



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

OBTENCIÓN DE POLVOS FRUTALES A PARTIR DE MAQUI (*Aristotelia chilensis*) CON ALTO PODER ANTIOXIDANTE MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SECADO, ATRIBUTOS DE CALIDAD Y APLICACIONES

FRANCISCO MANUEL GARRIDO MAKINISTIAN

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2020

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requerimientos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química, de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI CONICET-UNS) y del Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN CONICET-UNComa) durante el período comprendido entre el 22 de septiembre de 2015 y el 27 de febrero de 2020, bajo la dirección de la Dra. Daniela Salvatori (PROBIEN CONICET-UNComa) y de la Dra. Verónica Bucalá (PLAPIQUI CONICET-UNS).

Firma



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo
la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

En las siguientes líneas quisiera agradecer a las distintas personas e instituciones que contribuyeron colectivamente a la concreción del presente trabajo.

A mis directoras las Dras. Daniela Salvatori y Verónica Bucalá, por su calidad humana y profesional. Sinceramente les agradezco que me hayan dado la posibilidad de trabajar en sus grupos de investigación, confiando en mí y acompañándome en este camino de crecimiento personal y profesional. Gracias por estar siempre presentes en todo lo que necesité durante el trabajo de investigación y a lo largo de la escritura de la tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad Nacional del Comahue (UNComa) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS), por el apoyo económico e institucional. A los institutos PROBIEN (CONICET-UNComa) y PLAPIQUI (CONICET-UNS) por permitirme realizar el trabajo de investigación de mi doctorado en sus laboratorios.

Al Dr. Germán Mazza y todos/as los/as integrantes del PROBIEN por el apoyo, confianza y camaradería en todos estos años.

Especialmente quiero agradecer a Paula Sette y Loreana Gallo por su compañerismo y dedicación para enseñarme y guiarme en los primeros trabajos experimentales, como así también a Lorena Franceschinis, Milagros Gómez Mattson, Agustina Sozzi, Fernanda Cabrera y Agustina Di Battista por su colaboración especial en los trabajos de mi tesis y los momentos compartidos.

A toda mi familia, por el apoyo y ayuda constante para que pueda lograr esta meta.

A Diana y Manu, los amo.

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue obtener un producto en polvo a partir de una fruta silvestre poco conocida en nuestro país como es el maqui (*Aristotelia chilensis*). Esta berry, que crece en los bosques andino-patagónicos, ha sido hasta el momento poco aprovechada para el desarrollo de nuevos ingredientes de alto valor nutricional. En primer lugar, se caracterizó la materia prima para evaluar su potencial antioxidante y su poder colorante. Luego se estudiaron y optimizaron distintas etapas de procesamiento del fruto de maqui: extracción sólido-líquido y posterior secado. Se utilizó una extracción acuosa con temperatura como tecnología amigable con el medio ambiente y como método de deshidratación del extracto optimizado se empleó secado por atomización. Se evaluaron distintos adyuvantes de secado (maltodextrina, goma arábiga, celulosa microcristalina y dióxido de silicio coloidal) como agentes encapsulantes de los compuestos bioactivos del maqui (antocianinas y polifenoles). Se analizaron las propiedades fisicoquímicas y funcionales a lo largo del procesamiento y del producto en polvo. Se estudió en detalle la degradación de compuestos antociánicos, dado que son los responsables de color y de la capacidad antioxidante de frutos de maqui. Adicionalmente se realizó un estudio de vida útil acelerado del polvo de mejor performance y se analizó la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos luego de un estudio *in vitro* del proceso de digestión gastrointestinal. Finalmente se estudiaron dos aplicaciones del polvo de maqui: 1) elaboración de un nutracéutico en forma de comprimidos y 2) el uso como colorante natural y antimicrobiano en sidras.

El polvo con dióxido de silicio presentó la mayor retención de compuestos bioactivos, una elevada capacidad antioxidante, buenas propiedades de flujo y una alta estabilidad física aún a humedades relativas elevadas. El estudio de almacenamiento acelerado mostró que envasado adecuadamente, puede ser expuesto a temperatura ambiente sin modificaciones en el color ni pérdida de los compuestos bioactivos durante un almacenamiento prolongado. Adicionalmente se observó una gran recuperación de polifenoles y de capacidad antioxidante al cabo del proceso digestivo, mayor que la observada para otros productos del mercado. Esto indica que el polvo obtenido tiene un alto potencial para ser utilizado como ingrediente funcional en distintos productos.

Los estudios acerca de las aplicaciones propuestas del polvo de maqui mostraron resultados satisfactorios y prometedores. En el campo de los nutracéuticos fue posible elaborar comprimidos por compresión directa cuyo consumo (2 comprimidos diarios) implica

un aporte elevado de compuestos bioactivos. La desintegración y el perfil de disolución de los comprimidos fueron adecuados para una formulación de liberación inmediata. Por otro lado, la incorporación del polvo como colorante en sidras permitió obtener bebidas de una gama de colores atractiva para distintos grupos de consumidores. El estudio realizado de aceptabilidad del color y percepción del consumidor mostró un 94 % de intención de compra del producto, siendo las sidras con el agregado de 400 y 600 mg de polvo cada 100 ml las de mejor performance con puntaje suficiente para ser consideradas como posibles prototipos a lanzar al mercado. Adicionalmente se comprobó el efecto antimicrobiano del polvo de maqui en levaduras contaminantes del proceso de elaboración de sidra, lo que permitiría reducir la concentración de sulfito en dicho proceso.

ABSTRACT

The main objective of this work was to obtain a powder from a wild fruit that is still relatively unknown in our country as is the case of maqui (*Aristotelia chilensis*). This berry, which grows in the Andean-Patagonian forests, has been poorly valorized for the development of new ingredients of high nutritional value. First, the raw material was characterized in order to evaluate its antioxidant potential and coloring power. Then, the different processing stages (solid-liquid extraction and drying) were optimized. An aqueous extraction at high temperature was used as green-friendly technology and spray drying was selected as dehydration method of the optimized extract. Different drying adjuvants (maltodextrin, gum arabic, microcrystalline cellulose and colloidal silicon dioxide) were evaluated as encapsulating agents of the bioactive compounds studied (anthocyanins and polyphenols). Physicochemical and functional properties were analyzed along all the processing steps and for the final maqui powder. Anthocyanin compounds degradation was studied in detail, since they are responsible for the color and the antioxidant capacity of maqui fruits. Additionally, an accelerated shelf-life study of the optimal powder was performed; also the bioactive compounds bioaccessibility was estimated by means of *in vitro* gastrointestinal digestion assay. Finally, two applications of maqui powder were studied: 1) development of a nutraceutical in the form of tablets and 2) use as natural colorant and antimicrobial agent in ciders.

The powder with silicon dioxide had the highest retention of bioactive compounds, a high antioxidant capacity, good flow properties, and high physical stability even at high relative humidities. The accelerated storage study showed that if it is adequately packaged, the powder can be exposed to room temperature without changes in color or loss of bioactive compounds content during long periods of storage. Additionally, a good recovery of polyphenols and antioxidant capacity was observed after the digestion process, higher than that observed for other products on the market. This indicates that the maqui powder obtained has a great potential to be used as a functional ingredient in different products.

The studies carried out on the proposed applications of maqui powder yielded satisfactory and promising results. In the area of nutraceuticals it was possible to produce tablets by direct compression, the consumption of 2 tablets daily provides a high bioactive compounds supply. The disintegration and dissolution profile of the tablets were suitable for an immediate release formulation. On the other hand, the incorporation of the maqui powder

as colorant in ciders yielded beverages of attractive color for different consumer groups. The study of color acceptability and consumer perception showed 94% purchase intention, being ciders with the addition of 400 and 600 mg of powder per 100 ml the best product with enough score to be considered as possible marketable product. Additionally, the antimicrobial effect of the maqui powder on contaminating yeasts of the cider-making process was verified. Then, the use of maqui would allow reducing the required sulphite concentration, which acts actually as antimicrobial in the cider production process.

Índice

Capítulo 1: Introducción

1.1. Descripción general de la materia prima	1
1.1.1. Características botánicas del maqui	1
1.1.2. Distribución geográfica y características ecosistémicas	2
1.1.3. Aspectos reproductivos	3
1.1.4. Manejo silvícola y cultivo	4
1.1.5. Relación entre el ecosistema y la calidad del producto	5
1.2. Frutas finas e importancia regional del maqui	6
1.3. Berries, antioxidantes y salud.....	7
1.4. Encapsulación de compuestos bioactivos y secado por atomización.....	9
1.5. Aplicaciones de polvos: nutraceuticos, alimentos funcionales y colorantes naturales	13
1.6. Objetivos	14
1.6.1. Objetivos generales.....	14
1.6.2. Objetivos específicos.....	14

Capítulo 2: Caracterización de la materia prima

2.1. Introducción	16
2.2. Materiales y métodos.....	23
2.2.1. Materiales.....	23
2.2.2. Propiedades fisicoquímicas del fruto de maqui.....	23
2.2.3. Propiedades funcionales.....	25
2.3.1. Contenido de antocianinas monoméricas (ACY).....	25
2.2.3.2. Contenido de polifenoles totales (PT).....	26
2.2.3.3. Capacidad antioxidante (CA).....	26
2.2.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	27
2.2.5. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	27
2.6. Antocianinas: efecto del pH sobre el color	28
2.3. Resultados y discusión.....	28
2.3.1. Propiedades fisicoquímicas.....	28
2.3.2. Compuestos bioactivos.....	30

2.3.2.1. Caracterización por técnicas espectrofotométricas: polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales y capacidad antioxidante.....	30
2.3.2.2. Caracterización por FTIR y HPLC.....	31
2.3.3. Antocianinas: efecto del pH sobre el color.....	39
2.4. Conclusiones	43

Capítulo 3: Elaboración de extractos de maqui: optimización del proceso de extracción de compuestos bioactivos

3.1. Introducción	45
3.2. Materiales y métodos	47
3.2.1. Materiales.....	47
3.2.2. Contenido de sólidos solubles (SS) en los extractos	47
3.2.3. Propiedades funcionales de los extractos	47
3.2.4. Optimización del proceso de extracción	48
3.2.4.1. Diseño experimental.....	48
3.2.4.2. Obtención de los extractos acuosos de maqui.....	50
3.2.5 Perfil de antocianinas del extracto óptimo por HPLC.....	51
3.3. Resultados y discusión	51
3.3.1. Resultados experimentales y análisis estadístico.....	51
3.3.2. Análisis de los efectos de las variables independientes sobre el proceso de extracción.....	53
3.3.2.1. Efectos sobre SS.....	55
3.3.2.2. Efectos sobre ACY y % Rec	57
3.3.2.3. Efectos sobre PT.....	60
3.3.2.4. Efectos sobre CA.....	63
3.3.3. Optimización simultánea de las respuestas.....	65
3.3.4. Perfil de antocianinas del extracto óptimo mediante HPLC	66
3.4. Conclusiones	68

Capítulo 4: Optimización del proceso de secado por atomización de extractos de maqui

4.1. Introducción	69
4.2. Materiales y métodos	74
4.2.1. Materiales	74

4.2.2. Producción de polvo de maqui mediante secado por atomización.....	74
4.2.2.1. Descripción del equipo de secado por atomización	74
4.2.2.2. Preparación de la formulación de alimentación al proceso de secado	75
4.2.2.3. Selección del adyuvante de secado	76
4.2.2.4. Efectos de las condiciones operativas (CO).....	76
4.2.2.4.1. Diseño experimental.....	76
4.2.2.4.2. Análisis estadístico.....	77
4.2.3. Fluidez de los polvos.....	78
4.2.3.1. Ángulo de reposo	78
4.2.3.2. Índice de Carr.....	78
4.2.4. Rendimiento del proceso de secado por atomización	79
4.2.5. Humedad en los polvos	79
4.2.6. Actividad acuosa de los polvos	79
4.2.7. Distribución de tamaño de partícula.....	80
4.2.8. Morfología de las partículas	80
4.2.9. Temperatura de transición vítrea.....	80
4.2.10. Difracción de rayos X	81
4.2.11. Higroscopicidad	81
4.2.12. Color superficial.....	81
4.2.13. Propiedades funcionales de los polvos.....	82
4.2.14. Perfil de antocianinas del polvo óptimo mediante HPLC.....	82
4.3. Resultados y discusión	82
4.3.1. Selección del adyuvante de secado	82
4.3.2. Análisis del diseño experimental factorial 2 ⁴ : efectos de las condiciones operativas sobre las variables de respuesta.....	87
4.3.2.1. Fluidez: ángulo de reposo (AR) e Índice de Carr (IC).....	87
4.3.2.2. Rendimiento del proceso (RP)	90
4.3.2.3. Humedad de los polvos (H).....	90
4.3.2.4. Distribución de tamaño y morfología de partículas	90
4.3.2.5. Capacidad antioxidante, antocianinas monoméricas y polifenoles totales	91
4.3.2.6. Color.....	93
4.3.2.7. Perfil de antocianinas del polvo óptimo mediante HPLC	95
4.3.3. Estabilidad física de los polvos: Tg, higroscopicidad y aw	96
4.4. Conclusiones	98

Capítulo 5: Estudio de estabilidad durante el almacenamiento

5.1. Introducción	100
5.2. Materiales y métodos	103
5.2.1. Materiales.....	103
5.2.2. Isotherma de sorción	103
5.2.3. Temperatura de transición vítrea.....	104
5.2.4. Estabilidad del color superficial y compuestos bioactivos durante el almacenamiento.....	104
5.2.4.1. Análisis preliminar de la estabilidad del color superficial	104
5.2.4.2. Estudio de vida útil acelerado	105
5.2.4.3. Determinaciones analíticas de compuestos bioactivos y color	105
5.2.4.4. Evaluación de la cinética de degradación de ACY..	107
5.2.5. Análisis estadístico de los resultados..	107
5.3. Resultados y discusión.	108
5.3.1. Isotherma de sorción y Tg.....	108
5.3.2 Estabilidad del color superficial y compuestos bioactivos durante el almacenamiento.....	111
5.3.2.1. Análisis preliminar del color superficial mediante un diseño factorial.....	112
5.3.2.2. Estudio de vida útil acelerado	116
5.3.2.2.1. Análisis de bioactivos.....	116
5.3.2.2.2. Análisis de color.....	121
5.3.2.2.3. Integración de resultados.....	123
5.4. Conclusiones..	125

Capítulo 6: Aplicaciones del polvo de maqui

6.1. Introducción	126
6.2. Materiales y métodos	130
6.2.1. Materiales.....	130
6.2.2. Digestión in vitro del polvo de maqui y determinación de bioaccesibilidad	130
6.2.3. Preparación de los comprimidos	131
6.2.4. Tiempo de desintegración de los comprimidos.....	131
6.2.5. Perfil de disolución de antocianinas de los comprimidos	132
6.2.6. Preparación de las sidras con agregado de polvo de maqui	133
6.2.7. Determinación de compuestos bioactivos y pH.	133

6.2.8. Color de las sidras combinadas con polvo de maqui	134
6.2.9. Estudio de aceptabilidad del color de la sidra con polvo de maqui y percepción del consumidor	134
6.2.10. Efecto antimicrobiano del polvo de maqui en levaduras.....	137
6.2.10.1. Ensayo de crecimiento de levaduras en microplacas	137
6.2.10.2. Modelado de la cinética de crecimiento y análisis estadístico..	137
6.3. Resultados y discusión	138
6.3.1 Polvo de maqui como ingrediente funcional: niveles de compuestos bioactivos y bioaccesibilidad.....	138
6.3.2. Elaboración de un nutracéutico en la forma de comprimido	141
6.3.3. Uso como colorante natural y agente microbiano en sidra	143
6.3.3.1. Análisis de compuestos bioactivos y color	143
6.3.3.2. Estudio de aceptabilidad del color de las bebidas formuladas	147
6.3.3.3. Actividad antimicrobiana del polvo de maqui	151
6.4. Conclusiones	156
Capítulo 7: Conclusiones finales	158
Bibliografía.....	162
Anexo.....	184

Capítulo 1

Introducción

1.1. Descripción general de la materia prima

1.1.1. Características botánicas del maqui

El maqui (también conocido como “queldrón”, o “maquei”), es un árbol perteneciente a la familia *Eleocarpaceae* y al género *Aristotelia*. El nombre científico de su especie es *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. Es una planta perenne y dioica, aunque puede comportarse como tropófito facultativo y de esta manera aporta materia orgánica al suelo (Ramírez et al., 1975). Su tronco es grisáceo, delgado y de corteza lisa. Las hojas son simples, opuestas y decusadas, de aproximadamente 13 cm de largo y 3-7 cm de ancho (Riedemann y Aldunate, 2003). Las flores son de 3 a 5 mm de longitud, dispuestas en panículas cortas, con 5 sépalos, 5 pétalos y de 10 a 18 estambres. En el hemisferio sur, el período de floración se desarrolla desde septiembre hasta diciembre.

El fruto del maqui madura en verano, es una baya redonda comestible de color negro-purpúreo brillante, de unos 5 mm de diámetro, de pulpa dulce en cuyo interior hay comúnmente dos semillas angulosas (Hoffmann, 1997), aunque otros autores reportan la presencia de 2 a 4 semillas angulosas de 3 mm de largo y 2 mm de ancho (Oyanadel, 2002).

En cuanto al fenotipo de la planta, existe variación dependiendo de las condiciones ambientales. En zonas cordilleranas elevadas respecto al nivel del mar, el maqui se desarrolla como una forma arbustiva de baja altura (Rodríguez et al., 1983). Por otro lado, a menores elevaciones se pueden encontrar árboles de 4 o 5 m, e incluso hasta de 10 m de altura (Zevallos y Matthei, 1992). En la Figura 1.1 se pueden apreciar las características fenotípicas de la planta y el aspecto del fruto.



Figura 1.1. Imágenes del árbol de maqui y sus frutos. Verano año 2016, Lago Puelo, Chubut, Argentina.

1.1.2. Distribución geográfica y características ecosistémicas

Los bosques subantárticos o andino-patagónicos se extienden a lo largo de una franja en la Cordillera de los Andes, desde la Provincia de Neuquén hasta la Provincia de Tierra del Fuego del lado argentino, y en las latitudes equivalentes del lado chileno. *Aristotelia chilensis* es una especie endémica de los bosques subantárticos (Rodríguez et al., 1983), y se encuentra distribuida en gran parte de la zona que abarcan dichos bosques. En la Patagonia Argentina, y de acuerdo a la Administración de Parques Nacionales ([Sistema de Información de Biodiversidad](#)), el maqui puede encontrarse desde Junín de los Andes (Parque Nacional Lanin, Neuquén), hasta Esquel (Parque Nacional Los Alerces, Chubut). En Chile Vogel et al. (2014) mencionan que existen reportes de distribución desde los 30° hasta los 43° de latitud sur, y hasta 2500 m sobre el nivel del mar en la zona cordillerana. Esta información es coincidente con la reportada por Misle et al. (2011), quienes mencionan a las regiones de Coquimbo y Los Lagos como extremos norte y sur respectivamente de la región de desarrollo de la planta. El maqui también se encuentra en la Isla Juan Fernández (Chile) en el Océano Pacífico, en la cual fue introducido y se convirtió en una planta invasiva (Matthei, 1995; López et al., 2013).

Respecto a las características ecosistémicas, el maqui crece mejor en suelo con abundante materia orgánica y humedad. En la zona norte de su distribución geográfica, el clima es mediterráneo y la planta preferentemente se desarrolla en riberas de ríos y lagunas, quebradas y zonas expuestas a niebla que garanticen una humedad suficiente. En cambio hacia el sur de la región de desarrollo, el clima templado al ser más húmedo facilita el crecimiento en gran cantidad de sitios dado que la dependencia específica de cursos de agua, quebradas y otras zonas húmedas, se hace menos preponderante. Si bien la planta prefiere suelos húmedos, también se ha observado su crecimiento en suelos degradados y secos, y en lugares que han sido recientemente deforestados por distintas intervenciones, por lo cual es considerado un agente importante en el control de la erosión (Rodríguez et al., 1983; Donoso, 2006).

En cuanto a las asociaciones con otras especies, el amplio rango latitudinal y diversidad de hábitat en los que se desarrolla, con similitud de requerimientos y habilidades competitivas con muchas especies arbustivas alóctonas, contribuye en aumentar la multiplicidad de posibles comunidades (Donoso, 2006).

1.1.3. Aspectos reproductivos

El maqui es una especie dioica dado que presenta flores femeninas y flores masculinas en distintas plantas. Sin embargo, en algunos casos no se ha completado el proceso evolutivo en la planta, es decir el paso de hermafroditismo a dioica, y es posible encontrar en algunas flores masculinas un ovario fértil, posibilitado el desarrollo esporádico de frutos (Cardenas, 1998). La polinización se produce a través del viento (Donoso, 2006) y principalmente por insectos (Riveros et al., 1991).

El período de florecimiento del maqui se desarrolla desde el mes de octubre y hasta comienzos de noviembre, y los frutos maduran entre diciembre y enero (Rodríguez et al., 1983). Sin embargo en la zona sur de su distribución geográfica, estos períodos pueden desplazarse en el tiempo. En efecto, la floración puede ocurrir entre noviembre y enero y la fructificación entre diciembre y abril. En este sentido, Donoso (2006) señala que los cambios en el inicio de la floración y fructificación dependen de los gradientes ambientales asociados a los cambios en la elevación y latitud.

Una vez desarrollada la fructificación, las aves del bosque comen el fruto y actúan como agentes diseminadores de las semillas de la especie. Las semillas son digeridas y diseminadas en las fecas a gran distancia (Donoso, 2006).

Además de la forma de diseminación silvestre descrita, también es posible la propagación por germinación de semillas y la propagación vegetativa.

A. chilensis es fácil de reproducir por germinación de semillas. Luego de separar y secar la semilla del fruto maduro, la mejor época para sembrarla es entre otoño e invierno (hemisferio sur). El porcentaje de germinación depende de los tratamientos previos realizados sobre la semilla (Vogel et al., 2005; Doll et al., 1999). Teniendo en cuenta que la diseminación endozoica provoca cambios en dicha semilla (por efecto mecánico y químico), podría ser necesario realizar tratamientos especiales para lograr una exitosa propagación por germinación (Valdebenito y Aguilera., 2013).

Para la reproducción vegetativa y en el hemisferio sur, se recomienda seleccionar las estacas en otoño y en primavera. Se recomienda utilizar segmentos de los extremos de las ramas de unos 20 cm de largo y con 4 o 5 hojas (Poblete, 1997; Palma, 2001). Frecuentemente se aplica una hormona de enraizamiento en la base de la estaca. Luego de seis a ocho semanas, se logran resultados de hasta un 100% de enraizamiento, dependiendo de las condiciones ambientales (Vogel et al., 2005).

1.1.4. Manejo silvícola y cultivo

Existen menciones relacionadas con el problema de sobreexplotación de formaciones silvestres de distintas plantas medicinales y pequeñas bayas (berries, en inglés). Por ejemplo Arribillaga y Zegers (1998), indican respecto al fruto de calafate que, a causa del desconocimiento de las técnicas básicas de manejo productivo de la especie, se ha provocado una sobreexplotación del recurso. En el mismo sentido, Salinas (2012) señala que en la región de Aysén (Chile), la demanda de frutos de maqui para su uso como colorante asociado al desconocimiento acerca del manejo (podas, técnicas de cosecha y ensayos silviculturales) constituyen una amenaza para su conservación.

Valdebenito y Aguilera (2013), aportan un estudio sobre manejo silvícola, en el que realizaron un raleo en rodales de maqui para evaluar la producción de frutos en formaciones naturales, comparando casos con y sin intervención de raleo. Básicamente, en cada rodal observaron y seleccionaron los individuos con mejor sanidad y copa frondosa, luego realizaron una “liberación de copa” efectuando un raleo alrededor de cada individuo para proporcionarle una superficie libre a cada copa de árbol, lo cual provocaba una mejor recepción de la luz solar. Encontraron una correlación positiva entre la superficie de copa y la

producción de frutos, demostrando que dicha producción en un macal densamente poblado se ve favorecida después de una intervención de raleo.

Por otro lado Vogel et al. (2014) aportan resultados de caracterización morfo-fenológica, trabajando con cultivos de maqui generados a partir de la reproducción vegetativa de clones provenientes de 8 regiones distintas de Chile (entre las latitudes 34° y 41° sur). Dicha investigación sirve como base para seleccionar el o los clones más adecuados y profundizar el estudio de técnicas de manejo de cultivos para optimizar la producción y lograr que esta deje de provenir exclusivamente de formaciones silvestres.

