritional update for physicians: plant-based diets. *The Permanente Journal*, 17(2), 61-66.
- Ullah, S., Hussain, S., Nadeem, A., & Fareed, A. (2022). Distribution of *Bipolaris maydis* in southern Khyber Pakhtunkhwa (KP)—Pakistan and estimation of yield losses in maize crop. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 55(19), 2200-2217.
- Umaña, M., Calahorra, M., Eim, V., Rosselló, C., & Simal, S. (2022). Measurement of microstructural changes promoted by ultrasound application on plant materials with different porosity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 88, 106087.
- Urias-Orona, V., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millán, E., Gardea, A. A., & Ramírez-Wong, B. (2010). A novel pectin material: extraction, characterization and gelling properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(10), 3686-3695.
- Vaahtera, L., Schulz, J., & Hamann, T. (2019). Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment. *Nature Plants*, 5(9), 924-932.
- Vaidyanathan, S. & Bunzel, M. (2012). Development and application of a methodology to determine free ferulic acid and ferulic acid ester-linked to different types of carbohydrates in cereal products. *Cereal Chemistry*, 89 (5), 247-254.
- Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J., & Boerjan, W. (2019). Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 230-239.
- Vilgis, T. A. (2015). Soft matter food physics—the physics of food and cooking. *Reports on Progress in Physics*, 78(12), 124602.
- von Mollendorff, L. D., De Villiers, O. T., Jacobs, G., & Westraad, I. (1993). Molecular characteristics of pectic constituents in relation to firmness, extractable juice, and woolliness in nectarines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(1), 77-80.
- Morandi Vuolo, M., Silva Lima, V., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In M. R. S. Campos (Ed.), *Bioactive Compounds* (pp. 33-50). Woodhead Publishing.

- Waldron, K. W., Ng, A., Parker, M. L., & Parr, A. J. (1997). Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2), 221-228.
- Wan, L., Chen, Q., Huang, M., Liu, F., & Pan, S. (2019). Physicochemical, rheological and emulsifying properties of low methoxyl pectin prepared by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic, conventional enzymatic, and alkaline de-esterification: A comparison study. *Food Hydrocolloids*, 93, 146-155.
- Wandee, Y., Uttapap, D., & Mischnick, P. (2019). Yield and structural composition of pomelo peel pectins extracted under acidic and alkaline conditions. *Food Hydrocolloids*, 87, 237-244.
- Wang, W., Chen, W., Zou, M., Lv, R., Wang, D., Hou, F., ... & Liu, D. (2018). Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. *Journal of Food Engineering*, 234, 98-107.
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., ... & Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food chemistry*, 178, 106-114.
- Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.
- Winter, M., & Herrmann, K. (1986). Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(4), 616-620.
- Wood, P., & Siddiqui, I. R. (1971). Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry*, 39(2), 418-428.
- Wu, S. B., Meyer, R. S., Whitaker, B. D., Litt, A., & Kennelly, E. J. (2013). A new liquid chromatography–mass spectrometry-based strategy to integrate chemistry, morphology, and evolution of eggplant (*Solanum*) species. *Journal of Chromatography A*, 1314, 154-172.
- Wu, X., & Prior, R. L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization– tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 3101-3113.
- Yan, Y., Liu, N., Hou, N., Dong, L., & Li, J. (2017). Chlorogenic acid inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 46, 68-73.
- Yang, B., Kealey, K., Chen, J., & Mis Solval, K. (2022). Developing microencapsulated powders containing polyphenols and pectin extracted from Georgia-grown pomegranate peels. *LWT*, 154, 112644.
- Yang, J. S., Mu, T. H., & Ma, M. M. (2019). Optimization of ultrasound-microwave assisted acid extraction of pectin from potato pulp by response surface methodology and its characterization. *Food Chemistry*, 289, 351-359.
- Yang, X., Nisar, T., Hou, Y., Gou, X., Sun, L., & Guo, Y. (2018). Pomegranate peel pectin can be used as an effective emulsifier. *Food Hydrocolloids*, 85, 30-38.
- Yildirim-Elikoglu, S., & Erdem, Y. K. (2018). Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry. *Food Reviews International*, 34(7), 665-697.
- Yüceer, M., İlyasoğlu, H., & Özçelik, B. (2016). Comparison of flow behavior and physicochemical characteristics of low-cholesterol mayonnaises produced with cholesterol-reduced egg yolk. *Journal of Applied Poultry Research*, 25(4), 518-527.
- Zacheo, G., Cappello, M. S., Gallo, A., Santino, A., & Cappello, A. R. (2000). Changes associated with post-harvest ageing in almond seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 33(6), 415-423.
- Zaharieva, M. M., Dimitrova, L. L., Philipov, S., Nikolova, I., Vilhelmova, N., Grozdanov, P., Nikolova, N., Popova, M., Bankova, V., Konstantinov, S. M., Zheleva-Dimitrova, D., & Najdenski, H. M. (2021). In vitro antineoplastic and antiviral activity and in vivo toxicity of *Geum urbanum* L. extracts. *Molecules*, 27(1), 245.

- Zanella, K., & Taranto, O. P. (2015). Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from 'pera'sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *Journal of Food Engineering*, 166, 111-118.
- Zdunek, A., Pieczywek, P. M., & Cybulska, J. (2021). The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 1101-1117.
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394.
- Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G., & Zimbone, S. M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*, 80, 252-273.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251-272.
- Zhang, C., Li, Z., Zhang, C. Y., Li, M., Lee, Y., & Zhang, G. G. (2019). Extract methods, molecular characteristics, and bioactivities of polysaccharide from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Nutrients*, 11(5), 1181.
- Zhang, H., Chen, J., Li, J., Yan, L., Li, S., Ye, X., ... & Chen, S. (2018). Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel. *Food Hydrocolloids*, 79, 579-586.
- Zhang, J., Peppard, T. L., & Reineccius, G. A. (2015). Double-layered emulsions as beverage clouding agents. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(3), 218-223.
- Zhang, W., Zhao, H., Zhang, J., Sheng, Z., Cao, J., & Jiang, W. (2019). Different molecular weights chitosan coatings delay the senescence of postharvest nectarine fruit in relation to changes of redox state and respiratory pathway metabolism. *Food chemistry*, 289, 160-168.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- Zidi, D., Gharsallaoui, A., Dupas-Farrugia, C., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2019). Physicochemical and rheological changes of acidified camel milk added with commercial low methoxyl-pectin. *International journal of biological macromolecules*, 128, 347-353.
- Žlabur, J. Š., Voća, S., Brnčić, M., & Rimac-Brnčić, S. (2018). Chapter 1 - New Trends in Food Technology for Green Recovery of Bioactive Compounds From Plant Materials. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Handbook of Food Bioengineering: Role of Materials Science in Food Bioengineering* (pp. 1-36). Academic Press.