1.1.5. Relación entre el ecosistema y la calidad del producto

Existen pocos trabajos científicos que estudien la relación calidad del producto-condiciones de producción; uno de ellos es el de Fredes et al. (2014 a). En dicho trabajo se señala que, debido a la gran distribución geográfica del maqui en formaciones silvestres, puede encontrarse una diversidad de genotipos adaptados a diferentes regímenes de desarrollo. Estos genotipos poseen distintas concentraciones de compuestos fenólicos, y por lo tanto distinto potencial bioactivo. Los mencionados autores evaluaron las diferencias de contenido (total e individual) de antocianinas, el contenido total de polifenoles, y la capacidad antioxidante de los frutos de maqui de cuatro regiones geográficas diferentes de Chile, y durante dos estaciones de crecimiento consecutivas. De las cuatro regiones, tres de ellas (Puchuncavi, Paredones y Talca), están localizadas en la zona centro de Chile, entre 32° y 35° latitud sur, y la cuarta región de estudio (Pucón) fue localizada en el sur de Chile a 39° latitud sur. Además, dichas regiones poseen diferentes altitudes respecto al nivel del mar. Los cuatro lugares donde se realizaron los muestreos poseían una textura de suelo similar (suelo arcilloso) y también pH similar (6,0-6,5), no poseían irrigación externa ni fertilización. Entre ellos existía una diferencia en cuanto a la media anual de lluvias, como así también respecto a la acumulación de las mismas en el periodo de maduración del fruto, siendo en ambos casos mayores en Pucón. En cuanto a la temperatura reportaron que la media anual fue más baja en Pucón (11,2 °C) que en los otros tres sitios de la zona central de Chile (Puchuncavi, Paredones y Talca), en los cuales las temperaturas medias se encontraron en el rango de 13,6-14,6 °C. Además, la amplitud térmica diaria promedio durante el último mes previo a la recolección del fruto, fue significativamente mayor en Talca y en Paredones. Los frutos de maqui de estas últimas dos zonas fueron los que tuvieron las mayores concentraciones de antocianinas y

polifenoles, junto con los niveles más altos de capacidad antioxidante, indicando un efecto significativo de la región geográfica debido principalmente a la temperatura.

Se ha reportado que muchos factores medioambientales influyen en la biosíntesis de flavonoides (de los cuales forman parte las antocianinas) como la disponibilidad de luz, temperatura, altitud, tipo de suelo, agua, interacciones microbianas, entre otros. Dentro de ese conjunto de variables, la temperatura es la que más afecta la biosíntesis de antocianinas (Mateus et al., 2002; Spayd et al., 2002; Downey et al., 2004).

1.2. Frutas finas e importancia regional del maqui

Frutas finas cultivadas y silvestres

De acuerdo con el documento “Visión prospectiva de la cadena de frutas finas al 2030” elaborado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Argentina (Gómez Riera, Bruzone y Kirschbaum, 2013), las frutas finas comprenden a las berries arbustivas (frambuesas, moras, grosellas, arándanos, etc.), berries herbáceos (frutilla considerada un cultivo hortícola) y las cherries (frutales de carozo que comprenden a las cerezas y las guindas). En dicho documento se destaca que, a nivel mundial, la cereza, la frutilla, el arándano y la frambuesa son las frutas finas principales en cuanto a producción y comercialización. Además se señala que la demanda mundial de berries es creciente e insatisfecha como consecuencia del aumento en el consumo de los países desarrollados del hemisferio norte (Estados Unidos, Canadá, países de Europa, Rusia, Japón, entre otros). En función de las excelentes cualidades nutricionales y nutracéuticas de estas frutas, y mientras las berries sigan siendo considerados como “delicatessen” por cierto perfil de consumidores dispuestos a pagar precios superiores a los de las frutas tradicionales, esta tendencia se mantendrá. En este contexto, es de suma importancia en nuestra región la contra estacionalidad productiva con el hemisferio norte, dado que actúa como una condición favorable para la exportación hacia los países mencionados.

Las frutas finas cultivadas en Argentina están representadas principalmente por: cereza, arándano, frutilla, frambuesa y zarzamora. Otros frutos pequeños de importancia local (en distintas zonas de la Patagonia) son las grosellas blancas, rojas y negras.

En el caso de las berries, algo más del 70 % de la superficie cultivada del país se concentra en territorio patagónico y el 90 % de la producción se comercializa como congelado. El principal canal de comercialización es la industria de alimentos, que demanda

berries congelados para transformarlos en dulces, mermeladas, jaleas, conservas, salsas, pulpas, licores y aguardientes, entre los productos más importantes. Cada vez son más las industrias que incorporan berries en sus alimentos, como sucede con los lácteos, golosinas, cereales en barra, bebidas sin alcohol y té, entre otros. También las industrias farmacéutica y de cosméticos son consumidoras de berries, especialmente de arándano. Muy recientemente, la industria de alimentos funcionales y nutracéuticos ha comenzado a emplear berries para la elaboración de suplementos dietarios en forma de pastillas o polvos, debido a sus propiedades antioxidantes.

Sin embargo muy poca atención se ha prestado en nuestro país a los berries comestibles silvestres. Estos frutos exóticos de color rojo, violáceo o morado, entre los que se destacan el maqui, el calafate, la murra, la murta, entre otros, crecen en las zonas cordilleranas del sur de Chile y Argentina. El interés por su estudio obedece a una tendencia mundial de búsqueda de frutas y nuevas materias primas con altos contenidos de compuestos antioxidantes. Dadas las condiciones edafoclimáticas donde crecen muchas de estas especies y a que los polifenoles (en especial los flavonoides) son compuestos cuya síntesis es favorecida por condiciones de estrés, se espera que presenten contenidos altos de este tipo de antioxidantes (Fredes, 2009). En particular el maqui (*Aristotelia chilensis*) y el calafate (*Berberis buxifolia*) se destacan como los frutos silvestres que más concentran antioxidantes (Rothwell et al., 2016; Fredes et al., 2018). Sin embargo actualmente no se conocen en nuestro país muchos productos o ingredientes deshidratados elaborados a partir de ellos.

Situación regional del maqui (Aristotelia chilensis)

El maqui, aunque es una fruta fina silvestre autóctona de los bosques andino-patagónicos de Chile y Argentina, es muy dispar la relevancia que se le ha dado en ambos países, y por lo tanto, también lo es el grado de desarrollo alcanzado tanto en términos comerciales como en la domesticación del fruto (pasaje de la recolección de un fruto silvestre a una producción sustentable). En Argentina, el potencial de dicho fruto se encuentra desaprovechado en términos comparativos, siendo un reflejo de ello la falta de información hasta la fecha (al menos de fácil acceso público en publicaciones científicas, informes técnicos, o estadísticas brindadas por organismos oficiales), en cuanto a formas de recolección y volúmenes, estadísticas de comercialización (mercado interno y exportación), etc. En el caso de Chile, se ha avanzado notablemente respecto a la comercialización del fruto de maqui

y productos derivados del mismo, y al mismo tiempo han hecho esfuerzos en la difusión de sus beneficios para la salud instalándolo como un “súper alimento”.

Las primeras exportaciones de maqui desde Chile datan del año 1996, siendo creciente desde entonces su demanda. Se comercializa como producto congelado, deshidratado, liofilizado y como jugo concentrado, aunque el fruto congelado es la forma frecuente de comercialización. De acuerdo a [Valdebenito y Alvarez \(2017\)](#), el proceso de recolección se realiza generalmente por familias o grupos de recolectores, con rendimientos de hasta 80 kg / día, y se comercializa en fresco con precios que oscilan entre 1,2 a 1,5 US\$ / kg. Los autores además informan la evolución de las exportaciones de maqui chileno en el periodo 2010-2016, indicando un crecimiento desde 100 Ton / año hasta 400 Ton / año (aproximadamente), con un precio internacional promedio en dicho periodo de 17800 US\$ por tonelada. Este valor es un indicador referencial de precio por tonelada, ya que el fruto se exporta con diferentes grados de procesamiento. En cuanto a los destinos de exportación se destacan: Estados Unidos, Corea del Sur y Alemania.

Hasta la actualidad tanto en Chile como en Argentina la provisión de frutos de maqui proviene de la recolección a pequeña escala de formaciones silvestres de plantas de maqui (macales), por lo tanto no existe una oferta sostenida que permita dar respuesta a eventuales mayores demandas del producto. Si bien en Chile se ha avanzado en la domesticación del maqui desde el año 2007 (a nivel experimental), en Argentina hasta la actualidad no existen antecedentes bibliográficos en la temática. En cuanto a su uso industrial en Argentina, sólo se tiene conocimiento de una empresa PyME (From Patagonia), que produce a partir de frutos de recolección un deshidratado de maqui muy limitado en cuanto sus aplicaciones como ingrediente. Constituye un producto obtenido por liofilización directa del fruto entero que posteriormente es triturado. Esta forma de presentación solo permite su agregado directo a algunos alimentos (yogurt, postres, cereales, etc.) al momento del consumo.

1.3. Berries, antioxidantes y salud

En los últimos años se observa una creciente demanda de los consumidores por alimentos con cualidades promotoras de la salud. En este sentido, las berries se encuentran entre las frutas más populares, debido a que poseen un alto contenido de antocianinas y polifenoles que contribuyen a su elevada actividad antioxidante ([Wang y Lin, 2000](#)). Se informaron evidencias mostrando que el consumo regular de berries podría reducir el riesgo de desarrollo y/o progresión de varias enfermedades crónicas, incluyendo las

cardiovasculares, las neurodegenerativas y ciertas formas de cáncer (Seeram, 2008; Basu et al., 2010; Nile y Park, 2014; Yang y Kortensniemi, 2015).

Martínez Navarrete et al. (2008) señalan que los mecanismos por los cuales los polifenoles pueden tener los efectos mencionados son variados, no obstante, los más estudiados son los relacionados con sus propiedades captadoras de radicales libres, o sea las relacionadas a su actividad antioxidante. Los radicales libres se producen como consecuencia de la respiración en presencia de oxígeno, la cual es esencial en la vida celular de nuestro organismo. Dichos radicales libres pueden producir desde alteraciones genéticas de determinadas células (aumentando el riesgo de cáncer), hasta reducciones de la funcionalidad de otras, hecho característico en el envejecimiento. En este sentido, la presencia de sustancias que bloqueen los radicales libres (antioxidantes) contribuirá a reducir su efecto perjudicial.

Los extractos de maqui han demostrado poseer actividad analgésica, antiinflamatoria (Céspedes et al., 2010 a y b) y cardioprotectora (Céspedes et al., 2008), así como efectos antioxidantes (Speiski et al., 2012). Los taninos del fruto le confieren además propiedades astringentes y antidiarreicas (Alonso, 2012). El estudio detallado realizado por Brauch et al. (2016) sobre frutos y jugos frescos de esta especie, lo destaca como una “súper fruta” de alto potencial como fuente de pigmentos y antioxidantes naturales.

1.4. Encapsulación de compuestos bioactivos y secado por atomización

En general, el consumo de diversos compuestos presentes en los alimentos es necesario para una vida saludable, como por ejemplo nutrientes básicos (carbohidratos, proteínas y lípidos), compuestos bioactivos (vitaminas, minerales, aminoácidos, fitoquímicos, etc.), compuestos vinculados con aspectos sensoriales (ácidos orgánicos y pigmentos), entre otros. Muchos de estos constituyentes alimenticios, en particular los compuestos bioactivos, son susceptibles a la degradación al ser expuestos a condiciones ambientales adversas previas al consumo. Por tal motivo, distintas tecnologías son aplicadas para proteger dichos compuestos, siendo una de ellas la microencapsulación (Fang y Bhandari, 2012).

La encapsulación es un proceso de atrapamiento o empaquetamiento de un componente activo, el cual puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso, dentro de un material secundario más estable que lo protege, de tal manera que puede ser liberado posteriormente (Vidal et al., 2013; Di Batista et al., 2015; Estevinho et al., 2016). Varias técnicas han sido desarrolladas para encapsular ingredientes alimenticios, como por ejemplo secado por atomización, liofilización, extrusión, recubrimiento mediante lecho fluidizado,

coacervación, co-cristalización y emulsificación, entre otras (Ray et al., 2016; Fang y Bhandari, 2012). La selección del proceso de encapsulación para una aplicación específica debe basarse en parámetros como: tamaño de partícula final requerido, propiedades físicas y químicas tanto del compuesto activo como del material encapsulante, campo de aplicación del producto, el mecanismo de liberación deseado, la viabilidad del escalado del proceso de manufactura y costos aceptables de producción (Ré, 1998). Existen diferentes materiales utilizados para formar la matriz de encapsulación (Tabla 1.1), entre los cuales se consideran importantes los derivados de celulosa, lípidos, proteínas, gomas, carbohidratos y algunos materiales inorgánicos (Kondo, 1979; Martín Villena et al., 2009; Tontul y Topuz, 2017).

Tabla 1.1. Agentes encapsulantes.

Tipo de agente encapsulante	Agente específico
Gomas	Agar, alginato de sodio, goma arábiga
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
Celulosas	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, trisetearina
Proteínas	Gluten, caseína, albúmina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

El secado por atomización es un proceso ampliamente utilizado debido a su capacidad para convertir un líquido (solución acuosa u orgánica, emulsión, dispersión o suspensión) en un polvo seco con especificaciones precisas de calidad en un sistema continuo, relativamente económico y fácil de operar (Gallo et al., 2015; Sosnik y Seremeta, 2015; Poozesh y Bilgili, 2019). En la Figura 1.2 se representa un esquema del proceso de secado por atomización. Como se puede observar la muestra líquida a secar se bombea desde un recipiente de alimentación a un atomizador que normalmente se encuentra en la parte superior de la cámara de secado. Para los casos en los que se utiliza aire como medio de secado, el gas es tomado de la atmósfera utilizando sistemas de presión positiva o negativa. El aire que entra al secadero es filtrado y luego se calienta por medio de resistencias eléctricas. Las gotas producidas por el atomizador entran en contacto con el aire caliente lo cual produce la evaporación del solvente presente en la solución atomizada.

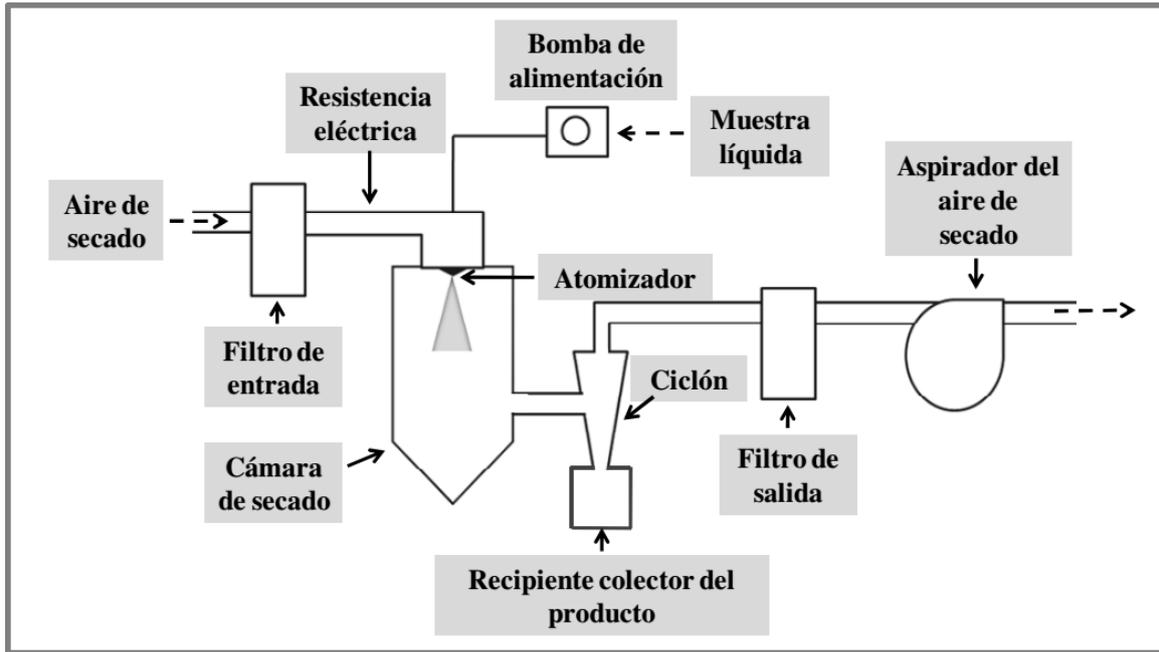


Figura 1.2. Esquema del proceso de secado por atomización. Sistema de presión negativo (Gallo, 2013).

En cuanto a la disposición relativa de las corrientes de alimentación líquida y de aire de secado, existen dos tipos de diseños de secaderos: de flujo en contra-corriente y en co-corriente. En los secaderos en contra-corriente el atomizador se encuentra ubicado en la parte superior de la cámara de secado y el aire de secado ingresa por la parte inferior de la misma. Este diseño ofrece una evaporación más rápida y una mayor eficiencia energética que el diseño en co-corriente. Sin embargo, el diseño de contra-corriente no es adecuado para productos termosensibles. En los secaderos de co-corriente el atomizador se encuentra en la parte superior de la cámara de secado en el mismo sitio por el cual ingresa el aire caliente. Por lo tanto, este diseño se prefiere para productos sensibles al calor ya que las gotas entran en contacto con el aire de secado cuando se encuentran con su máximo contenido de humedad. Finalmente, las gotas secas (partículas sólidas) son separadas del aire en un ciclón y colectadas en el correspondiente recipiente. Las partículas finas son generalmente arrastradas por el aire, por esta razón, se filtra el aire a la salida (Mujumdar, 2006).

Como se muestra en la [Figura 1.3](#), existen varios tipos de atomizadores; entre otros, boquilla de dos fluidos, disco giratorio y nebulizador ultrasónico. La selección del atomizador depende de la naturaleza y el caudal de alimentación de la muestra líquida y de las características del polvo seco que se desea obtener.



Figura 1.3. Diferentes tipos de atomizadores. Extraído y adaptado de Nandiyanto y Okuyama (2011).

En los atomizadores de dos fluidos, la muestra líquida y el aire comprimido entran al atomizador a través de diferentes canales y salen juntos en la punta de la boquilla del mismo. Este diseño utiliza la energía del gas comprimido para atomizar el líquido en gotas muy finas (entre 10-1000 μm). Los atomizadores de disco rotatorio utilizan la energía de una rueda giratoria de alta velocidad para dividir la muestra líquida en gotas ($> 200 \mu\text{m}$). Para este tipo de atomizador, el tamaño de partícula puede variarse fácilmente cambiando la velocidad de la rueda. Sin embargo, estos atomizadores pueden producir grandes cantidades de partículas finas. A diferencia de los atomizadores que dependen del caudal de aire comprimido y de la velocidad de rotación de la rueda para convertir el líquido en pequeñas gotas, los atomizadores ultrasónicos utilizan la energía de la vibración ultrasónica para generar las partículas. Para este diseño, el tamaño de las gotas se rige principalmente por la frecuencia a la que vibra la boquilla, normalmente se logran tamaños de partículas entre 1-10 μm (Masters, 1979).

La atomización es una operación sumamente importante en el proceso de secado, ya que define la distribución de tamaño de gotas y consecuentemente de las partículas finales. Bajos caudales de aire de atomización tienden a producir partículas relativamente grandes. Por su parte, altas concentraciones de solutos o altas viscosidades de la alimentación líquida favorecen la producción de partículas de mayor tamaño (Training Paper Mini Spray Drying, 2002; Ré, 2006). La forma de las partículas depende de la naturaleza de los líquidos pulverizados y de las condiciones de operación del proceso de secado (Nandiyanto y Okuyama, 2011). En general, se obtienen partículas esféricas debido a que es la forma más estable de una gota.

El uso de adyuvantes de secado en el proceso de secado por atomización es una práctica común. La selección de estos excipientes es un factor crítico en el secado de extractos, ya que determina la estabilidad y la calidad de los polvos secos. Entre otros, los

adyuvantes más frecuentemente utilizados son: almidón, ciclodextrinas, maltodextrinas, lactosa, goma arábiga y dióxido de silicio coloidal (Oliveira y Petrovick, 2010).

1.5. Aplicaciones de polvos: nutraceuticos, alimentos funcionales y colorantes naturales

Los productos en polvo obtenidos a partir de jugos o extractos de frutas poseen varios beneficios y ventajas económicas frente a sus precursores líquidos tales como una relación volumen/peso mucho menor, necesidades de empaquetado más reducidas, mayores facilidades en cuanto al manejo y transporte y una vida útil mucho más prolongada (Jiang et al., 2013). Junto con estos beneficios, los productos en polvo son fáciles de dosificar, lo cual es particularmente útil en muchas aplicaciones.

Dado que los jugos o extractos de frutas son ricos en compuestos bioactivos beneficiosos para la salud (polifenoles y antocianinas, entre otros), los polvos obtenidos a partir de ellas pueden utilizarse como ingrediente funcional para la elaboración de alimentos funcionales o nutraceuticos.

Los compuestos antociánicos presentes en los frutos rojos, además de ser nutricionalmente valiosos por su características nutraceuticas, son pigmentos que pueden utilizarse para el reemplazo de aditivos artificiales debido a su baja toxicidad (Wrolstad et al., 2005). El rol de las antocianinas como agentes colorantes es importante debido al creciente interés en reemplazar aditivos artificiales por naturales. En la actualidad la industria alimentaria emplea mayoritariamente colorantes rojos sintéticos (Rojo 40, Rojo 3). Sin embargo, el colorante Rojo 40 (rojo Allura) es cuestionado por causar alergias e hiperactividad en niños y el Rojo 3 (eritrosina), a pesar de que ha sido reconocido como carcinogénico por la FDA desde el año 1990, sigue empleándose en productos como por ejemplo cerezas confitadas o al marrasquino. Se han informado varias fuentes de antocianinas como agentes colorantes, entre ellas extractos de uvas, sauco y repollo rojo (Khoo et al., 2017; Rodríguez-Amaya, 2018).

El término “alimento funcional” fue utilizado por primera vez en Japón a principios de los años 80, y desde allí se ha extendido hacia el resto del mundo (Granato et al., 2017). Los alimentos funcionales son aquellos alimentos que, en forma natural o procesada, contienen componentes que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición básica. Los compuestos químicos bioactivos que ellos aportan al organismo ejercen funciones bioquímicas y fisiológicas beneficiosas que, en términos globales, contribuyen a lograr un

“envejecimiento saludable”, a través de la reducción del riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles prevalentes en nuestra sociedad (Leal et al., 2016).

Por otro lado, el término “nutracéutico” surge de la combinación de las palabras nutrición y farmacéutico, y fue introducido por primera vez en 1989 por el Dr. De Felice, Presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina de EE. UU. (Keservani et al., 2017; Santana-Gálvez et al., 2019). Los nutracéuticos suelen confundirse con los alimentos funcionales porque habitualmente la materia prima con la cual se elaboran es alimenticia. La diferencia fundamental con estos últimos es que los nutracéuticos poseen una presentación y una forma de consumo (o de suministro hacia el paciente) de tipo farmacéutica (cápsulas, comprimidos, etc.) (Alonso, 2012). Además, tienen el objetivo de aportar cantidades muy altas de los agentes bioactivos, generalmente con un fin terapéutico, mientras que un alimento funcional debe ser un alimento y debe demostrar sus efectos en cantidades que normalmente se consuman en la dieta (Leal et al., 2016).

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

El objetivo general de la presente Tesis es agregar valor a una berry silvestre de Argentina (el maqui), fruto con alto potencial antioxidante y poco conocido en nuestro país, para la elaboración de nuevos productos con aplicación en el campo de nutracéuticos y de alimentos funcionales.

1.6.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la materia prima e identificar los aspectos más relevantes desde el punto de vista de las propiedades a aprovechar y los posibles procesos a aplicar.
- Optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos (polifenoles y antocianinas) utilizando tecnologías amigables con el medio ambiente.
- Evaluar el uso de distintos adyuvantes de secado y optimizar las condiciones operativas del proceso de secado por atomización para obtener un polvo de alta capacidad antioxidante y de buenas propiedades físicas.

- Estudiar el comportamiento del polvo óptimo a lo largo de distintos procesos de almacenamiento y establecer pautas para una buena conservación del producto.
- Analizar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos del polvo luego del proceso de digestión *in vitro*.
- Explorar dos aplicaciones específicas del polvo óptimo obtenido: una en el campo de los nutraceuticos, aprovechando su potencial antioxidante y otra como colorante y agente antimicrobiano en el desarrollo de un alimento específico (bebida fermentada).

Capítulo 2

Caracterización de la materia prima

2.1. Introducción

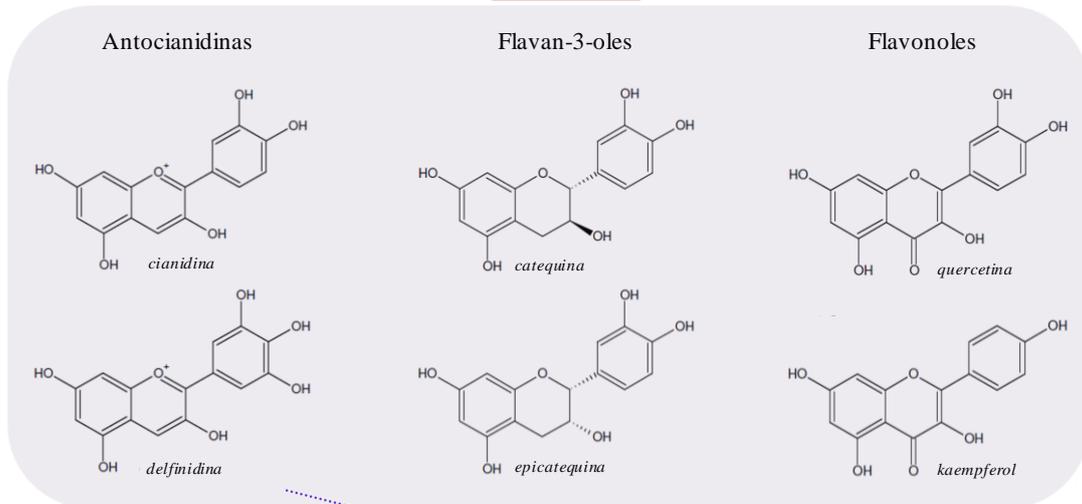
Las berries poseen una amplia diversidad de compuestos fenólicos, los cuales están conformados por flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles, entre otros), ácidos fenólicos (ácidos derivados del benzoico y del cinámico), taninos y estilbenos, como se representa en la [Figura 2.1 \(Szajdek y Borowska, 2008; Haminiuk et al., 2012\)](#). Sumado a esta diversidad, las berries presentan además elevadas concentraciones de los mismos ([Fredes et al., 2014 b; Alonso, 2012](#)). Estos fitoquímicos poseen propiedades antioxidantes que impactan positivamente en la salud humana, lo cual contribuye a que las berries sean consideradas como alimentos funcionales naturales y como una atractiva materia prima para la producción de nutraceuticos ([Seeram, 2008; Alonso, 2007](#)).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, los cuales son necesarios para su normal crecimiento y desarrollo. Su concentración suele ser particularmente alta en la epidermis del fruto. Ellos protegen las especies contra factores medioambientales como sequías, radiación UV, infecciones o daño físico ([Szajdek y Borowska, 2008](#)). Por dicha razón, muchos factores ecosistémicos (condiciones climáticas, regiones geográficas, etc.) y de manejo de cultivo (o manejo silvícola en el caso de formaciones silvestres) afectan la concentración de polifenoles ([Castrejón et al., 2008; Fredes et al., 2014 b](#)).

Las antocianinas (que contribuyen a la capacidad antioxidante de las berries) son los compuestos que aportan el color a las frutas ([Pojer et al, 2013](#)), y por lo tanto brindan además atractivas cualidades sensoriales.

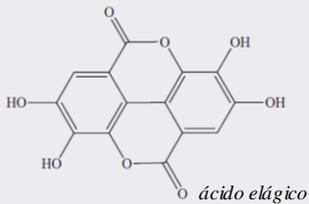
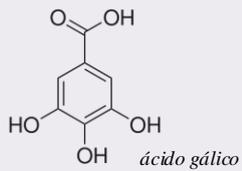
Polifenoles

Flavonoides

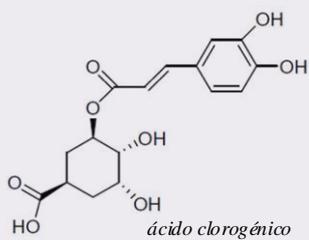
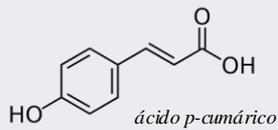


Ácidos fenólicos

Ácidos hidroxibenzoicos



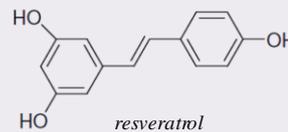
Ácidos hidroxicinámicos



Antocianinas



Estilbenos



Taninos

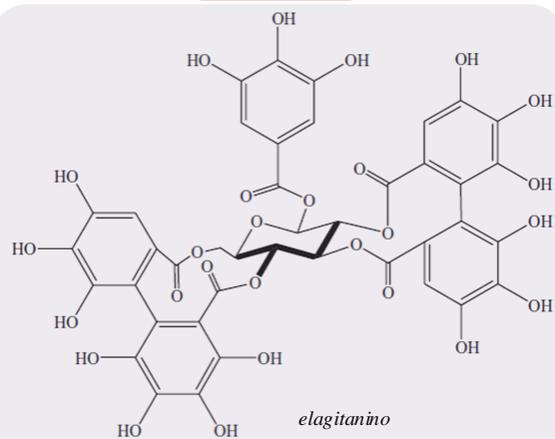


Figura 2.1. Compuestos fenólicos presentes en las berries.

Desde el punto de vista químico, las antocianinas son pigmentos solubles en agua que surgen de un enlace glucosídico entre una aglicona (en este caso una antocianidina) y un glúcido. La aglicona está conformada por dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un anillo heterocíclico (el heterociclo contiene un átomo de oxígeno), y están diferenciadas por la cantidad de grupos oxidrilos que poseen y el grado de metilación de estos últimos (Figura 2.2). En cuanto a los glúcidos, se pueden encontrar glucosa, galactosa, o arabinosa entre los más frecuentes, y el enlace glucosídico se da principalmente en el carbono 3 (Figura 2.3), aunque también pueden desarrollarse en los carbonos 5 o 7. Las antocianinas formadas pueden ser mono-, di- o tri-glucosídicas (Jimenez-Garcia et al, 2013).

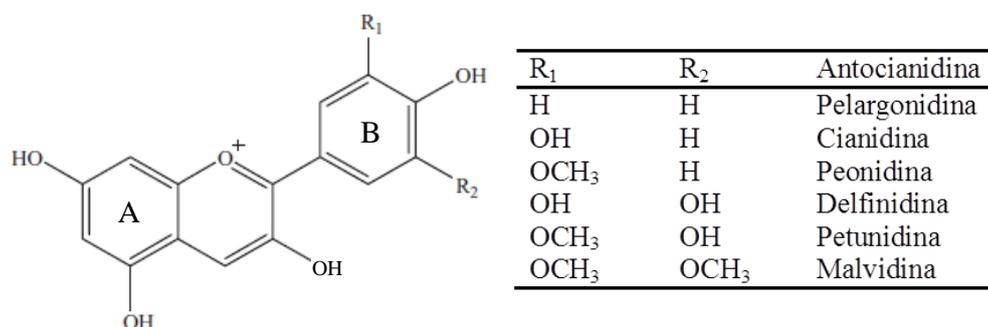


Figura 2.2. Estructura química de la aglicona y antocianinas derivadas según sea la composición de los grupos funcionales R₁ y R₂.

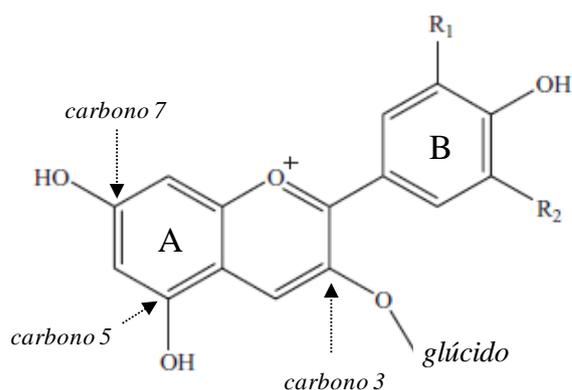


Figura 2.3. Estructura química de una antocianina, donde un glúcido se une en el carbono 3 mediante un enlace glucosídico.

La estabilidad de las antocianinas monoméricas es muy variable dependiendo de su estructura y de la composición del alimento que las contiene (Wrolstad et al., 2005; Delgado-Vargas et al., 2000). La degradación de las antocianinas se produce no sólo durante la extracción del tejido vegetal, sino también durante el procesado y almacenamiento de los tejidos alimentarios. Tanto el tono del pigmento como su estabilidad se ven impactados de manera significativa por los sustituyentes en la aglicona. El aumento de la sustitución glucosídica, y, en particular, la acilación del azúcar con ácido cinámico, aumenta la estabilidad de estos pigmentos (Wrolstad et al., 2005).

Uno de los factores que más incide en la estabilidad de las antocianinas es el pH. En soluciones acuosas (también en los alimentos), las antocianinas pueden existir en cuatro formas estructurales en equilibrio termodinámico: catión flavilio (AH^+), base quinoidal (A), pseudo base carbinol (B) y chalcona (C). La proporción de cada una de estas formas estructurales depende fuertemente del pH (Brouillard, 1982; Fennema, 2001). En la Figura 2.4 se representan las cuatro estructuras mencionadas.

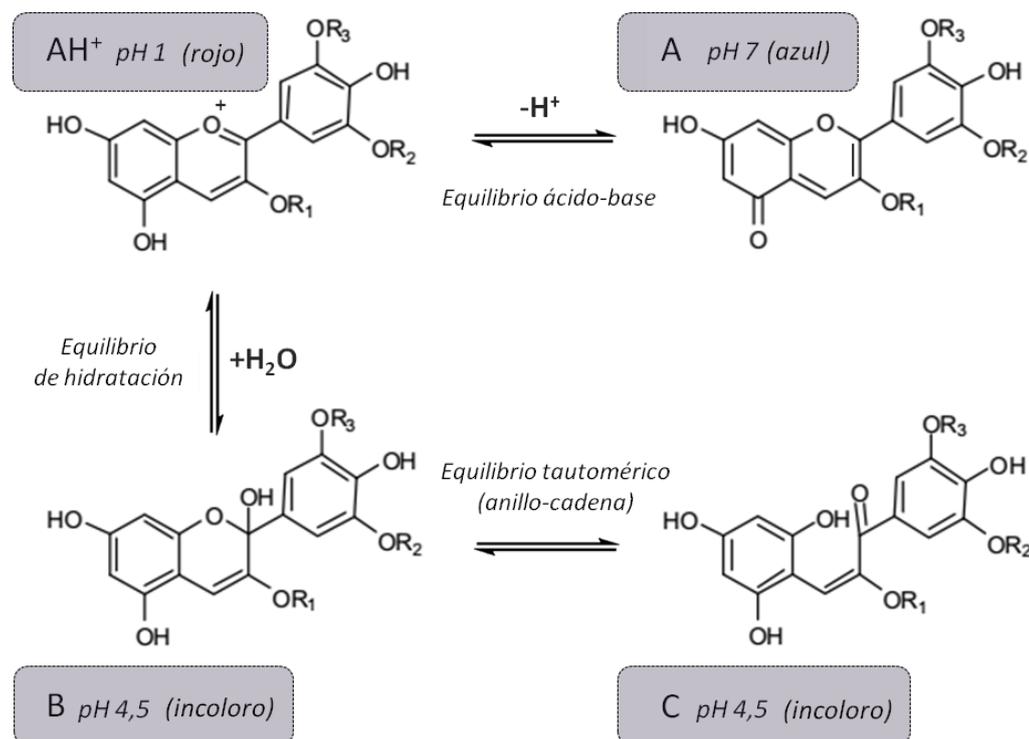


Figura 2.4. Transformación estructural de las antocianinas con el pH. Las cuatro estructuras en equilibrio corresponden a: catión flavilio (AH^+), base quinoidal (A), pseudo base carbinol (B), chalcona (C).

Cuando las antocianinas se encuentran en soluciones acuosas a valores de $\text{pH} < 2$, prácticamente el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable de catión flavilio de color rojo intenso; a valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y la adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudo base carbinol o hemicetal y la forma chalcona, o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras e inestables. A valores de $\text{pH} > 7$ se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. Por lo tanto, en condiciones básicas fuertes se produce daño irreversible en el pigmento con la aparición de una chalcona de color amarillo pálido. Es importante aclarar, que las antocianinas que se encuentren polimerizadas y los pigmentos pardos (productos de la degradación de antocianinas) no exhiben un comportamiento reversible con el pH , por lo tanto no exhiben cambio de color al modificarse el pH del medio.

Otra variable que influye sensiblemente sobre la estabilidad de las antocianinas es la temperatura. Timberlake (1986) observó que el equilibrio entre las estructuras de las antocianinas es endotérmico, en una dirección de izquierda a derecha, es decir que por efecto de altas temperaturas el equilibrio se desplaza hacia las formas incoloras carbinol y chalcona (Figura 2.5). En trabajos de revisión más recientes (Pina et al., 2012 y 2014) detallan el mismo desplazamiento de los sucesivos equilibrios entre las estructuras de las antocianinas, incorporando un equilibrio adicional (de isomerización) entre *cis*-chalcona y *trans*-chalcona. Por lo tanto el tratamiento térmico a altas temperaturas acelera la degradación de las antocianinas, dando como resultado una disminución en la intensidad del color y luego la formación de compuestos poliméricos pardos (Sari et al., 2012).

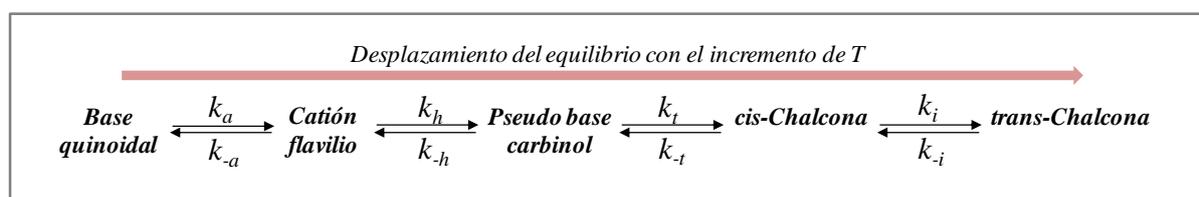


Figura 2.5. Efecto de la temperatura sobre los equilibrios entre distintas estructuras de antocianinas. La letra k representa las constantes cinéticas y los subíndices a , h , t e i , corresponden a ácido base, hidratación, tautomerización e isomerización, respectivamente.

El mecanismo preciso para la degradación de antocianinas no se ha esclarecido totalmente. Se han sugerido diversas rutas de degradación. Una consiste en la transformación

del catión flavilio a base quinoidal, luego en diversos intermediarios y finalmente en el derivado cumarínico (incoloro). Otra ruta comprende la transformación del catión flavilio en la base carbinol incolora, después en chalcona y finalmente en productos poliméricos pardos de degradación (Fennema, 2001).

Por otro lado, las enzimas polifenoloxidasas, peroxidasa y glicosidasas pueden degradar las antocianinas. Estas enzimas pueden ser nativas del tejido vegetal o su fuente puede derivar de contaminación (Wrolstad, Wightman, y Durst, 1994). Por otro lado, la presencia de ácido ascórbico acelera la degradación de las antocianinas (Skrede et al., 2000). La exposición a la luz y al oxígeno promueve la destrucción del pigmento, mientras que la reducción de la actividad acuosa mejora su estabilidad.

Investigaciones más recientes demostraron que las antocianinas presentan una mayor estabilidad debido al desarrollo de un mecanismo denominado “copigmentación” (Sari et al., 2012). La copigmentación, fenómeno que incrementa el color de matrices vegetales que contienen antocianinas, se fundamenta en que las antocianinas son planas y pueden formar asociaciones entre ellas o con otras moléculas denominadas copigmentos, siendo las uniones entre estas moléculas de tipo débil (Zamora, 2003). La reacción se da por la interacción hidrófoba entre los núcleos aromáticos de las antocianinas agrupadas y consiste en la interacción electrónica planar en los grupos cromóforo de las antocianinas. Por lo tanto, el ión flavilio, por su forma planar, es la única especie capaz de copigmentar. Una de las consecuencias de este estado es un efecto hiperacrómico, es decir que provoca la intensificación del color en los tejidos vegetales (Scheffeldt y Hrazdina, 1978). Por tal motivo, el proceso de copigmentación disminuye la luminosidad (L^*) y aumenta la saturación o croma (C^*_{ab}), lo que indica que el color de las antocianinas copigmentadas es más intenso y saturado que el color de matrices con antocianinas monoméricas (Sari et al., 2012). Pero la baja estabilidad de la copigmentación hace que se requieran de grandes concentraciones de copigmentos (Dangle, 1993).

Diferentes compuestos pueden actuar como copigmentos, por ejemplo: ácidos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, nucleótidos, polisacáridos, etc. (Mazza y Brouillard, 1990). Algunos autores postulan que la copigmentación es un paso previo a la formación de uniones más estables, ya que facilita la condensación de las antocianinas con los flavonoles (Brouillard y Dangles, 1994; Boulton, 2001). Según Boulton (2001) un alto nivel de copigmentación inhibe la polimerización debido a que muchos de los flavonoides podrían actuar como cofactores. De esta manera las reacciones de formación de compuestos

poliméricos pardos serían mucho más lentas en una matriz con alto nivel de copigmentación. La copigmentación reduciría el nivel de antocianinas monoméricas libres y la tasa de oxidación de antocianinas y compuestos que actúan como cofactores. Esto protegería a los compuestos de la oxidación y favorecería la formación de pigmentos rojos en lugar de pigmentos pardos (Santos-Buelga, 2001).

Existen diferentes tipos de copigmentación, dependiendo del tipo de copigmento que actúe en la reacción. El término de "copigmentación intermolecular" se refiere a la asociación débil de antocianinas con otros compuestos, modificando así el color y la estabilidad del complejo formado. La copigmentación intermolecular de antocianinas con otros flavonoides produce pigmentos poliméricos coloreados que provocan un incremento en la absorbancia a una longitud de onda visible (efecto hiperocrómico), así como un desplazamiento a longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia (efecto batocrómico). Es bien sabido que el fenómeno de copigmentación intermolecular permite mejorar la estabilidad de las antocianinas monoméricas, porque la formación del complejo de antocianina-copigmento protege el grupo flavilio contra la hidratación, de manera que el cambio de color del cromóforo no es dependiente del pH (Mazza y Miniati 1993). La "copigmentación intramolecular" se refiere al enlace fuerte que forman grupos de ácidos orgánicos con las antocianinas y es la responsable de la estabilidad del color de antocianinas que poseen dos o más grupos acilos aromáticos. El color se intensifica al incrementar el contenido de ácidos orgánicos como el cinámico, malónico y el cítrico.

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

Dada la importancia de los polifenoles y su elevada concentración en los frutos rojos, existen numerosos trabajos abocados a su caracterización. Existen reportes en la bibliografía científica sobre la caracterización del maqui proveniente de distintas zonas geográficas de Chile, sin embargo, son escasos los trabajos con frutos provenientes de Argentina. En este

contexto, el objetivo del presente Capítulo consistió en abordar la caracterización del fruto de maqui de la zona de El Bolsón (Provincia de Río Negro, Argentina) y comparar los resultados obtenidos con los reportados para el fruto de maqui de distintas zonas de Chile, como así también con otros frutos rojos más conocidos. De esta manera se busca resaltar la potencialidad del fruto de maqui que crece en los bosques andino patagónicos de Argentina, en particular el que crece en la zona de El Bolsón, para su aprovechamiento como materia prima en el desarrollo de nuevos productos.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales

Se utilizó maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) recolectado en la zona cordillerana de El Bolsón (provincia de Río Negro, Argentina), adquirido a través de la empresa From Patagonia (<http://www.frompatagonia.com.ar/>). Luego de la recolección, fue congelado mediante congelado rápido individual (IQF) en un túnel de convección a -48 °C y con una velocidad de aire de 1,5 m/s. Finalmente, la fruta fue almacenada a -18 °C hasta el momento de su utilización.

2.2.2. Propiedades fisicoquímicas del fruto de maqui

Humedad

La determinación de humedad se realizó mediante el método oficial 925.09 (AOAC, 1990). Este método consiste en la determinación de la pérdida de peso de la muestra mediante desecación de la misma hasta peso constante en una estufa de vacío Vacucell 111- Standard (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, München, Alemania) a una temperatura de 60 ± 1 °C. Antes de cada pesada las muestras se enfriaron en un desecador conteniendo sílica gel. Los pesos se registraron en una balanza analítica modelo Adventurer (Ohaus, Nueva Jersey, USA) de precisión 0,1 mg. La humedad se expresó como g agua/ 100 g base húmeda (bh).

Sólidos solubles

La determinación de sólidos solubles se realizó de acuerdo a la metodología 932.12 de la AOAC (AOAC, 1990). Se midieron los °Brix de la fracción líquida del fruto de maqui (obtenida mediante triturado y prensado), utilizando un refractómetro modelo PAL-1 (ATAGO, Tokio, Japón).

Acidez total

La acidez total se determinó mediante el método oficial 945.26 (AOAC, 1990). Se diluyó una masa conocida de fruta en aproximadamente 40 ml de agua destilada. La valoración se realizó con una disolución de NaOH 0,1 N (previamente valorada) utilizando fenolftaleína como indicador y controlando el punto final con el pH-metro hasta alcanzar un valor de pH de 8,1, debido a que, al ser la muestra de color oscuro, no se apreciaba claramente el viraje de la fenolftaleína. El resultado se expresó como porcentaje en peso del ácido mayoritario (considerando ácido cítrico en el maqui) en base húmeda, utilizando la siguiente ecuación:

$$AT = \frac{(V_1 \cdot N / 1000) \cdot (M / v) \cdot 100}{m} \quad (2.1)$$

donde AT es la acidez total (g ácido cítrico/100g bh), V_1 es el volumen de NaOH consumido (ml), N corresponde a la normalidad del ácido cítrico, M es el peso molecular del ácido cítrico (g/mol), v es la valencia del ácido cítrico y m es la masa de la muestra (g).

pH

Las medidas de pH se efectuaron mediante el método oficial 945.27 (AOAC, 1990). Se obtuvo una pulpa de la fruta por medio de un mortero y luego se le determinó el pH utilizando un pH metro modelo EA 940 (ORION, Beverly, USA), calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7.

Actividad de agua (a_w)

La actividad acuosa fue determinada por medio de un higrómetro de punto de rocío modelo Series 3 (Aqua-Lab, Decagon Devices Inc., Pullman, Washington, USA), calibrado previamente con disoluciones saturadas de distintas sales.

2.2.3. Propiedades funcionales

Para todas las determinaciones analíticas correspondientes a propiedades funcionales se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible modelo T60 (PG instruments, Leicestershire, Reino Unido). Las determinaciones fueron realizadas sobre alícuotas de un extracto metanólico del fruto de maqui obtenido de la siguiente manera: se pesó 1 g de fruto de maqui, luego se trituró con varilla de vidrio y se realizaron extracciones sucesivas, agregando 10 ml de metanol y manteniendo el sistema en agitación durante 10 min (en cada extracción). Posteriormente, se filtró cada extracto (de manera sucesiva), recogiénolo en un matraz de 50 ml. Se repitió el procedimiento cuatro veces y luego se completó el volumen del matraz con metanol.

A continuación se detallan los procedimientos específicos para cada una de las propiedades funcionales determinadas.

2.2.3.1. Contenido de antocianinas monoméricas (ACY)

Se utilizó el método de pH diferencial propuesto por [Giusti y Wrolstad \(2001\)](#) para la determinación de ACY. Dicho método requiere la preparación de dos soluciones buffer, una de ellas de pH = 1 (cloruro de potasio 0,025 M) y la otra de pH = 4,5 (acetato de sodio 0,4 M). Una alícuota de 1 ml de la muestra a analizar (extracto metanólico del fruto en este caso) se diluyó en 4 ml de cada buffer, fue incubada a temperatura ambiente y al resguardo de la luz durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de ambas diluciones a dos longitudes de onda. Una de las longitudes de onda seleccionada (515 nm), corresponde al máximo de absorbancia identificado por medio de un barrido espectral y la segunda (700 nm) permite corregir interferencias por turbidez. Una vez medidas las absorbancias, se calculó ACY haciendo uso de las [Ecuaciones 2.2 y 2.3](#).

$$ACY = \frac{A \cdot PM \cdot FD \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \quad (2.2)$$

$$A = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (2.3)$$

donde PM es el peso molecular de la antocianina cianidin-3-glucósido (449,2 g/mol), FD es el factor de dilución, l corresponde al paso óptico (1 cm), A es la absorbancia y ϵ representa el coeficiente de extinción molar de la antocianina cianidin-3-glucósido (26.900 L cm⁻¹ mol⁻¹). De esta manera ACY se obtiene en mg cianidin-3-glucosido por litro de extracto metanólico (mg cy-3-glu/1000 ml). Los resultados fueron expresados en mg cy-3-glu/100 g de fruta (en base húmeda).

2.2.3.2. Contenido de polifenoles totales (PT)

El contenido de polifenoles totales fue determinado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu según el método de [Singleton y Rossi \(1965\)](#) con algunas modificaciones. El reactivo de Folin-Ciocalteu, es una mezcla de ácido fosfotúngstico y de ácido fosfomolibdico, que se reduce en medio alcalino por la acción de compuestos fenólicos. En esta condición el reactivo presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 765 nm. La absorbancia medida a dicha longitud de onda es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos. Utilizando ácido gálico como estándar, se construyó la curva de calibración y calculó el contenido de polifenoles totales como mg equivalentes de ácido gálico por litro de extracto metanólico (mg GAE/1000 ml). Luego dicho resultado fue transformado y expresado como mg GAE/100 g de fruta (en base húmeda).

2.2.3.3. Capacidad antioxidante (CA)

La capacidad antioxidante fue determinada por medio del método de la decoloración del radical catión del ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS⁺), de acuerdo a una adaptación de la metodología propuesta por [Coria Cayupán et al. \(2011\)](#). Se preparó, con agua destilada, una solución de ABTS de concentración 7 mM y una solución de persulfato de potasio 2,45 mM. Ambas soluciones se mezclaron en una proporción 1 a 1 e inmediatamente después se incubó la mezcla en oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 h. De esta manera, se generó la solución “stock” del radical catión ABTS⁺, la cual fue diluida con agua destilada hasta alcanzar una absorbancia de $1,00 \pm 0,01$ a 734 nm (longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia de dicha solución). Partiendo de la

solución en estas condiciones, se procedió a agregar la muestra con antioxidantes a analizar (extracto metanólico del fruto de maqui). La adición del extracto produce una disminución de la absorbancia a 734 nm que resulta proporcional a la capacidad antioxidante de dicha muestra. Dicha disminución de la absorbancia avanza a lo largo de un determinado tiempo y luego se estabiliza. Por lo tanto, se monitoreó el avance de la decoloración cada un minuto y se concluyó que 30 min fueron suficientes para garantizar la estabilidad de la absorbancia. De esta manera, se registraron las mediciones de absorbancia a tiempo cero (antes del agregado de muestra) y a tiempo final (30 min desde el agregado de la muestra), luego se determinó el porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ (% In ABTS) mediante la [Ecuación 2.4](#).

$$\% \text{ InABTS} = \left[1 - \left(\frac{A_e}{A_0} \right) \right] \cdot 100 \quad (2.4)$$

donde A_e y A_0 representan la absorbancia en el equilibrio y a tiempo cero, respectivamente. Finalmente, se construyó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar, que permitió transformar los %In ABTS en mg equivalentes de ácido gálico por litro de extracto metanólico, y posteriormente por unidad de masa de fruta en base húmeda.

2.2.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En el presente trabajo se utilizó la técnica de FTIR en modo de reflectancia total atenuada (ATR) (espectrofotómetro Alpha-Platinum Brunner, Alemania). Los espectros fueron obtenidos en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} . La muestra (fruto de maqui liofilizado y triturado) fue escaneada 32 veces, correspondiendo el espectro reportado al promedio.

2.2.5. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Se utilizó la técnica HPLC (Agilent 1260, Agilent Technologies, USA) para identificar compuestos fenólicos del fruto de maqui. Con este propósito, se emplearon un extracto metanólico (preparado según lo descrito en la sección 2.2.3) y estándares de 11 polifenoles, los cuales se detallan en la [Tabla 2.1](#). El equipo contó con un detector de índice de refracción (RID) y un detector de arreglo de diodos (DAD). Para la determinación de polifenoles se trabajó con el detector DAD (señal A = 280 nm, señal B = 323 nm, señal C = 365 nm y señal D = 520 nm), y con una columna C18 (ZORBAX eclipse XDB, Agilent Technologies, USA)

de dimensiones 4,6 x 100 mm y tamaño de partícula de 3,5 micrones. La temperatura de operación de la columna fue de 25 °C. Como fase móvil se utilizaron los solventes agua, metanol y ácido fórmico, dispuestos en gradiente.

Tabla 2.1. Polifenoles utilizados en la caracterización por HPLC.

Polifenoles	Grupo principal	Subgrupo	Marca
Delfinidin-3-glu	Flavonoide	Antocianina	Santa Cruz
Cianidin-3-glu	Flavonoide	Antocianina	Santa Cruz
Quercetina	Flavonoide	Flavonol	Merck
Rutina	Flavonoide	Flavonol	Fluka
Catequina	Flavonoide	Flavan-3-ol	Sigma
Ácido gálico	Ácido fenólico	Ácido hidroxibenzoico	Sigma
Ácido elágico	Ácido fenólico	Ácido hidroxibenzoico	Santa Cruz
Ácido p-cumárico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Fluka
Ácido cafeico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Fluka
Ácido ferúlico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Fluka
Ácido clorogénico	Ácido fenólico	Ácido hidroxicinámico	Aldrich

2.2.6. Antocianinas: efecto del pH sobre el color

Se trabajó con un extracto acuoso de maqui de alta concentración de antocianinas (ACY = 2839 ± 43 mg cy-3glu/1000 ml), tomando una alícuota del mismo y combinándola con soluciones acuosas en el rango de pH desde 1 hasta 13. Las soluciones de pH ácido se realizaron con ácido clorhídrico y las de pH básico con hidróxido de sodio (en ambos casos se realizaron las diluciones correspondientes ajustando el pH). Se agregó 30 μ l de extracto acuoso de maqui a 5000 μ l de solución con pH ajustado. El volumen de extracto de maqui fue ajustado de manera que la absorbancia máxima a 515 nm sea < 1 de (validez de la ley de Lambert y Beer). Luego se realizaron barridos espectrales utilizando el mismo equipo espectrofotómetro UV/Vis de las determinaciones de compuestos bioactivos, en el rango de 780 nm hasta 280 nm.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas del fruto de maqui determinadas en el presente trabajo se muestran en la [Tabla 2.2](#). El valor de acidez total obtenido fue similar al reportado por [Brauch et al. \(2016\)](#) correspondiente a maqui chileno ([Tabla 2.3](#)), siendo a su vez similar al que presentan otras berries como zarzamora y frambuesa. Se destacan los valores de humedad significativamente menores (y mayor concentración de sólidos solubles), tanto del maqui de este trabajo como del maqui analizado por otros autores ([Gonzalez et al., 2015](#)), en comparación con el resto de las berries que presentan humedades en el rango de 74-92% ([Tabla 2.3](#)). En el trabajo de [González et al. \(2015\)](#) se estudiaron distintas propiedades del maqui (muestras de las temporadas 2010-2013 provenientes de Talca, Chile), a lo largo del proceso madurativo y posteriormente con distintos métodos de conservación poscosecha. Reportaron niveles entre 63 % y 66 % de humedad a lo largo del proceso madurativo llegando a niveles del 50 % en el fruto maduro cosechado, y sólidos solubles en torno a 24,5 °Brix al momento de recolección del fruto. Luego, al conservarlo mediante congelado a -20 °C la humedad fue estable a niveles del fruto maduro cosechado, y los sólidos solubles se incrementaron a 30-35 °Brix. Estos resultados son comparables a los obtenidos en el presente trabajo. El hecho de que el fruto de maqui tenga baja humedad hace inviable cualquier proceso que implique la utilización directa de sus jugos y plantea la necesidad de realizar extracciones para recuperar los compuestos bioactivos. Por este motivo, en el [Capítulo 3](#), se estudia el proceso de extracción acuosa del maqui.

Tabla 2.2. Propiedades fisicoquímicas del fruto de maqui.

Propiedad	Media ± des. estándar
Humedad (g H ₂ O/100 g bh)	45,40 ± 0,03
Sólidos solubles (°Brix a 20°C)	38,27 ± 0,51
Acidez (g ácido cítrico / 100 g bh)	1,91 ± 0,65
pH	3,90 ± 0,01
a _w	0,924 ± 0,009

bh: base húmeda.

Tabla 2.3. Propiedades fisicoquímicas de distintas berries reportadas en bibliografía.

Berry	Humedad (%)	Sólidos solubles (°Brix)	aw	pH	Acidez total (g ác. cítrico/100 g bh)	Referencias
Maqui	50	30-35	-	-	-	Gonzalez et al. (2015)
	61,8	-	-	-	2	Brauch et al. (2016)
Frambuesa	85	8,8	0,970	3,13	1,78	Sette et al. (2015)
Cassis	74,1	16,7	-	2,83	3,02	Archaina et al. (2018)
	-	13,5	0,983	3,42	-	Casati et al. (2012)
Zarzamora	83,5	9,06	0,984	3,03	1,88	Franceschinis et al. (2014)
Sauco	82	10,4	-	4,20	1,02	Gagneten et al. (2019)
	-	11,8	0,987	3,63	-	Casati et al. (2012)
Arándano	-	15,6	0,979	3,54	-	Casati et al. (2012)
Frutilla	84,67 - 91,85	4,10 – 4,98	-	3,59 - 3,77	0,50 - 0,74	Akhatou y Fernández Recamales (2014)

bh: base húmeda.

2.3.2. Compuestos bioactivos

2.3.2.1. Caracterización por técnicas espectrofotométricas: polifenoles totales, antocianinas monoméricas totales y capacidad antioxidante

Se han reportado estudios de maqui de distintas zonas de Chile que concluyen que la concentración de compuestos bioactivos es alta y que los valores encontrados presentan una importante variabilidad. Por ejemplo, Vogel et al. (2014) señalan que el maqui se adapta a las altas radiaciones durante el verano en la zona central de Chile mediante la síntesis de polifenoles, en especial de antocianinas. Estos compuestos protegen a las semillas dentro del fruto del daño causado por la radiación ultravioleta. Junto con los niveles de radiación solar, otros factores ecosistémicos también inciden en las concentraciones de compuestos bioactivos explicando la variabilidad en el fruto silvestre. Por otro lado, Fredes et al. (2014 a) estudiaron el contenido de polifenoles, y en especial de antocianinas, en maqui silvestre de cuatro zonas geográficas de Chile que difieren marcadamente en latitud, altura respecto al nivel del mar, media anual de lluvias y de temperatura (Puchuncavi, Paredones, Talca y Pucón), y en dos temporadas de crecimiento consecutivas. Respecto a las antocianinas monoméricas obtuvieron valores en el rango de 660 – 1500 mg cy-3glu / 100 g de fruta, mientras que en polifenoles totales el rango fue de 1070 – 2050 mg GAE / 100 g de fruta. Dicha variabilidad

fue atribuida a diferencias medioambientales y de genotipo. González et al. (2015) también estudiaron la concentración de polifenoles, reportando resultados entre 714 -1100 mg GAE / 100 g de fruta. Las concentraciones de polifenoles totales y de antocianinas monoméricas totales obtenidas en esta Tesis, que se presentan en la Tabla 2.4, se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura para el fruto de maqui.

Realizando la comparación con otras berries (Tabla 2.5), el maqui se destaca por el importante contenido de polifenoles y antocianinas que posee, superando ampliamente al de otras frutas finas, lo que se refleja en una elevada capacidad antioxidante (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Compuestos bioactivos del fruto de maqui.

Propiedad	Media ± desviación estándar
ACY (mg cy-3glu /100 g bh)	949 ± 64
PT (mg GAE /100 g bh)	1286 ± 105
CA (mg GAE /100 g bh)	427 ± 80

bh: base húmeda.

Tabla 2.5. Contenido de antocianinas y polifenoles en berries.

Berry	ACY (mg cy-3glu / 100 g bh)	PT (mg GAE /100 g bh)	Referencias
Arándano	63 - 235	181 - 473	Szajdek y Borowska (2008)
Frambuesa	81	236	Sette et al. (2015)
	19 - 51	192 – 359	Anttonen y Karjalainen (2005)
Cassis	34	174	Gagneten et al. (2019)
	-	318	Borowska y Szajdek (2003)
	170	288	Archaina et al. (2017)
Sauco	242	432	Gagneten et al. (2019)
	230	731	Gagneten et al. (2019)
Zarzamora	106	146	Franceschinis et al. (2014)
	-	417 - 555	Sellappan et al. (2002)
Frutilla	-	317 – 443	Skupien y Oszmiansky (2004)
	20	102	Zheng et al. (2007)

bh: base húmeda.

2.3.2.2. Caracterización por FTIR y HPLC

Las especies moleculares con momento dipolar distinto de cero pueden absorber radiación de la zona del infrarrojo (IR) modificando los estados vibracionales y rotacionales de sus enlaces. Estos cambios en los estados vibracionales y rotacionales de los enlaces involucran pequeños cambios energéticos, los cuales son específicos de cada grupo funcional y pueden ser registrados en un espectro de absorción IR (Skoog, Holler y Nieman, 2001). De esta manera la espectroscopía infrarroja permite identificar grupos funcionales presentes en la muestra analizada, y en particular es ampliamente utilizada para detectar la presencia de polifenoles (Bauer et al., 2008). Esta técnica posee algunas ventajas frente a la utilización de técnicas cromatográficas como HPLC (tiempos de análisis más rápidos, mayor simpleza en la preparación de muestras, menores costos, entre otras) (Bureau et al., 2019). Sin embargo, está limitada a caracterizaciones cualitativas de la muestra, y debe ser complementada con técnicas cromatográficas si se desea conocer con mayor precisión la composición de la muestra de interés. Por lo tanto, ambas técnicas (FTIR y HPLC) se utilizaron de manera complementaria.

En el espectro IR del maqui (Figura 2.6) se pudieron observar distintas zonas en torno a 3250, 2941, 1703, 1605 y 1010 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de tensión, y múltiples picos en la franja entre 1500-1200 cm^{-1} atribuibles a vibraciones de flexión, de distintos enlaces presentes en polifenoles (Silva et al., 2014; Tarantilis et al., 2008).

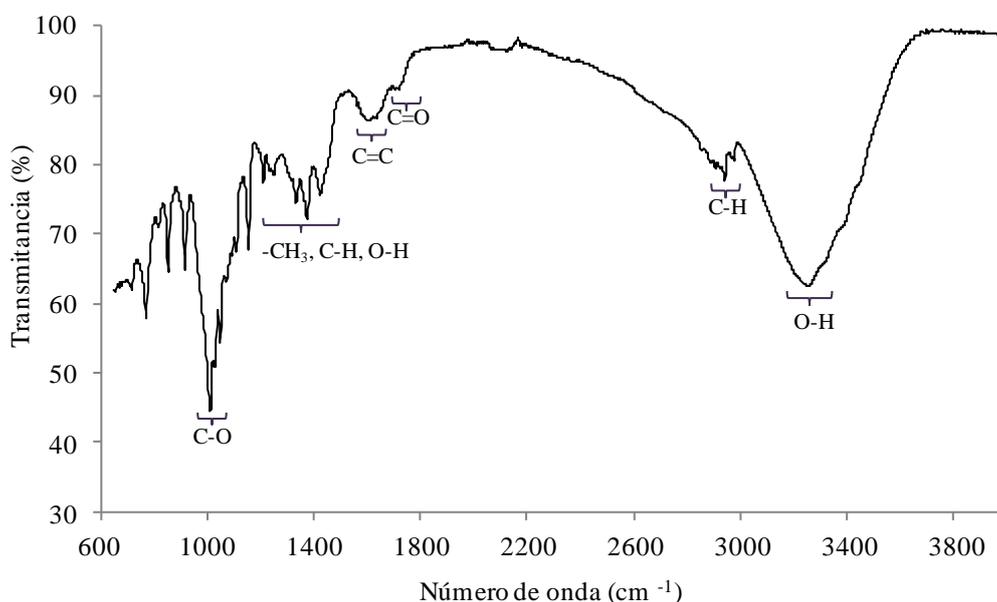


Figura 2.6. Espectro infrarrojo del fruto de maqui. Se encuentran indicadas las vibraciones de tensión de distintos enlaces presentes en los compuestos fenólicos.

De acuerdo a los trabajos mencionados anteriormente, la zona entre 1800-900 es la “huella digital” del espectro IR, siendo esta la zona de mayor interés para la identificación de las muestras. En dicho intervalo del espectro se puede observar la presencia de los grupos C=O, C=C y C-O (vibraciones de tensión), junto con los grupos -CH₃, C-H y O-H (vibraciones de flexión), característicos de los anillos aromáticos presentes en los polifenoles. De esta manera, se corroboró de forma directa la existencia de compuestos fenólicos mediante la técnica de FTIR.

Mediante HPLC se buscó discernir qué subgrupos o compuestos específicos caracterizan el perfil de polifenoles del maqui. Teniendo en cuenta los estándares utilizados (ver [Tabla 2.1](#)), se observaron los siguientes resultados:

- Flavonoides: se identificó delfinidin-3-glucósido y cianidin-3-glucósido (subgrupo antocianinas), quercetina y rutina (subgrupo flavonoles), y no se detectó catequina (subgrupo flavan-3-oles).
- Ácidos fenólicos pertenecientes al subgrupo de ácidos hidroxibenzoicos: se identificó ácido elágico y no se detectó ácido gálico.
- Ácidos fenólicos pertenecientes al subgrupo de ácidos hidroxicinámicos: se identificó ácido p-cumárico y no se detectaron los ácidos cafeico, ferúlico y clorogénico.

Dada la importancia de las antocianinas en el fruto de maqui, tanto en términos cuantitativos como cualitativos, a continuación se divide el análisis de los resultados en polifenoles no-antociánicos y antociánicos.

Polifenoles no-antociánicos

[Genskowsky et al. \(2016\)](#) trabajaron con maqui de la región de Biobío (Chile) caracterizando el perfil de polifenoles. En su trabajo indican que los grupos principales de polifenoles no-antociánicos del maqui corresponden a los flavonoides y a los ácidos fenólicos. Dentro de los flavonoides, detectaron quercetina y rutina, junto con glucósidos de miricetina (subgrupo flavonoles) y no reportaron la presencia de ningún flavan-3-ol. En cuanto a los ácidos fenólicos, identificaron el ácido elágico e indicaron ausencia de los ácidos gálico, cafeico y clorogénico. Estos resultados son coincidentes con el trabajo de caracterización de maqui de la región de Aysén (Chile) realizado por [Brauch et al. \(2016\)](#). Estos autores indicaron la presencia de quercetina, miricetina, kaempferol, ácido elágico, y la ausencia de

ácidos hidroxicinámicos. Por otro lado, [Rodríguez et al. \(2016\)](#), a diferencia de los estudios mencionados anteriormente, reportaron la presencia de ácido p-cumárico y de catequina.

En la [Figura 2.7](#) se muestran los cromatogramas correspondientes a los polifenoles no-antociánicos identificados en el presente trabajo (comparando tiempos de elución con estándares). El hecho de haber determinado la presencia de quercetina, rutina y ácido elágico, junto con la ausencia de catequina, y los ácidos gálico, ferúlico, cafeico y clorogénico, mostró una fuerte concordancia con los resultados obtenidos por [Genskowsky et al. \(2016\)](#) y [Brauch et al. \(2016\)](#).

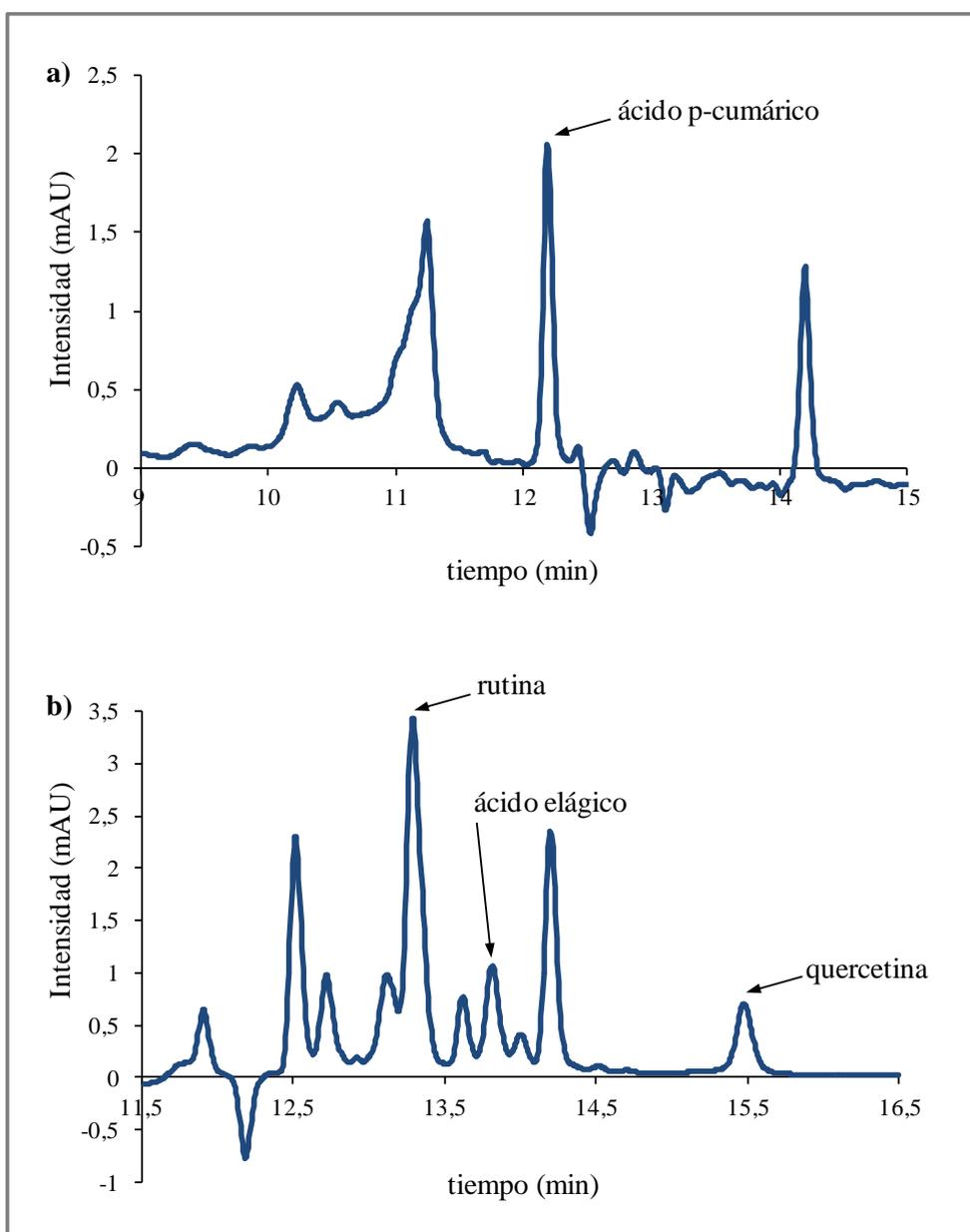


Figura 2.7. Cromatogramas de HPLC correspondientes al fruto de maqui. Señales del detector DAD: a) 323nm y b) 365 nm.

Cabe mencionar que los autores previamente citados determinaron además, entre 5 y 8 derivados de quercetina, y entre 2 y 3 derivados de miricetina los cuales integran el subgrupo de flavonoles. Todos estos flavonoles fueron detectados en el mismo cromatograma (señal de 360 nm de acuerdo a sus trabajos) acompañando a la quercetina, la rutina y el ácido elálgico de manera análoga a los siete picos no identificados en la [Figura 2.7 b](#). Por lo tanto, si bien en este trabajo estos derivados no pudieron ser identificados mediante el uso de estándares, en base a los estudios citados previamente es posible suponer que los siete picos mencionados corresponden a derivados de quercetina y miricetina.

Polifenoles antociánicos

Se observaron cinco picos en el cromatograma correspondiente a la señal del detector DAD a 520 nm ([Figura 2.8](#)) utilizada para detectar antocianinas. Los picos 1 (cianidin-3-glucósido) y 2 (delfinidin-3-glucósido) fueron identificados de manera directa utilizando los respectivos estándares.

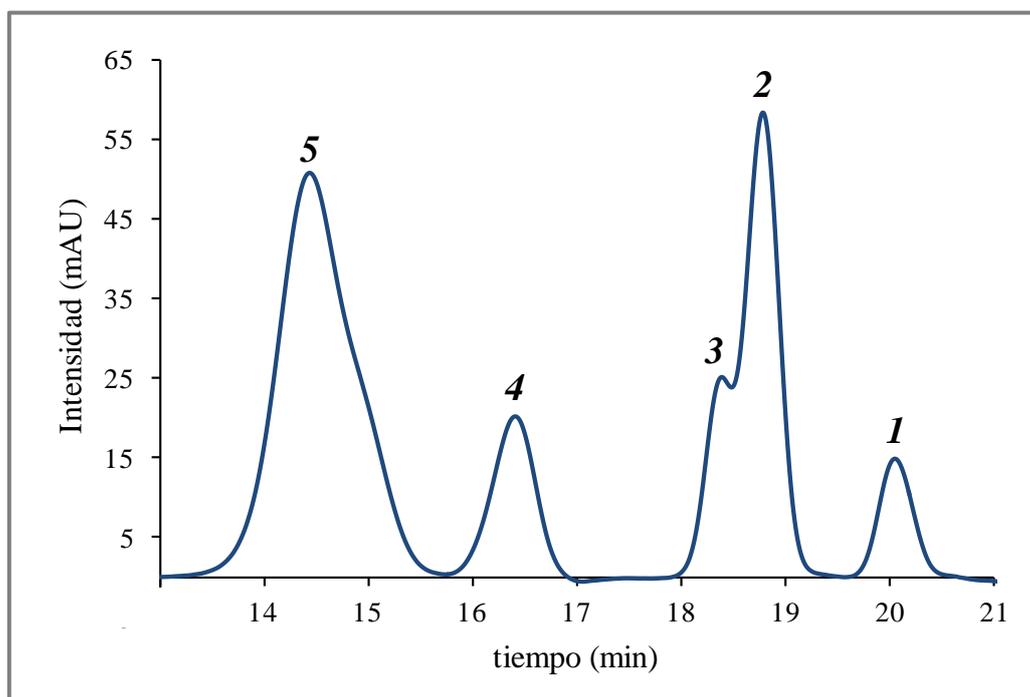


Figura 2.8. Cromatograma correspondiente al fruto de maqui (detector DAD 520 nm): 1 = cianidin-3-glucósido, 2 = delfinidin-3-glucósido, picos 3, 4 y 5 no identificados con estándares.

Para poder realizar una identificación aproximada de los picos 3, 4, y 5 se utilizaron distintas vías de análisis siguiendo el trabajo de [Escribano-Bailón et al. \(2006\)](#), en el se caracterizó el perfil de antocianinas del fruto de maqui contando con dos estándares. Estos autores plantearon como punto de partida para la identificación tentativa de los picos para los cuales no contaban con estándares, la utilización de: 1) los espectros de absorción UV-visible de los distintos picos del cromatograma, y 2) la relación entre la diferencia de polaridad de las antocianinas y el orden de elución observado en el cromatograma. En el presente trabajo el equipo de HPLC suministró los espectros de absorción UV-visible para cada uno de los cinco picos observados ([Figura 2.9](#)). Los espectros de la [Figura 2.9 a y b](#) corresponden a cianidin-3-glucósido y delphinidin-3-glucósido, respectivamente. Dichos espectros muestran la forma propia de los espectros de las antocianinas, con un máximo de absorción a una longitud de onda entre 490 nm y 550 nm, y otro máximo entre 260 nm y 280 nm ([Giusti y Wrolstad, 2001](#)). Al comparar estos espectros con los correspondientes a los picos 3, 4 y 5 ([Figura 2.9 c, d y e](#), respectivamente), fue posible concluir:

- Se corroboró rápidamente que los espectros de los picos 3, 4 y 5 poseían la forma típica de las antocianinas, siendo muy similares a los espectros de los picos 1 y 2.
- Se observó que los máximos de absorción de los picos 1 (516 nm) y 4 (518 nm), fueron muy próximos ([Figura 2.9 f](#)), corroborándose el mismo hecho para el caso de los picos 2 (526 nm), 3 (528 nm) y 5 (524 nm) ([Figura 2.9 g y h](#)). Por lo tanto, puede sugerirse que los picos 1 (cianidin-3-glucósido) y 4 son glucósidos derivados de cianidina, y los picos 2 (delphinidin-3-glucósido), 3 y 5 son glucósidos derivados de delphinidina.
- Se verificó la existencia de un “hombro” en torno a los 440 nm (a la izquierda del máximo de absorción) para los picos 1, 2 y 3. Dicho “hombro” es propio de los mono-glucósidos con el enlace glucosídico en el carbono 3 de la antocianina ([Santos-Buelga et al., 2003](#)). Los di-glucósidos que poseen enlaces glucosídicos en los carbonos 3 y 5 no presentan el “hombro” ([Escribano-Bailón et al., 2006](#)).

Por otro lado, los di-glucósidos son más polares que los mono-glucósidos, lo cual hace que los di-glucósidos presenten un tiempo de elución a través de la columna cromatográfica menor al de los mono-glucósidos ([Escribano-Bailón et al., 2006](#)). De esta manera los picos 4 y 5 podrían ser di-glucósidos y los picos 1, 2 y 3 mono-glucósidos, manteniendo coherencia con la identidad de los estándares y lo analizado en el caso de los espectros UV-visible.

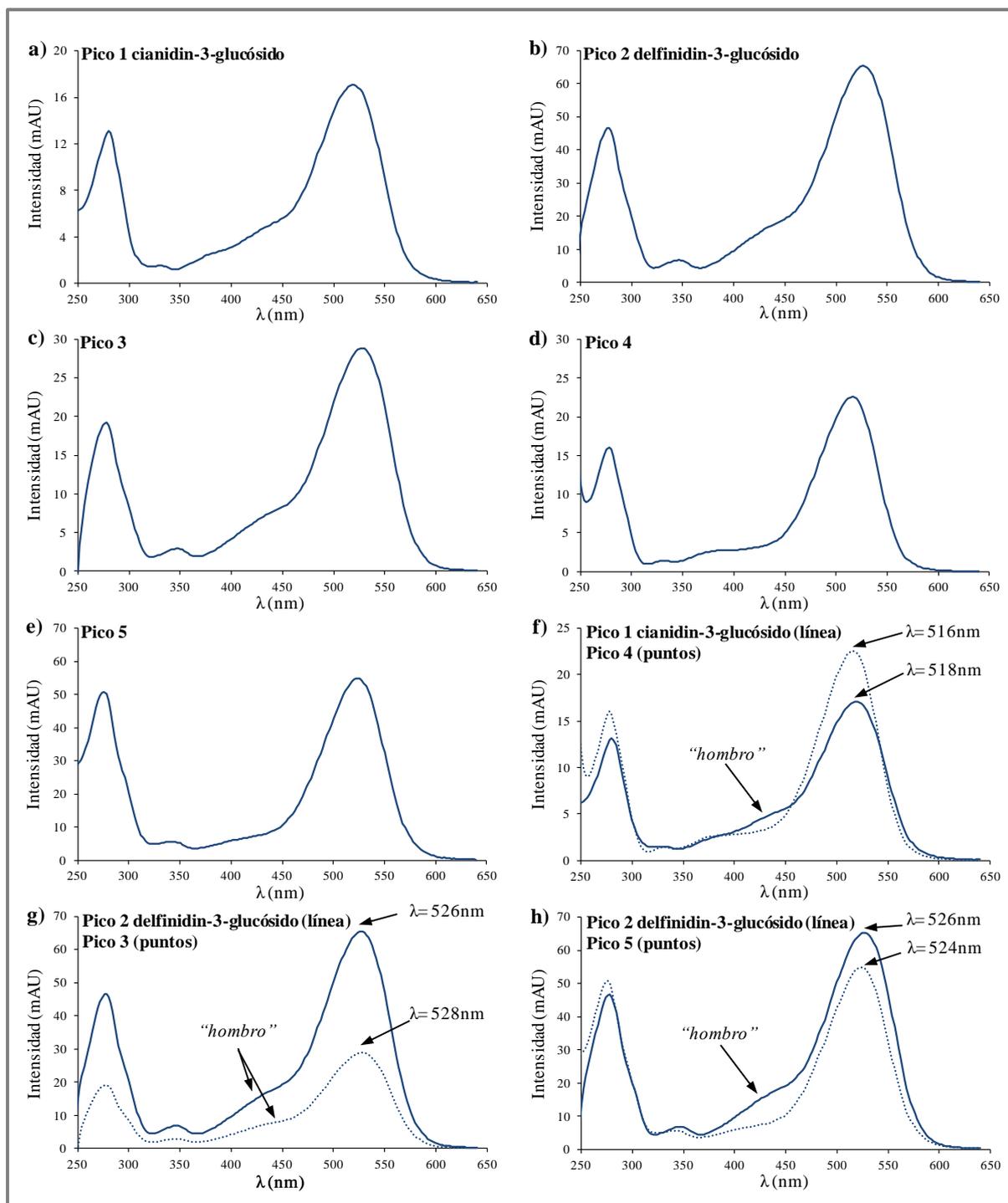


Figura 2.9. Espectros de absorción UV-visible de los cinco picos del cromatograma (HPLC) de antocianinas: a) cianidin-3-glucósido, b) delphinidin-3-glucósido, c) pico 3, d) pico 4, e) pico 5, f) comparación pico 1 y 4, g) comparación pico 2 y 3, y h) comparación pico 2 y 5.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta aquí, es posible identificar tentativamente a los picos 3, 4 y 5 de la siguiente manera: el pico 3 correspondería a un mono-glucósido de delphinidina con enlace glucosídico en el carbono 3, el pico 4 a un di-glucósido de cianidina, y

el pico 5 a un di-glucósido de delfinidina. Esta identificación tentativa es consistente con los resultados reportados en múltiples estudios de caracterización del perfil de antocianinas del maqui (Escribano-Bailón et al., 2006; Fredes et al., 2014 a; Genskowsky et al., 2016; Brauch et al., 2016 y 2017). En dichos estudios destacan a los glucósidos de delfinidina y de cianidina como los mayoritarios, en particular los mono-glucósidos y di-glucósidos de delfinidina y cianidina presentados en la [Figura 2.10](#).

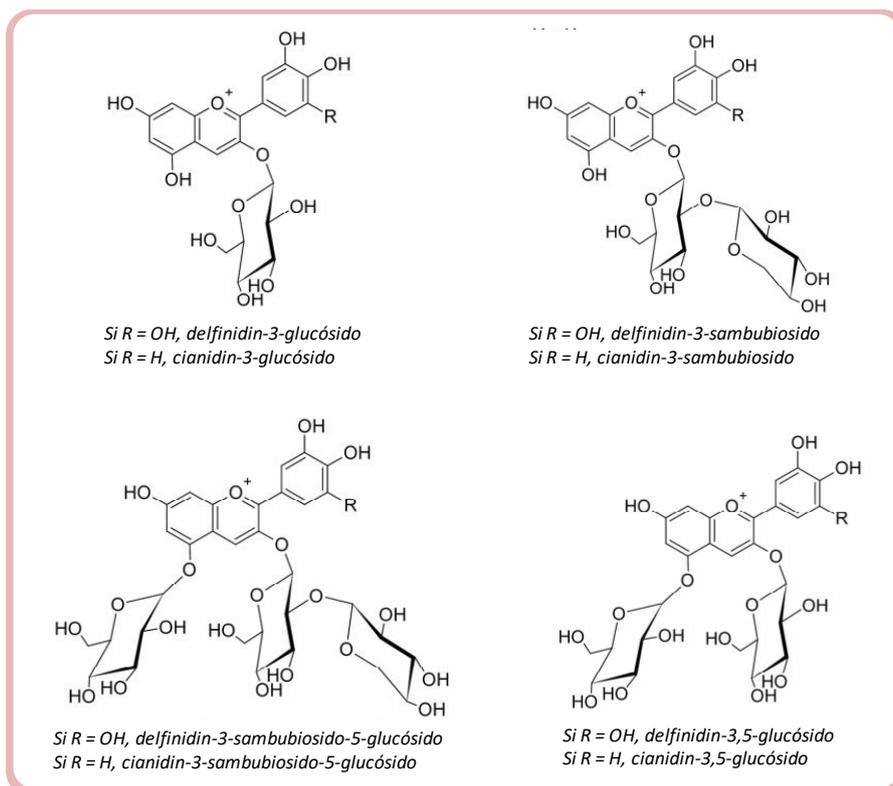


Figura 2.10. Antocianinas que se encuentran en mayor concentración en el fruto de maqui.

Se puede observar que los únicos dos mono-glucósidos de delfinidina identificados en todos los estudios sobre el fruto de maqui han sido delfinidin-3-glucósido y delfinidin-3-sambubiosido. Por lo tanto, dado que el pico 3 corresponde a un mono-glucósido de delfinidina con enlace glucosídico en el carbono 3, se propone tentativamente que dicho pico corresponde a delfinidin-3-sambubiosido. Por último cabe señalar que es frecuente observar que no se logra una separación de picos mediante HPLC para los di-glucósidos, razón por la cual se atribuye a un solo pico dos di-glucósidos. Por lo tanto, se debe recurrir a otras técnicas experimentales para poder completar la identificación (Brauch et al., 2016; Fredes et al., 2014 a y 2018). En dichos trabajos se les atribuyó un mismo pico del cromatograma a los di-glucósidos cianidin-3,5-glucósido y cianidin-3-glucósido-5-sambubiosido. Por tal motivo, los

picos 5 y 4 obtenidos en este trabajo serán identificados tentativamente como di-glucósidos de delphinidina y di-glucósidos de cianidina, respectivamente. La Figura 2.11 muestra la caracterización final establecida para el perfil de antocianinas. Los glucósidos de delphinidina representaron el 83 % del contenido total de antocianinas, mientras que los de cianidina constituyeron el 17 %. En cuanto a la proporción de mono-glucósidos y di-glucósidos los porcentajes fueron 40 % y 60 %, respectivamente. Estos porcentajes corresponden a un análisis realizado a través de la comparación de las áreas de los picos relativas a la suma de todos los picos del perfil de antocianinas (área =100%).

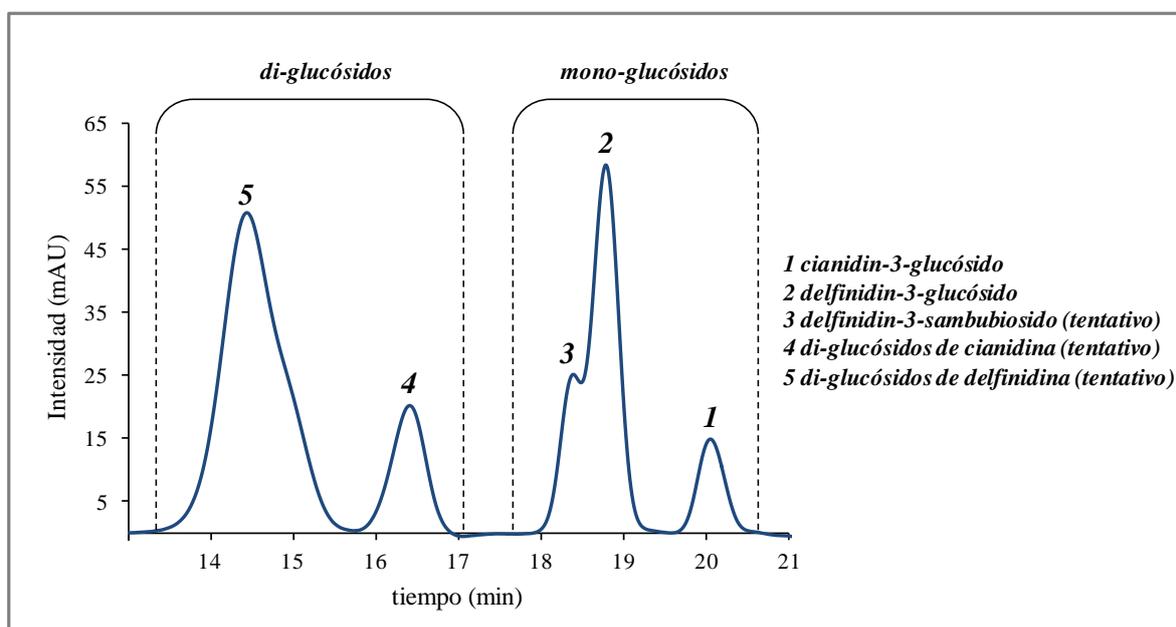


Figura 2.11. Caracterización del perfil de antocianinas.

De esta manera, es posible concluir que el maqui que crece en la zona de El Bolsón es similar a los frutos de maqui de distintas zonas de Chile, tanto en los rangos de PT y ACY, como en el perfil de polifenoles. Dentro de los flavonoides se destaca la presencia de antocianinas (mayoritariamente glucósidos de delphinidina), y dentro de los flavonoles se observan rutina y otros derivados de quercetina y miricetina. En cuanto los ácidos fenólicos, los mayoritarios fueron el ácido p-cumárico y el ácido elágico.

2.3.3. Antocianinas: efecto del pH sobre el color

Las antocianinas y antocianidinas poseen muchos dobles enlaces en sus estructuras, y justamente son estos electrones los que son fácilmente excitados al interactuar con la luz

visible dando sus colores característicos. La [Figura 2.12](#) muestra cómo se incrementa la tonalidad azulada o rojiza en el conjunto de antocianidinas mayoritarias. Se puede observar que estos cambios de tonalidades dependen de la cantidad de grupos oxidrilo (-OH) o metoxilo (-OCH₃) presentes en el anillo B de la antocianidina. Ambos grupos son auxocromos dadores de electrones y producen un efecto batocrómico (aumento en la longitud de onda de absorción) ([Fennema, 2001](#)). Si se aumenta la cantidad de oxidrilos se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos incrementa el color rojo ([Badui Dergal, 2006](#)).

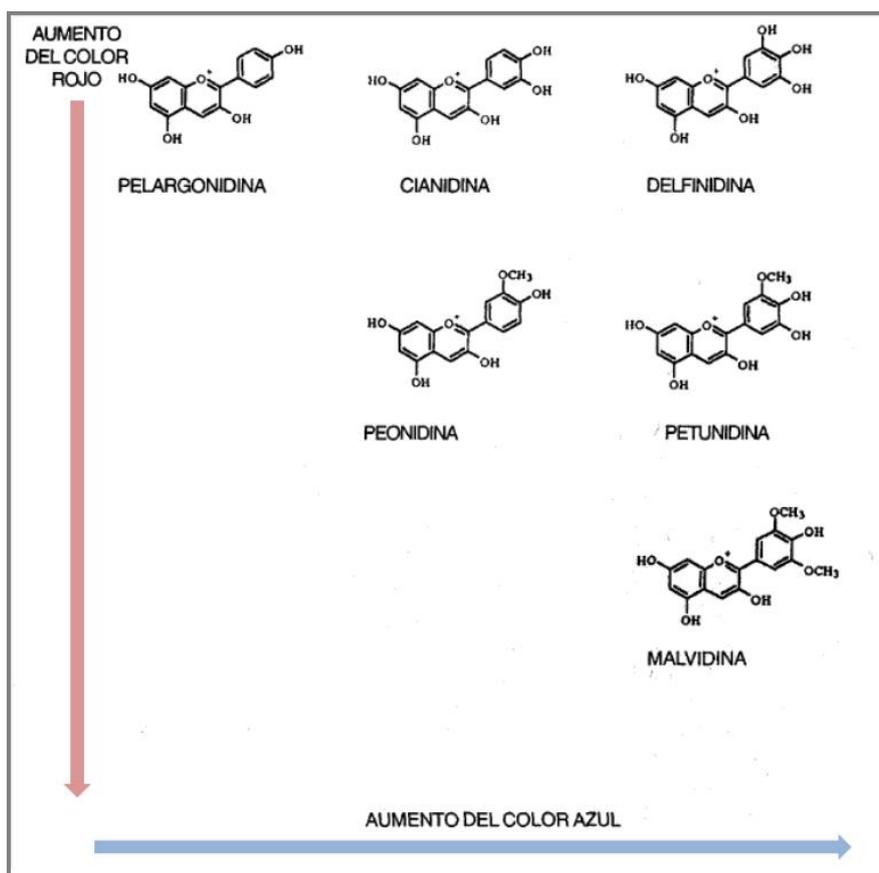


Figura 2.12. Aumento de tonalidad azulada y rojiza de las antocianidinas más comunes en la naturaleza. Figura extraída y adaptada de [Fennema \(2001\)](#).

Como se ha observado anteriormente, la concentración de las antocianinas en el maqui es muy elevada y se destaca por sobre las demás berries. Las antocianinas son las principales responsables de su color púrpura característico, que se debe en particular a la presencia de glucósidos de delphinidina (tonos azulados) y cianidina (tonos rojizos). Así, el fruto de maqui se convierte en una interesante fuente de pigmentos para ser utilizados como colorantes naturales.

Además de la composición específica de antocianinas del fruto y de cuáles son las tendencias generales de las antocianidinas en cuanto a su color, se debe tener en cuenta que existen múltiples factores que inciden en dicha propiedad física (cambios estructurales con el pH, formación de complejos metálicos, copigmentación, entre otros) (Castañeda-Ovando et al., 2009). En la presente sección se estudia el efecto del pH sobre el color, con el objeto de comprender la estabilidad del mismo para evaluar la factibilidad del uso de la materia prima como colorante natural.

En la Figura 2.13 se presentan los barridos espectrales obtenidos para los extractos acuosos de maqui en el rango de pH desde 1 hasta 13 y en la Figura 2.14 se muestra la gama de colores obtenida.

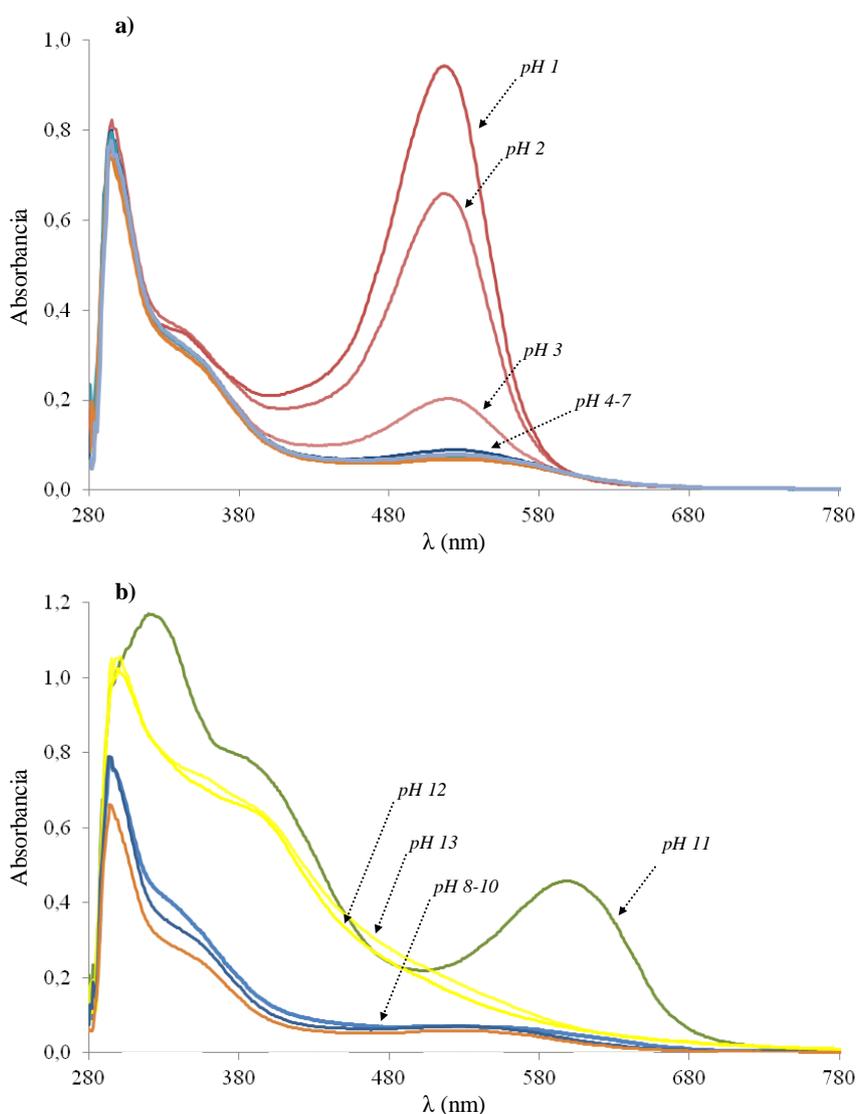


Figura 2.13. Barridos espectrales (UV-visible) de extractos de maqui ajustados a distintos pH: a) intervalo de pH 1-7, b) intervalo de pH 8-13.



Figura 2.14. Gama de colores de extractos de maqui ajustados a distintos pH.

Al variar el pH desde 1 hasta 7 (Figura 2.13 a) se puede observar una disminución de la absorbancia a $\lambda = 515$ nm. A dicha longitud de onda se manifiesta el máximo de absorción del catión flavilio (en este caso del conjunto de cationes flavilio de las distintas antocianinas dado que no es una muestra pura de una sola antocianina). La disminución de la absorbancia se debe a la disminución de la concentración de dicho catión al desplazarse el equilibrio termodinámico hacia la pseudo base carbinol, la chalcona, y/o la base quinoidal. El desplazamiento termodinámico es distinto para cada tipo de antocianina. Si la estructura predominante hacia la cual se desplaza el equilibrio es la base quinoidal, el viraje será de rojo a azul, en cambio si las estructuras predominantes son la pseudo base carbinol o la chalcona,

el viraje de color será de rojo a incoloro (Fennema, 2001; Brouillard, 1982). En el presente estudio, el viraje observado (de rojo a incoloro al ir de pH = 1 hasta pH = 7), podría indicar que al aumentar el pH predominan las estructuras pseudo base carbinol o la chalcona.

El otro máximo de absorción en este rango de pH, se encuentra en la zona ultravioleta del espectro en torno a $\lambda = 290$ nm y presenta poca variación. Este máximo de absorción es típico de los compuestos fenólicos (Fennema, 2001).

En el rango de pH desde 8 a 13 (Figura 2.13 b) se observa un viraje de color desde incoloro hasta amarillo, pasando por verde a pH 11. Sin embargo cabe aclarar que dicho color verde fue inestable y luego de aproximadamente una hora se volvió amarillo (similar a los colores a pH 12 y 13). El equilibrio entre carbinol y chalcona se desplaza hacia la chalcona a pH alcalino, y sumado a esto, la chalcona puede ionizarse siendo más estable dicha estructura (Brouillard, 1982). La chalcona ionizada es amarilla, y por lo tanto puede ser la responsable del viraje de color observado. El color verde observado a pH = 11 puede deberse a la presencia transitoria, y en una proporción apreciable, de la base quinoidal (azul) y la chalcona ionizada (amarilla).

2.4. Conclusiones

El estudio de caracterización del fruto de maqui de la zona de El Bolsón proporcionó información importante, destacándose su elevada concentración en compuestos bioactivos. En este sentido, se pudo observar que la materia prima estudiada posee los mismos atributos que los frutos de maqui de distintas zonas de Chile. Además, respecto al perfil de polifenoles se encontró una clara concordancia con los reportes existentes, identificándose antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos característicos del fruto. El análisis detallado de las antocianinas permitió seleccionar a la delfinidin-3-glucósido y la cianidin-3-glucósido como compuestos guía con el objetivo de analizar el efecto de las distintas condiciones de procesamiento y almacenamiento sobre los productos obtenidos a partir del fruto de maqui.

Por otro lado, el hecho de que el contenido de compuestos bioactivos del maqui sea mucho mayor que los presentados por otras berries, incluso de aquellas que actualmente están siendo muy utilizadas para el desarrollo de ingredientes funcionales o nutraceuticos (arándanos, frambuesas y zarzamoras, entre otras), sugiere la necesidad de aprovechar en Argentina este fruto como materia prima para el desarrollo de nuevos productos.

Finalmente, el análisis preliminar de los pigmentos antociánicos frente a las variaciones de pH permitió caracterizar cómo son los cambios de color de las antocianinas específicas del maqui frente a esta variable, siendo un punto de partida para el aprovechamiento de dichos pigmentos como colorantes naturales en productos de distinta acidez.

Capítulo 3

Elaboración de extractos de maqui: optimización del proceso de extracción de compuestos bioactivos

3.1. Introducción

El consumo de berries ha experimentado un crecimiento significativo a través de una gran variedad de productos comercializados tanto en forma procesada como frescos, debido a su elevado contenido de nutrientes y antioxidantes naturales (vitamina C, antocianinas, ácidos fenólicos y taninos, entre otros) (Sun-Waterhouse, 2011). De acuerdo a la caracterización realizada en el Capítulo 2 y lo reportado en bibliografía, el contenido de compuestos bioactivos del maqui es sobresaliente en comparación con otras berries, y por tal motivo su potencial aplicación en el desarrollo de productos ha despertado un gran interés (Brauch et al., 2016; Genskowsky et al., 2016, Gironés-Vilaplana et al., 2012; Rodríguez et al., 2016). Por otro lado el fruto presenta un bajo contenido de agua en comparación con otras berries, y por tal motivo los rendimientos de jugo son limitados cuando éste se obtiene por trituración y posterior separación de la fase líquida mediante alguna operación unitaria como centrifugación, prensado o filtrado. Por lo tanto, si se desea obtener un producto líquido (final o intermedio) rico en compuestos bioactivos, el proceso de extracción sólido-líquido (ampliamente utilizado en la industria alimenticia) surge como una alternativa.

La extracción sólido-líquido comprende la remoción de un conjunto de componentes (los solutos) desde la matriz del alimento, utilizando un líquido (solvente) adecuado para la disolución de los mismos. El proceso consiste en el mezclado de la materia prima alimenticia junto con el solvente (en una o múltiples etapas), a lo largo de un determinado tiempo en el cual se produce la transferencia de masa de los solutos hacia el seno del solvente, distinguiéndose cuatro fases: (1) el ingreso del solvente en el interior de los poros de la matriz alimenticia, (2) la disolución de los solutos en el solvente, (3) la difusión de solutos a través de la matriz del alimento hacia la interface alimento-solvente, (4) la transferencia de los solutos hacia el seno del solvente (Fellows, 2017). Distintos autores coinciden en que la fase

(3) es la etapa controlante del proceso difusivo y que su velocidad puede ser descripta mediante la segunda Ley de Fick (Cacace y Mazza, 2003; Gertenbach, 2001; Pinelo et al., 2006). Considerando el caso simplificado de difusión unidimensional y suponiendo que la difusividad efectiva es independiente de la concentración, la segunda Ley de Fick viene dada por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (3.1)$$

donde C es la concentración de los solutos, t es el tiempo, D_{ef} corresponde al coeficiente de difusividad efectiva y x es la coordenada de la dirección de difusión.

El proceso de extracción involucra múltiples variables, como por ejemplo: tiempo, tamaño de las partículas del producto sólido, tipo de solvente, relación solvente/sólido, temperatura, pH, tratamientos previos (e.g. escaldado). Por esta razón, el proceso de extracción debe ser estudiado y optimizado para cada materia prima específica (Castro-López et al., 2017; Čujić et al., 2016).

Respecto a los solventes, en los estudios de optimización de los procesos de extracción de compuestos fenólicos predomina la utilización de compuestos orgánicos como metanol, acetona, etanol, metanol o etanol acidificado, entre otros (Vázquez-Espinosa et al., 2018; Quispe-Fuentes et al., 2017; Pinelo et al., 2006). El objetivo de estos trabajos se centra en maximizar la extracción de determinados compuestos y/o estudiar las características del residuo sólido obtenido una vez eliminado el solvente del extracto. Estos estudios no persiguen la obtención de un extracto líquido que pueda ser un producto alimenticio en sí mismo (o materia prima para un nuevo proceso) rico en compuestos bioactivos. En efecto, este objetivo sería inviable cuando se emplean varios de los solventes mencionados. En este punto surge una primera diferencia de enfoque en la selección del solvente para el presente trabajo; esto es, el solvente debe ser apto para formar parte de un producto alimenticio porque el extracto líquido rico en antioxidantes es el producto objetivo. Adicionalmente, los solventes orgánicos requieren una adecuada disposición final (o algún acondicionamiento para su reutilización), para reducir su impacto ambiental. Por tal motivo, es conveniente utilizar solventes “amigables” con el medio ambiente (Castro-Puyana et al. 2017). En este marco, el solvente polar que mejor se adapta es el agua, la cual además de ser perfectamente compatible con formar parte de un alimento y ser amigable con el medio ambiente, es de fácil acceso y de bajo costo.

Para el estudio de optimización de un proceso, una de las técnicas más relevantes es la metodología de superficie de respuesta. Dicha metodología consiste en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en el ajuste de ecuaciones polinómicas a datos experimentales, con las cuales es posible representar gráficamente superficies de respuesta, y realizar previsiones estadísticas y optimizaciones que consideren varias variables de manera simultánea (Bezerra et al., 2008). La aplicación de la metodología de superficies de respuesta requiere previamente de una adecuada selección del diseño experimental, siendo los más utilizados los diseños factoriales con tres niveles para cada factor, los diseños centrales compuestos y los diseños Box-Behnken (Kuehl, 2001).

En este marco, el objetivo del presente Capítulo fue la obtención de un extracto acuoso rico en compuestos bioactivos, mediante la optimización del proceso de extracción del fruto de maqui. Dicha optimización se centró en maximizar de manera simultánea diferentes variables de respuesta seleccionadas.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materiales

Al igual que en el Capítulo 2, se utilizó maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) recolectado en el Bolsón (provincia de Río Negro, Argentina), conservado en las mismas condiciones hasta su procesamiento. Como solvente para el proceso de extracción se utilizó agua destilada.

3.2.2. Contenido de sólidos solubles (SS) en los extractos

La determinación de sólidos solubles de los extractos acuosos obtenidos a partir del diseño experimental Box-Behnken que se presenta en la sección 3.2.4.1, se realizó de acuerdo a la metodología 932.12 de la AOAC (1990) utilizando un refractómetro modelo PAL-1 (ATAGO, Tokio, Japón).

3.2.3. Propiedades funcionales de los extractos

Para la determinación de las propiedades funcionales de los extractos acuosos se utilizaron las técnicas espectrofotométricas descritas en el Capítulo 2:

- Método del pH diferencial para la cuantificación de la concentración de antocianinas monoméricas totales (ACY) (sección 2.2.3.1).
- Técnica del reactivo de Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido de polifenoles totales (PT) (sección 2.2.3.2).
- Técnica del reactivo ABTS para la determinación de la capacidad antioxidante (CA) (sección 2.2.3.3).

La diferencia respecto a lo descrito en dichas secciones, fue que las determinaciones se realizaron sobre alícuotas de los extractos acuosos obtenidos en cada uno de los ensayos del diseño experimental Box-Behnken. Además, teniendo en cuenta la elevada concentración de compuestos bioactivos en los extractos acuosos, hubo que realizar diluciones acordes para que las cuantificaciones espectrofotométricas estuvieran en zonas de validez de la Ley de Lambert y Beer.

Los resultados se expresaron en mg de cianidin-3-glucosido por litro de extracto (mg cy-3-glu / 1000 ml) para ACY, y en mg de equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mg GAE / 1000 ml) para PT y CA.

El porcentaje de recuperación de antocianinas monoméricas (% Rec) en el extracto acuoso se calculó mediante la Ecuación 3.2, utilizando los datos del contenido de ACY para los extractos acuosos y el fruto de maqui, el volumen total de extracto obtenido en cada extracción (V_{ext}) y la masa de fruta utilizada para cada extracción (M_{fru}).

$$\% \text{ Rec} = \frac{ACY_{ext} V_{ext}}{ACY_{fru} M_{fru}} 100 \quad (3.2)$$

3.2.4. Optimización del proceso de extracción

3.2.4.1. Diseño experimental

Para la definición del diseño experimental se realizaron pruebas preliminares (manteniendo la temperatura constante a 25 °C y utilizando agua destilada como solvente) que incluyeron extracciones con: el fruto entero, el fruto entero con tratamiento de escaldado, el fruto triturado sin tratamiento previo, y el agregado de ácido cítrico en bajas concentraciones

(en las tres opciones anteriores). El tratamiento de escaldado (fruto entero expuesto a vapor de agua a aproximadamente 100 °C durante un minuto) mejoró sensiblemente la extracción al compararlo con el fruto entero sin tratamiento; sin embargo, el proceso de trituración del fruto arrojó resultados muy superiores. Las extracciones con el agregado de ácido cítrico no sólo no mejoraron los resultados respecto a la cantidad de bioactivos extraídos, sino que además alteraron el color del extracto obteniéndose un producto más rojizo (efecto no deseado). De esta manera, el único pretratamiento seleccionado fue la trituración del fruto de maqui.

Para el estudio de optimización del proceso de extracción se adoptó un diseño experimental Box-Behnken, el cual permitió utilizar la metodología de superficie de respuesta para el análisis de los resultados. Luego de la elección del solvente y sobre la base del estudio preliminar, se seleccionaron los siguientes factores: X_1 = relación solvente/fruta (Rel S/F) en los niveles (2/1, 3,5/1, 5/1 p/p), X_2 = temperatura de extracción (25, 50, 75 °C) y X_3 = tiempo de extracción (30, 75, 120 min). Los niveles codificados de dichos factores son representados por $x = -1, 0, 1$, de acuerdo a lo indicado en la [Tabla 3.1](#). El diseño derivó en un total de 15 ensayos, los cuales se realizaron por duplicado.

Tabla 3.1. Ensayos correspondientes al diseño experimental Box-Behnken.

Ensayo	Variables independientes (Niveles codificados)			Variables independientes (Niveles sin codificar)		
	x_1	x_2	x_3	Rel S/F (p/p)	Temp. (°C)	Tiempo (min)
1	1	-1	0	5/1	25	75
2	1	0	-1	5/1	50	30
3	1	0	1	5/1	50	120
4	1	1	0	5/1	75	75
5	0	-1	-1	3,5/1	25	30
6	0	-1	1	3,5/1	25	120
7	0	0	0	3,5/1	50	75
8	0	0	0	3,5/1	50	75
9	0	0	0	3,5/1	50	75
10	0	1	-1	3,5/1	75	30
11	0	1	1	3,5/1	75	120
12	-1	-1	0	2/1	25	75
13	-1	0	-1	2/1	50	30
14	-1	0	1	2/1	50	120
15	-1	1	0	2/1	75	75

Las variables de respuesta seleccionadas para el estudio del proceso de extracción fueron: SS, ACY, % Rec, PT, y CA. Para cada ensayo del diseño experimental se determinó por triplicado cada variable de respuesta, y posteriormente fueron modeladas mediante

funciones polinómicas de segundo orden de las tres variables independientes del diseño (Ecuación 3.3).

$$y = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_i b_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_{j \neq i} b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3.3)$$

donde y representa cada variable de respuesta, x_i o x_j representan los niveles codificados (1, 0 o -1) de cada variable independiente (X_1, X_2, X_3), b_0 es el coeficiente del término independiente, b_i , b_{ii} y b_{ij} corresponden a los coeficientes de los efectos principales, cuadráticos y de interacción de cada variable independiente, y por último ε representa el término residual del ajuste. La evaluación estadística de los resultados se llevó adelante mediante un análisis de la variancia (ANOVA).

El conjunto de condiciones operativas óptimas fue establecido mediante una maximización simultánea de las variables de respuesta seleccionadas. El procedimiento para llevar adelante la optimización, considerando simultáneamente variables de respuesta que representan distintas magnitudes, consistió en la transformación de los resultados para cada variable a una escala adimensional denominada “deseabilidad” (acotada entre 0 y 1), para luego maximizar la deseabilidad conjunta o global, definida como el promedio geométrico de las deseabilidades individuales mediante la siguiente ecuación (Bezerra et al., 2008):

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (3.4)$$

donde D representa la deseabilidad conjunta, las d corresponden a las deseabilidades de cada variable, y m representa el número total de variables de respuesta consideradas simultáneamente. El valor 0 de cada deseabilidad individual es asignado al valor menos deseado de cada variable (por ejemplo, nivel mínimo de ACY), y el valor 1 es asignado al valor más deseado para cada variable (por ejemplo, nivel máximo de ACY). La deseabilidad global estará acotada entre 0 y 1, y el óptimo será el máximo valor de D posible de obtener.

3.2.4.2. Obtención de los extractos acuosos de maqui

La obtención de los extractos en cada una de las condiciones del diseño experimental se llevó adelante mediante los siguientes pasos:

- se descongeló maqui a temperatura ambiente durante 10 min,

- se pesó la cantidad de fruta acorde a la relación solvente/fruta seleccionada (entre 60 y 150 g),
- se trituró con una mini procesadora durante 60 s,
- se adicionaron 300 ml de agua destilada precalentada a la temperatura de extracción correspondiente, manteniendo el sistema (maqui + agua) en agitación en un vaso de precipitados con la temperatura controlada por medio de un baño termostatizado.

El tiempo de agitación varió en el rango del diseño experimental. Al finalizar la extracción, las muestras fueron centrifugadas (15 min a 6000 rpm) y filtradas obteniendo el residuo sólido y el extracto acuoso.

3.2.5. Perfil de antocianinas del extracto óptimo mediante HPLC

Se tomó una alícuota de 500 μ l de extracto y se diluyó en metanol utilizando un matraz de 25 ml. Luego, sobre una alícuota de dicha muestra se aplicó la metodología detallada en la [sección 2.2.5](#), pero utilizando únicamente la señal del detector DAD a 520 nm y los estándares de antocianinas.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Resultados experimentales y análisis estadístico

La [Figura 3.1](#) muestra los resultados de las variables de respuesta estudiadas (SS, ACY, % Rec, PT y CA) para los 15 ensayos del diseño experimental Box-Behnken (ver diseño en [Tabla 3.1](#)). Los coeficientes de regresión correspondientes a las ecuaciones polinómicas de segundo orden de dicho diseño, junto con los coeficientes de determinación (R^2) de los respectivos ajustes, son presentados en la [Tabla 3.2](#).

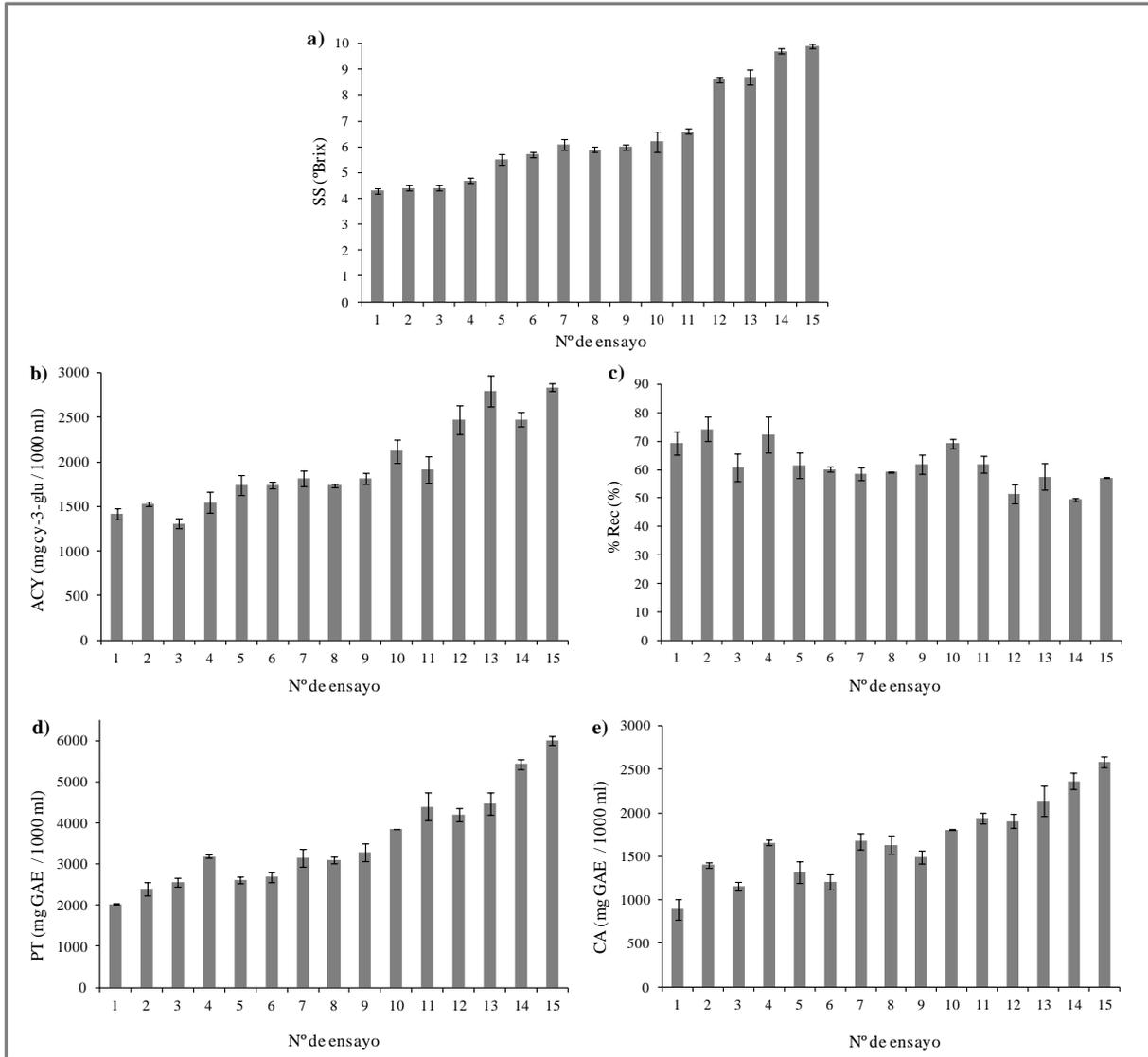


Figura 3.1. Resultados del diseño experimental Box-Behnken para: a) SS, b) ACY, c) % Rec, d) PT y e) CA.

Tabla 3.2. Coeficientes correspondientes a los polinomios del diseño Box-Behnken.

Coefficiente	SS	ACY	%Rec	PT	CA
b ₀	5,950**	1790,962**	59,867**	318,000**	160,035**
b ₁	-2,381**	-597,503**	7,638**	-123,938**	-48,644**
b ₁₁	0,844**	215,857**	0,010	50,313**	17,818**
b ₂	0,431**	131,501**	2,281*	73,688**	33,174**
b ₂₂	0,044	63,150	2,723*	17,313**	-1,897
b ₃	0,200**	-93,402**	-3,794**	21,625**	0,004
b ₃₃	-0,019	23,132	0,648	3,688	-1,381
b ₁₂	-0,213**	-59,846	-0,675	-15,875*	2,212
b ₁₃	-0,225**	25,402	-1,325	-20,000**	-11,935**
b ₂₃	0,050	-50,794	-1,513	12,000*	6,053
R ²	0,995	0,972	0,847	0,986	0,973

* *p*-value < 0,05, ***p*-value < 0,01

El test de Fisher arrojó los resultados que se muestran en la [Figura 3.2](#), en la cual solamente fueron representados los efectos principales y/o de interacción significativos, o altamente significativos. En términos generales se pudo observar que:

- Las tres variables independientes tuvieron efectos principales significativos sobre todas las variables de respuesta, con la excepción de X_3 (tiempo de extracción) sobre CA.
- Dentro de los efectos principales se destaca con mayor incidencia relativa (mayor F -value) la variable X_1 (Rel S/F), y luego la variable X_2 (temperatura).
- Los efectos de las interacciones de los factores tuvieron una incidencia relativa muy baja (F -values muy bajos) o directamente no fueron estadísticamente significativos.
- Los valores de R^2 indicaron una adecuada aceptabilidad de los ajustes de los datos experimentales haciendo uso de funciones polinómicas de segundo orden.

3.3.2. Análisis de los efectos de las variables independientes sobre el proceso de extracción

Para comenzar el análisis es necesario tener presente que en el proceso de extracción tienen lugar distintos fenómenos simultáneamente: por un lado la transferencia de masa de una diversidad de compuestos (azúcares, ácidos orgánicos, polifenoles, entre otros) desde la matriz del fruto triturado hacia el seno del medio acuoso, y por otro lado posibles transformaciones químicas de los compuestos bioactivos (degradación parcial, polimerización, etc.). Por tales motivos, es conveniente comenzar el análisis de los resultados tomando la variable SS, dado que, al estar involucrada principalmente en la transferencia de masa, resulta ser la variable más simple de estudiar y al mismo tiempo proporciona un marco de referencia para la evaluación del resto de las variables.

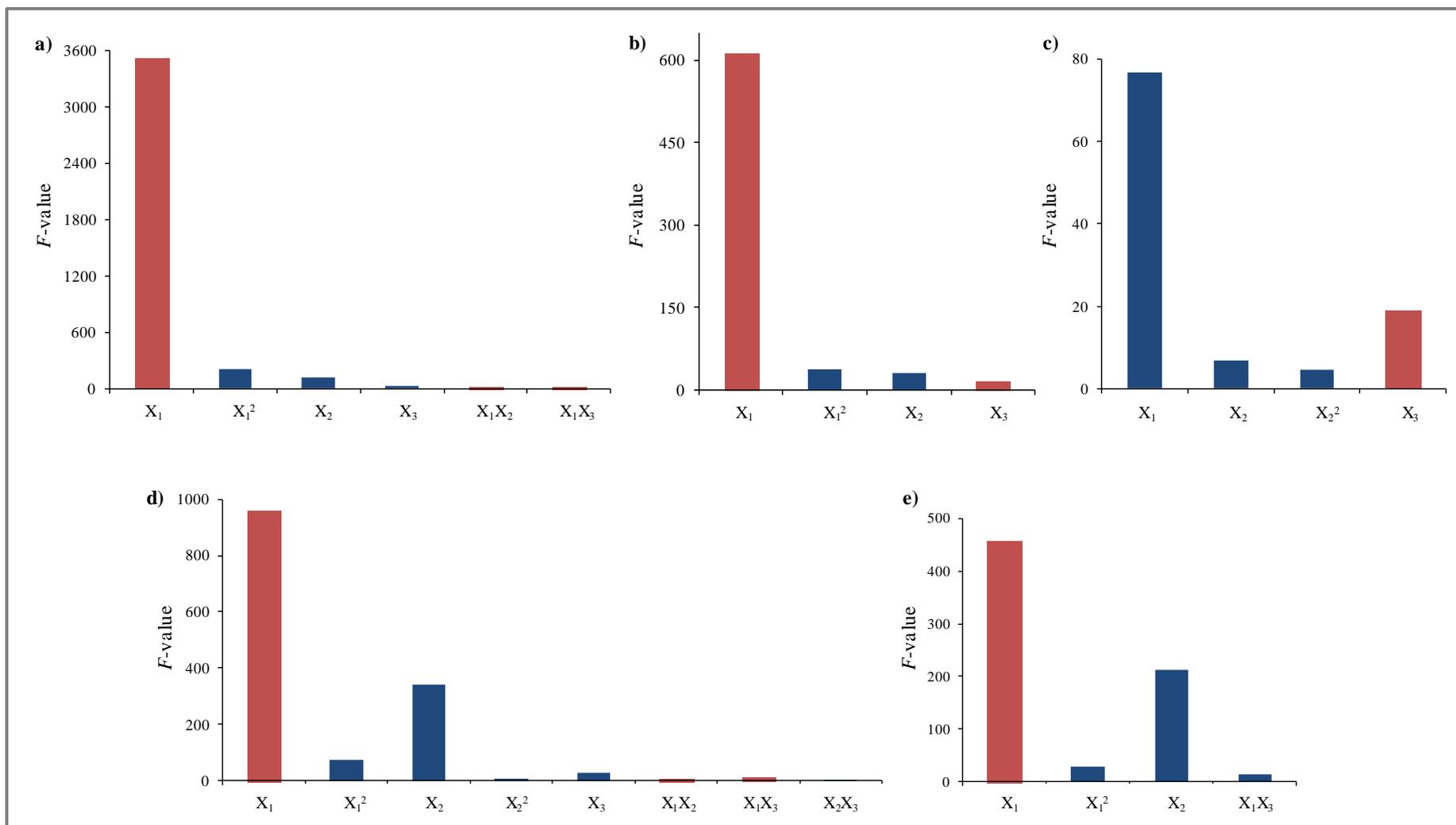


Figura 3.2. Resultados del test de Fisher (F -value) para los efectos principales y de interacción de las variables independientes, sobre: a) SS, b) ACY, c) % Rec, d) PT y e) CA. El color rojo representa efecto negativo y el color azul positivo.

3.3.2.1. Efectos sobre SS

Las ecuaciones polinómicas ajustadas permiten representar las correspondientes superficies de respuesta. En la [Figura 3.3](#), que muestra las superficies y las curvas de nivel obtenidas para SS, puede observarse que el factor que tuvo mayor incidencia sobre esta respuesta fue la relación solvente/fruta (afectando negativamente). Por su parte, la temperatura y el tiempo afectaron positivamente el contenido de SS aunque en menor medida.

Respecto al efecto de la variable X_1 , podría esperarse que su aumento incrementa el nivel de SS, dado que una cantidad de solvente alta evitaría que se logre rápidamente el equilibrio en términos del gradiente de concentración de los compuestos solubles. Sin embargo, el aumento de X_1 a la vez causa dilución del extracto, lo que podría reducir la concentración de SS por exceso de solvente. Los resultados obtenidos indicaron que predominó el efecto de dilución, expresado en el marcado efecto negativo de X_1 sobre SS ([Figura 3.3 a y b](#)). En cuanto a la incidencia del tiempo de extracción sobre SS, se observó que dependió de los niveles de la variable X_1 , relacionada con la velocidad a la cual tendría lugar inicialmente la transferencia de materia. Cuando X_1 se ubicó en su nivel más alto (elevado gradiente de concentración inicial) el efecto del tiempo fue despreciable (SS se mantuvo constante), mientras que en el nivel más bajo de X_1 (menor gradiente de concentración inicial) el tiempo tuvo un efecto levemente positivo ([Figura 3.3 b](#)). Adicionalmente, la [Figura 3.3 c](#) permite observar el efecto positivo del tiempo a los distintos niveles de la temperatura de extracción. Finalmente, se observó un incremento en SS con la temperatura (X_2) tanto a niveles altos como bajos de X_1 ([Figura 3.3 a](#)), como así también para todos los niveles de la variable tiempo ([Figura 3.3 c](#)).

El incremento de la temperatura influye de manera positiva en todas las etapas del proceso de transferencia de masa: a) vuelve a la estructura del alimento más permeable y por lo tanto se facilita la penetración del solvente en la matriz alimenticia, b) mejora la solubilidad de los solutos en el solvente y c) aumenta la difusión del componente desde el interior de la matriz alimenticia hasta la interface alimento-solvente, y finalmente la transferencia de masa hacia el seno del líquido ([Fellows, 2017](#)). En términos de la Ley de Fick, el aumento de la temperatura incrementa el coeficiente de difusividad efectiva. Por lo tanto, el efecto positivo de X_2 sobre SS guardó coherencia con lo esperado teóricamente.

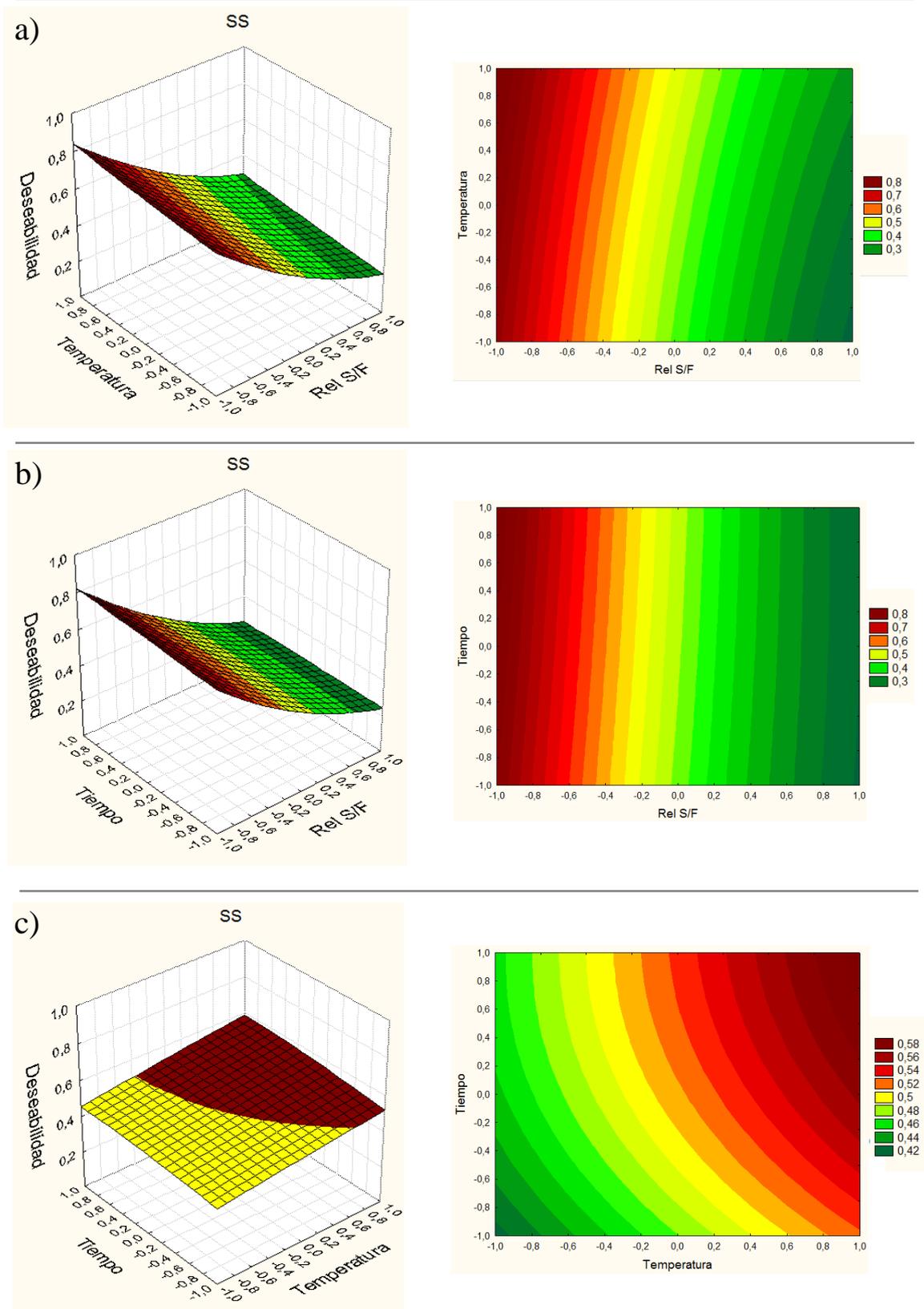


Figura 3.3. Superficies de respuesta y curvas de nivel para SS: a) Temperatura vs. Relación solvente/fruta, b) Tiempo vs. Relación solvente/fruta, y c) Tiempo vs. Temperatura.

3.3.2.2. Efectos sobre ACY y % Rec

En las Figuras 3.4 y 3.5 se muestran las superficies de respuesta para ACY y % Rec junto con sus curvas de nivel, respectivamente. A diferencia de lo observado para SS, el tiempo tuvo un efecto negativo, tanto sobre la concentración de antocianinas monoméricas totales en el extracto, como sobre el porcentaje de recuperación de las mismas. Este efecto, se observa claramente en las curvas de nivel que involucran las variables tiempo y temperatura (Figuras 3.4 c y 3.5 c). Por otra parte, el impacto del tiempo sobre ACY y % Rec ya había quedado evidenciado por el signo negativo de los coeficientes correspondientes a X_3 ($b_3 = -93,402$ y $b_3 = -3,794$, respectivamente) en los polinomios del diseño Box-Behnken (Tabla 3.2).

Tal como se muestra en las Figuras 3.4 y 3.5, el efecto de la temperatura sobre ACY y % Rec fue positivo para todos los tiempos y relaciones S/F estudiados. Análogamente a lo analizado para SS, desde el punto de vista de la transferencia de masa el incremento de X_2 sería favorable para la extracción de antocianinas. Cacace y Mazza (2003) al trabajar con frutos de cassis triturados, y Pinelo et al. (2006) al estudiar el proceso de extracción de residuos de uva molidos, indicaron que al aumentar la temperatura se incrementa el coeficiente de difusividad efectiva y se favorece la transferencia de masa de los compuestos fenólicos. En el mismo sentido Vázquez-Espinosa et al. (2019), al estudiar el proceso de extracción de frutos de maqui liofilizados y triturados, mencionan que el aumento de la temperatura favorece la ruptura de las interacciones (fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo, etc.) entre los compuestos a ser extraídos y la matriz del alimento. Además, los autores sostienen que el aumento de la temperatura disminuye la viscosidad y la tensión superficial del solvente favoreciendo su penetración en el alimento, afectando así de manera positiva en la extracción de antocianinas. De esta manera, el aumento observado de ACY y % Rec con el incremento de la temperatura coincide con lo esperado de acuerdo a la literatura. Sin embargo, la temperatura también afecta la estabilidad de las antocianinas, favoreciéndose su degradación al incrementarse el nivel térmico de manera excesiva. Por lo tanto, el nivel térmico condiciona el efecto neto de X_2 dado que incide simultáneamente en la velocidad relativa de la transferencia de masa y la degradación térmica. Estos procesos competitivos además de depender de X_2 , son afectados por el tiempo de extracción. De esta manera, la prevalencia de uno de los procesos sobre el otro, dependerá de la combinación de los factores.

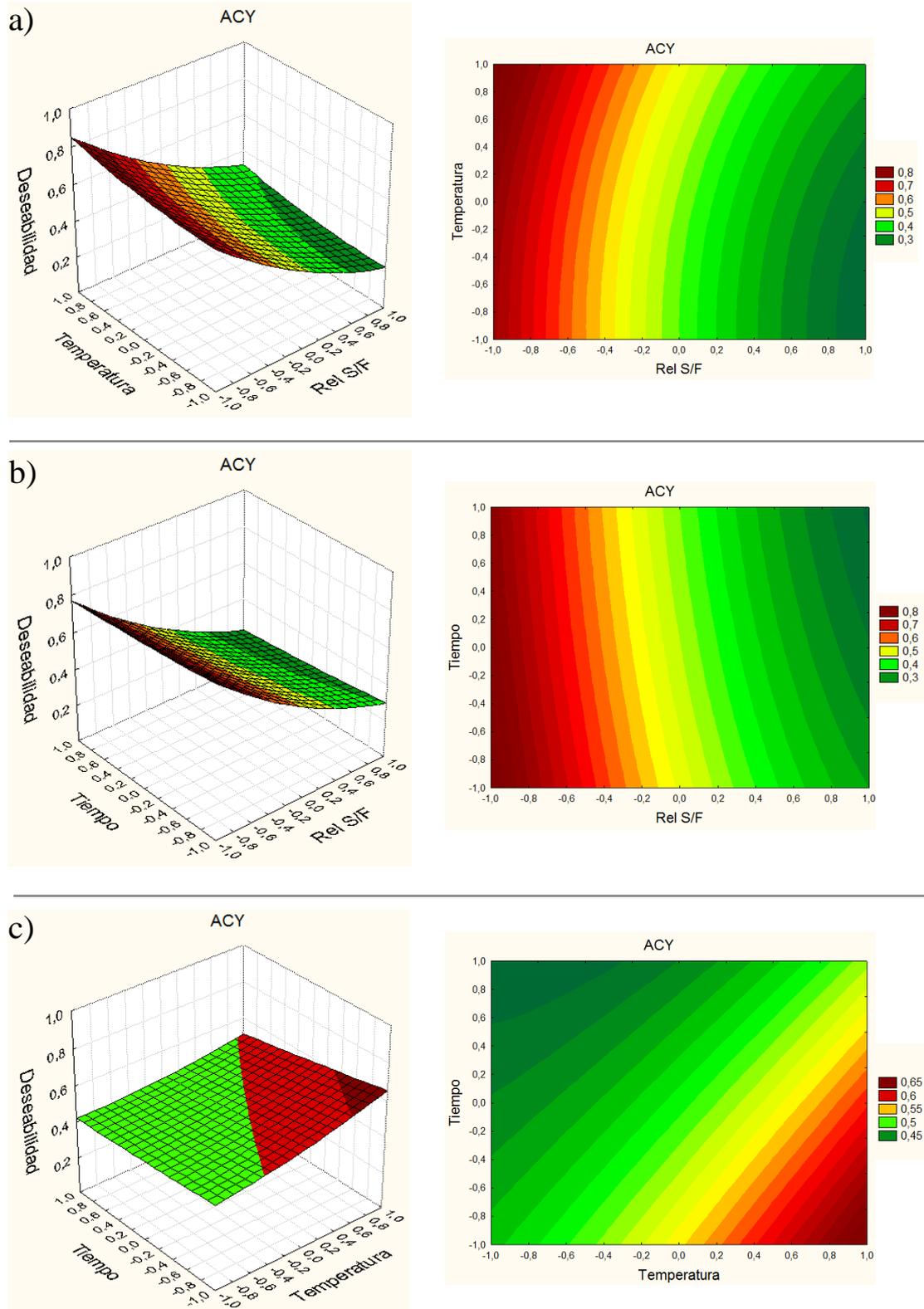


Figura 3.4. Superficies de respuesta y curvas de nivel para ACY: a) Temperatura vs. Relación solvente/fruta, b) Tiempo vs. Relación solvente/fruta, y c) Tiempo vs. Temperatura.

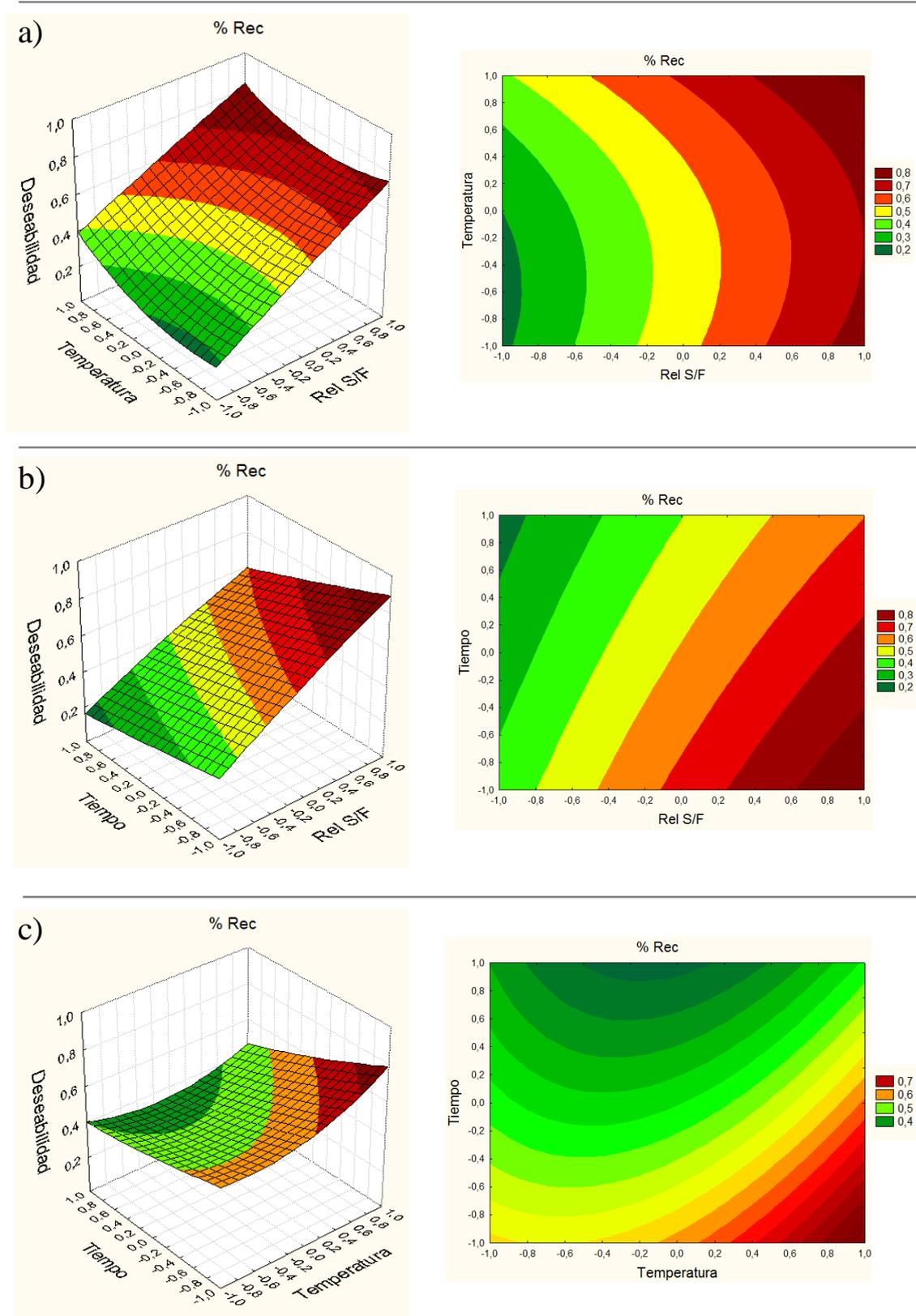


Figura 3.5. Superficies de respuesta y curvas de nivel para % Rec: a) Temperatura vs. Relación solvente/fruta, b) Tiempo vs. Relación solvente/fruta, y c) Tiempo vs. Temperatura.

En cuanto a la variable X_1 , su incidencia sobre la extracción de las antocianinas monoméricas fue análoga a la verificada para SS (ver [Figura 3.3 a y b](#)). Tal como se observa en la [Figuras 3.4 a y b](#), cuanto menor es X_1 , mayor fue el contenido de ACY obtenido. Este efecto se atribuye a la menor relación S/F que evita la dilución del extracto. Sin embargo, el incremento de X_1 tuvo un efecto positivo sobre la variable % Rec ([Figuras 3.5 a y b](#)); es decir la fracción de antocianinas monoméricas extraída frente al contenido inicial del fruto de maqui fue mayor. De esta manera, existe un compromiso al momento de seleccionar el nivel de X_1 a usar. Esto es, a mayor relación solvente/fruta será mayor el porcentaje de antocianinas monoméricas extraídas del fruto pero será menor la concentración de ACY en el extracto líquido obtenido.

3.3.2.3. Efectos sobre PT

La [Figura 3.6](#) muestra las superficies de respuesta y las curvas de nivel para PT. Se puede observar que los efectos de X_1 y X_2 sobre PT, fueron similares a los observados para el contenido de antocianinas monoméricas. Sin embargo, se obtuvieron resultados diferentes para el caso de X_3 , dado que se manifestó un efecto positivo del tiempo de extracción sobre PT ([Figura 3.6 c](#)).

Como fuera analizado en el Capítulo 2, los compuestos fenólicos están conformados por una gran variedad de subgrupos de compuestos, siendo las antocianinas sólo uno de ellos. Procesos largos de extracción pueden afectar el grado de avance de las reacciones de degradación, en particular la estabilidad térmica de las antocianinas monoméricas y de otros compuestos fenólicos puede verse comprometida. Sin embargo, no necesariamente todos los subgrupos presentan la misma estabilidad frente a tratamientos térmicos. Incluso, en el caso de las antocianinas monoméricas su degradación podría producir otros compuestos fenólicos cuantificables en la determinación de PT. Por ejemplo, [Casati et al. \(2017\)](#) estudiaron la degradación térmica de ACY y PT en pulpas de arándano, cassis y maqui en el rango de temperatura de 70-90 °C, obteniendo como resultado una degradación importante de ACY (siguiendo una cinética de pseudo-primer orden), y una buena estabilidad de PT reteniendo entre 75-91 % de su concentración inicial luego de 6 horas de tratamiento térmico. [Fischer et al. \(2013\)](#) evaluaron la estabilidad de distintos jugos de granadina sujetos a tratamientos térmicos en el rango de 60-90 °C durante un tiempo total de 5 horas, y obtuvieron como resultado una gran estabilidad para PT, como así también para los casos específicos del ácido

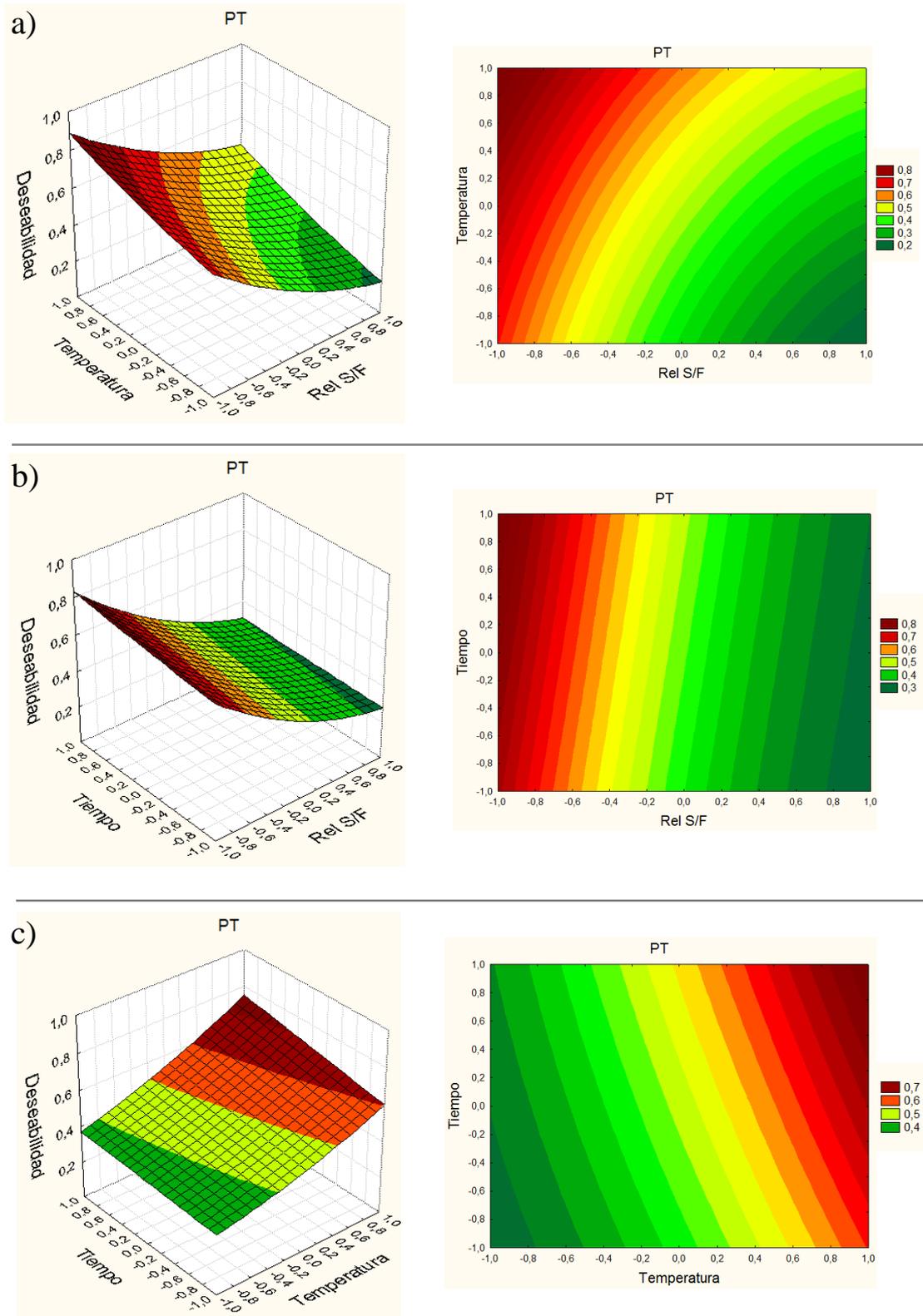


Figura 3.6. Superficies de respuesta y curvas de nivel para PT: a) Temperatura vs. Relación solvente/fruta, b) Tiempo vs. Relación solvente/fruta, y c) Tiempo vs. Temperatura.

elálgico y la punicalagina (un elagitanino). En cambio, observaron una marcada degradación de las antocianinas. Por otro lado, Sadilova et al. (2006) estudiaron las etapas de las reacciones de degradación térmica de antocianinas aciladas y no-aciladas presentes en concentrados comerciales de frutos de sauco, cassis y frutilla. Luego de separar y purificar las antocianinas presentes en cada uno de los concentrados, llevaron adelante tratamientos térmicos a 95 °C durante 7 horas y a pH =1. En el caso de las antocianinas no-aciladas (mono o diglucósidos de cianidina o pelargonidina) obtuvieron como compuestos finales floroglucinaldehído, y los ácidos protocatéuico y 4-hidroxibenzoico (Figura 3.7). En el caso de las antocianinas aciladas, se sumaron como productos finales los ácidos ferúlico, cumárico y sinápico. De esta manera, los productos finales de las reacciones de degradación de las antocianinas resultaron ser polifenoles de distintos subgrupos (ácidos fenólicos, hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), siendo todos ellos cuantificables tanto en la determinación de PT como en la de CA.

Por lo tanto, en función de los antecedentes previos, es probable que en las condiciones del diseño experimental del presente estudio (temperaturas de 25-75 °C y un tiempo máximo de 2 horas; condiciones menos adversas que las de los trabajos citados) la degradación térmica de polifenoles haya ocurrido en menor medida que la degradación del subgrupo de antocianinas monoméricas, siendo también posible que la degradación de las antocianinas derivara en compuestos fenólicos cuantificables en la determinación de PT.

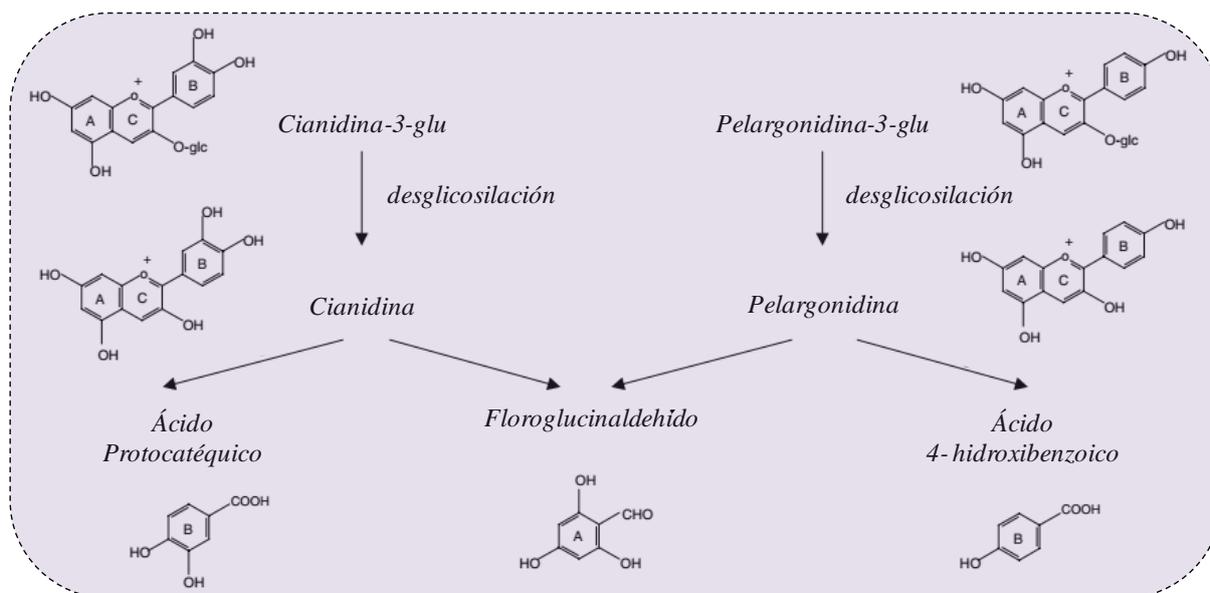


Figura 3.7. Degradación de antocianinas no-aciladas. Gráfico extraído y adaptado de Sadilova et al. (2006).

3.3.2.4. Efectos sobre CA

En cuanto a CA, tanto X_1 como X_2 incidieron de manera análoga a como lo hicieron para ACY y PT. Ambas variables tuvieron un efecto altamente significativo sobre CA, siendo negativo en el caso de la relación solvente/ fruta y positivo en el caso de la temperatura (ver [Tabla 3.2](#)). Para el caso de la variable X_3 el efecto no llegó a ser estadísticamente significativo, aunque sí lo fue su interacción con la variable X_1 . La [Figura 3.8](#) muestra las superficies de respuesta y las curvas de nivel para la variable CA. En la [Figura 3.8 b](#) se puede apreciar el efecto de interacción X_1 - X_3 : para X_1 alto, el incremento del tiempo tuvo un leve efecto negativo, mientras que para X_1 bajo el efecto del tiempo fue levemente positivo.

Para un mejor análisis de los resultados de CA, se determinó su correlación con ACY y PT, obteniendo los resultados presentados en la [Figura 3.9](#). Se pudo observar una correlación estadísticamente significativa (y positiva) entre CA y ACY y entre CA y PT. Por lo tanto, el efecto positivo de la temperatura de extracción sobre CA estuvo directamente relacionado con el efecto positivo sobre ACY y PT discutido en las secciones precedentes. De la misma manera, dado que el aumento de la relación solvente/fruta tuvo un efecto neto de dilución sobre la concentración de compuestos bioactivos en el extracto, el efecto sobre CA fue negativo. En cambio, debido a que el efecto de la variable X_3 sobre ACY fue distinto al que tuvo sobre PT, la influencia del tiempo de extracción sobre CA resulta más compleja de evaluar. Anteriormente se analizó que el tiempo afectó de manera negativa a ACY y de manera positiva a PT. Esto implicaría que a niveles altos de X_3 la concentración de polifenoles totales sería mayor, pero con una proporción menor de antocianinas monoméricas. Por lo tanto, el efecto de la extensión del tiempo de extracción sobre CA dependería de la nueva composición de compuestos fenólicos. Así, el efecto de X_3 sería más complejo de predecir y podría no tener un efecto estadísticamente significativo, o tener efectos de interacción con otros factores, como ocurrió en el presente trabajo.

Sin embargo, resulta importante notar que se verificó una mayor correlación entre CA y PT (mayor coeficiente de Pearson), que entre CA y ACY (ver [Figura 3.9](#)), y que las superficies de respuesta de CA fueron más semejantes a las de PT. Esta relación entre la capacidad antioxidante en frutas (o productos a base de frutas) y la concentración de los compuestos fenólicos ha sido mencionada en diversos trabajos. Tal es el caso, de los estudios reportados con frutos de la India ([Singh et al. 2016](#)), frutos de Chile ([Fredes et al. 2014 b](#)), y berries de la Argentina ([Sette et al. 2017](#)).

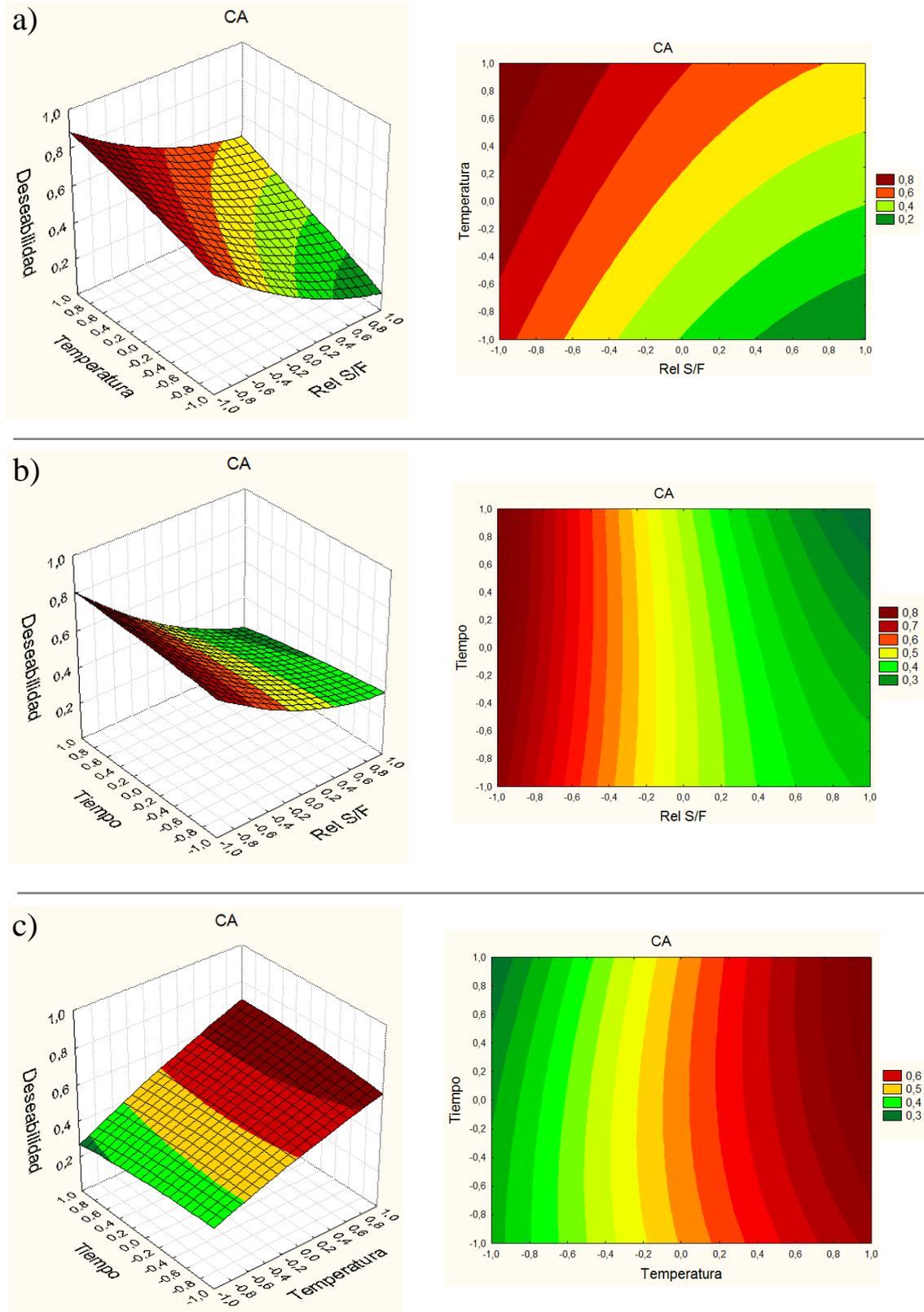


Figura 3.8. Superficies de respuesta y curvas de nivel para CA: a) Temperatura vs. Relación solvente/fruta, b) Tiempo vs. Relación solvente/fruta, y c) Tiempo vs. Temperatura.

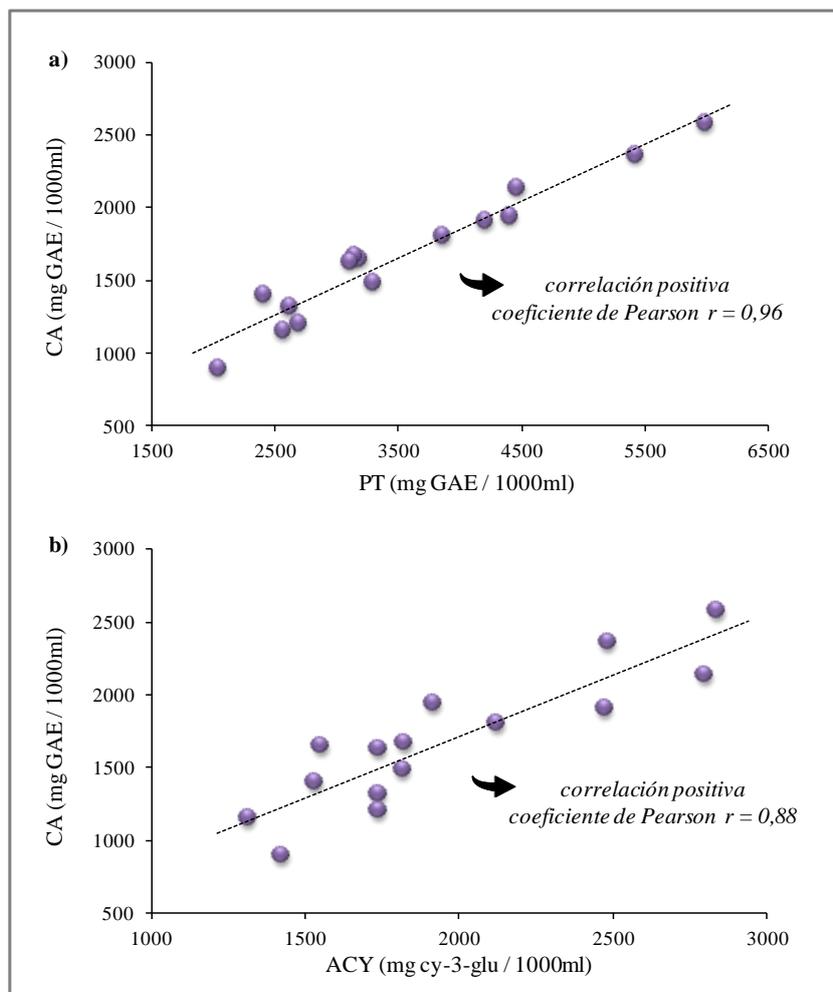


Figura 3.9. Correlación entre las variables: a) CA y PT, b) CA y ACY.

3.3.3. Optimización simultánea de las respuestas

Como se mencionó anteriormente, el diseño experimental Box-Behnken permite realizar optimizaciones teniendo en cuenta varias variables de respuesta de manera simultánea. En este caso, el planteo consistió en hallar las condiciones operativas del proceso de extracción (niveles de X_1 , X_2 y X_3) tales que maximicen la deseabilidad global considerando de manera conjunta las variables SS, ACY, % Rec, PT, y CA, como se explicó en la sección 3.2.4.

De esta manera, las condiciones operativas óptimas obtenidas fueron: X_1 = relación solvente/fruta = 2/1, X_2 = temperatura = 75 °C, y X_3 = tiempo = 75 min. Para estas condiciones, los resultados obtenidos fueron: SS = $9,9 \pm 0,1$ °Brix, ACY = 2839 ± 43 mg cy-3glu/1000 ml, % Rec = $57,2 \pm 0,3$ %, PT = 6000 ± 110 mg GAE/1000 ml, y CA = 2582 ± 60 mg GAE/1000 ml.

En las condiciones operativas que permiten obtener el extracto óptimo, los valores de SS, ACY, PT y CA fueron los máximos posibles, mientras que el % Rec tomó su valor mínimo. Anteriormente se señaló, para el caso de ACY y % Rec, que existía una relación de compromiso entre dichas variables, sujeta a los niveles de X_1 . En efecto, si se planteara solamente la maximización de % Rec, se obtendrían los siguientes resultados para condiciones operativas $X_1 = 5/1$, $X_2 = 50$ °C, y $X_3 = 30$ min, y para las variables de respuesta $SS = 4,4 \pm 0,1$ °Brix, $ACY = 1529 \pm 26$ mg cy-3glu/1000 ml, $\% \text{ Rec} = 74,3 \pm 4,3$ %, $PT = 2410 \pm 160$ mg GAE/1000 ml, y $CA = 1401 \pm 30$ mg GAE/1000 ml. De esta manera, se observa que % Rec se incrementaría desde 57,2 % hasta 74,3 %, y de esta manera quedarían menos compuestos bioactivos en el residuo sólido. Esta condición operativa, sin embargo, llevaría a un extracto con baja concentración de dichos compuestos, y consecuentemente baja capacidad antioxidante (entre 45 % y 60 % de reducción, según la variable analizada). Así, se obtendría un producto líquido mucho más diluido, de menor interés como extracto rico en compuestos bioactivos. Además, la dilución impactaría negativamente sobre procesos posteriores tendientes a obtener líquidos concentrados o polvos como productos finales (se demandarían mayores costos energéticos para el procesamiento).

Este punto de análisis es importante porque permite visualizar desde otra perspectiva al residuo sólido. El contenido de compuestos bioactivos que retiene no resulta despreciable, y por lo tanto cobraría importancia considerar en futuros trabajos otros procesos de revalorización de dicho residuo.

3.3.4. Perfil de antocianinas del extracto óptimo mediante HPLC

En la [Figura 3.10](#) se presentan los perfiles de antocianinas obtenidos para el fruto de maqui y para el extracto óptimo. Al realizar la comparación entre ambos perfiles de antocianinas se observó en el cromatograma que el extracto acuoso óptimo posee los mismos cinco picos identificados en el fruto, pero con una composición relativa de antocianinas diferente. Se produjo una reducción en la proporción de mono-glucósidos, pasando de un 39,79 % (fruto) a un 27,86 % (extracto óptimo), lo cual se debió principalmente a la reducción relativa de las áreas de los picos 2 (delfinidin-3-glucósido) y 3 (delfinidin-3-sambubiosido), y en menor medida a la reducción del área del pico 1 (cianidin-3-glucósido). Esta disminución en la composición relativa de los mono-glucósidos produjo un cambio en la proporción de glucósidos de cianidina y delfinidina, aunque dicho efecto fue más leve en

comparación con el cambio en la proporción mono/di-glucósidos mencionada anteriormente. Los glucósidos de cianidina representaron un 17,21 % en la fruta y un 20,73 % en el extracto, mientras que en el caso de los glucósidos de delphinidina disminuyeron desde un 82,79 % en el fruto, hasta un 79,27 % en el extracto.

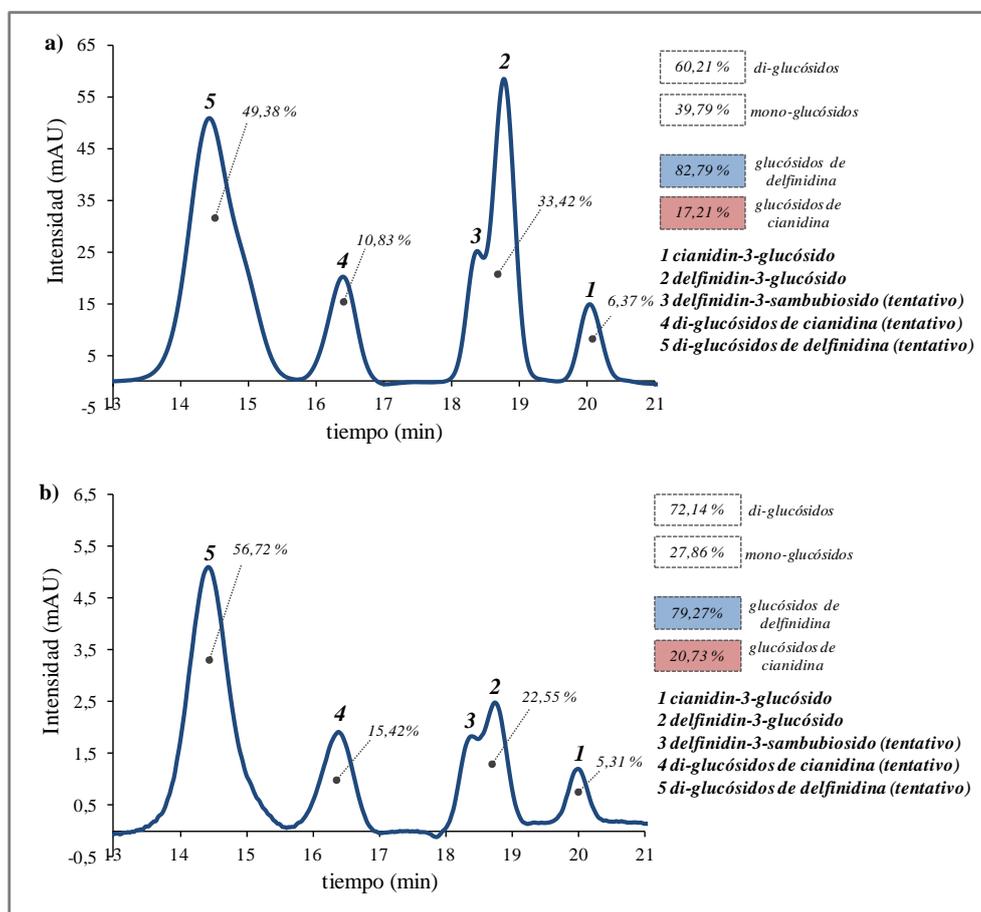


Figura 3.10. Cromatogramas correspondientes a los perfiles de antocianinas obtenidos por HPLC: a) fruto de maqui y b) extracto óptimo.

En los trabajos de Martí et al. (2002) y de Brauch et al. (2015), quienes utilizaron como materias primas iniciales jugos de granadina y maqui respectivamente, se estudió la estabilidad de las antocianinas durante distintos procesos de almacenamiento. Analizaron particularmente el efecto de la temperatura, y reportaron una mayor estabilidad de las antocianinas di-glucosídicas en comparación con las antocianinas mono-glucosídicas del mismo tipo. Ambos autores argumentaron que el enlace glucosídico en el carbono 5 reduce el carácter nucleofílico de los carbonos 6 y 8 del anillo aromático (A) de la antocianina y por lo tanto son menos propensos al ataque electrofílico, contribuyendo a evitar la fisión del anillo heterocíclico y la subsecuente formación de la chalcona y posterior degradación. Este efecto

estabilizante en las antocianinas di-glucosídicas fue explicado por Timberlake y Bridle (1977), quienes reportaron que el enlace glucosídico en el carbono 5 impide el efecto mesomérico del oxidrilo (preexistente en dicha posición antes del enlace glucosídico), disminuyendo la disponibilidad electrónica del anillo aromático y por lo tanto disminuyendo el carácter nucleofílico de los carbonos 6 y 8. Por lo tanto, la diferencia de estabilidad observada en el presente trabajo entre los di-glucósidos y los mono-glucósidos de las antocianinas del maqui en condiciones de extracción a temperatura elevada, podría deberse al efecto estabilizante del enlace glucosídico en el carbono 5.

3.4. Conclusiones

La extracción de maqui usando agua como solvente permitió obtener, mediante una adecuada selección de las variables relación solvente/fruta, temperatura y tiempo de extracción, un extracto rico en compuestos bioactivos. La variable de mayor incidencia en el proceso de extracción fue la relación solvente/fruta, que afectó de manera negativa (por efecto de dilución) a todas las respuestas estudiadas, con excepción del porcentaje de recuperación de antocianinas monoméricas, el cual se incrementó al disponer de mayor cantidad de solvente. La temperatura afectó la concentración final alcanzada de compuestos bioactivos en el extracto. Si bien por un lado aceleró la degradación de compuestos antociánicos, este efecto fue compensado con una mayor transferencia de materia hacia el medio de extracción tanto de ACY como de PT, dando lugar a un aumento en la capacidad antioxidante. El tiempo de extracción fue la variable de menor incidencia.

La determinación del perfil de antocianinas del extracto óptimo permitió verificar la presencia de todas las antocianinas monoméricas identificadas en el fruto de maqui, aunque variando su composición relativa. Los mono-glucósidos cianidin-3-glucósido, delphinidin-3-glucósido y delphinidin-3-sambubiosido fueron los más afectados, reduciéndose un 12 % la proporción de dichas antocianinas en el extracto. De esta manera se vio reflejada la diferencia de estabilidad de las antocianinas monoméricas frente a tratamientos térmicos.

Por último, el estudio de optimización permitió visualizar desde otra perspectiva el residuo sólido obtenido en el proceso de extracción. El contenido de compuestos bioactivos que retiene no resulta despreciable, y por lo tanto cobraría importancia considerar en futuros trabajos otros procesos de revalorización de dicho residuo.

Capítulo 4

Optimización del proceso de secado por atomización de extractos de maqui

4.1. Introducción

Tanto las frutas, como los jugos o extractos obtenidos a partir de ellas, son productos alimenticios que poseen un elevado valor nutricional (Granato et al., 2015, Kalaycioğlu y Erim, 2017). Dichos productos en general son altamente perecederos, y por lo tanto su conservación hasta el consumo final presenta importantes desafíos (Shishir y Chen, 2017; Ephrem et al., 2018).

La elaboración de productos en polvo a partir de jugos o extractos de frutas es una vía ampliamente utilizada. El proceso de secado permite obtener productos con una vida útil notablemente más prolongada (pasando de semanas/meses para productos líquidos a meses/años para polvos). Además, los productos en polvo poseen ventajas adicionales respecto a los líquidos, tales como reducción de costos de transporte y almacenamiento (Shishir y Chen 2017; Tontul y Topuz, 2017).

Existen varias técnicas para la transformación de productos líquidos en polvos. Dentro de ellas, el secado por atomización es una operación unitaria simple y continua que ha sido extensamente utilizada. Esta tecnología es particularmente apropiada para obtener polvos a partir de jugos o extractos naturales y permite preservar compuestos bioactivos térmicamente sensibles (Gallo et al., 2015; Gagnetten et al., 2019). El secado por atomización es una operación escalable, sin embargo el cambio de escala implica numerosos desafíos. En este sentido, el trabajo de revisión de Poozesh y Bilgili (2019), y el trabajo conjunto de dos productores importantes de secaderos por atomización (Büchi Labortechnik AG y GEA Niro A/S, en pequeña y gran escala respectivamente) (Information Bulletin best@buchi, 2008), resumen los desafíos y criterios para el cambio de escala. Se busca conseguir distribuciones de tamaño de gotas similares en las diferentes escalas (para lo cual se mantiene el tipo de atomizador y la velocidad relativa entre la alimentación líquida y el aire de atomización) y

lograr condiciones de secado similares (buscando que la temperatura de salida del aire y niveles de humedad residual en el polvo sean semejantes). En dichos trabajos se resalta que un estudio a escala laboratorio es esencial para establecer condiciones operativas adecuadas, las cuales podrían convertirse en el punto de partida para el proceso de escalado.

La Figura 4.1 presenta de manera esquemática las distintas etapas del proceso de secado por atomización correspondiente al equipo utilizado en esta Tesis. Dicho equipo presenta una boquilla de atomización binaria en la cual ingresan simultáneamente la alimentación líquida a secar con aire comprimido. Esta configuración permite dispersar la alimentación líquida en una gran cantidad de pequeñas gotas con una determinada distribución de tamaño. Inmediatamente después de la atomización, las pequeñas gotas de líquido se ponen en contacto en co-corriente con aire de secado caliente. La interacción de las gotas con el aire caliente involucra procesos de transferencia simultánea de calor y masa y, dependiendo de los niveles térmicos, de eventuales reacciones químicas.

La diferencia de temperatura existente entre el aire de secado y la superficie de las gotas es la fuerza impulsora de la transferencia de calor. El gradiente térmico en el interior de las gotas puede considerarse despreciable, dado que el tamaño de las mismas es muy pequeño y la velocidad de transferencia de calor es grande (número de Biot bajo) (Chen, 2005; Patel y Chen, 2008). La Ecuación 4.1 presenta el balance de energía para las gotas/partículas durante el proceso de secado.

$$\frac{dT_{\text{gota/partícula}}}{dt} = h A (T_{\text{aire}} - T_{\text{gota/partícula}}) - \frac{dm}{dt} \Delta H_{\text{ev}} \quad (4.1)$$

donde T representa a la temperatura de la gota/partícula, t al tiempo, h al coeficiente pelicular de transferencia de calor, A al área externa de la gota/partícula, m a la masa de solvente evaporado, y ΔH_{ev} al calor latente de evaporación del solvente. Por su parte, la Ecuación 4.2 describe el balance de masa del solvente que se evapora.

$$\frac{dm}{dt} = k_m A (\rho_{\text{sup gota/partícula}} - \rho_{\text{aire}}) \quad (4.2)$$

donde k_m corresponde al coeficiente pelicular de transferencia de masa, $\rho_{\text{sup gota/partícula}}$ y ρ_{aire} representan las concentraciones del solvente en el aire en la interfase y en el seno del fluido, respectivamente.

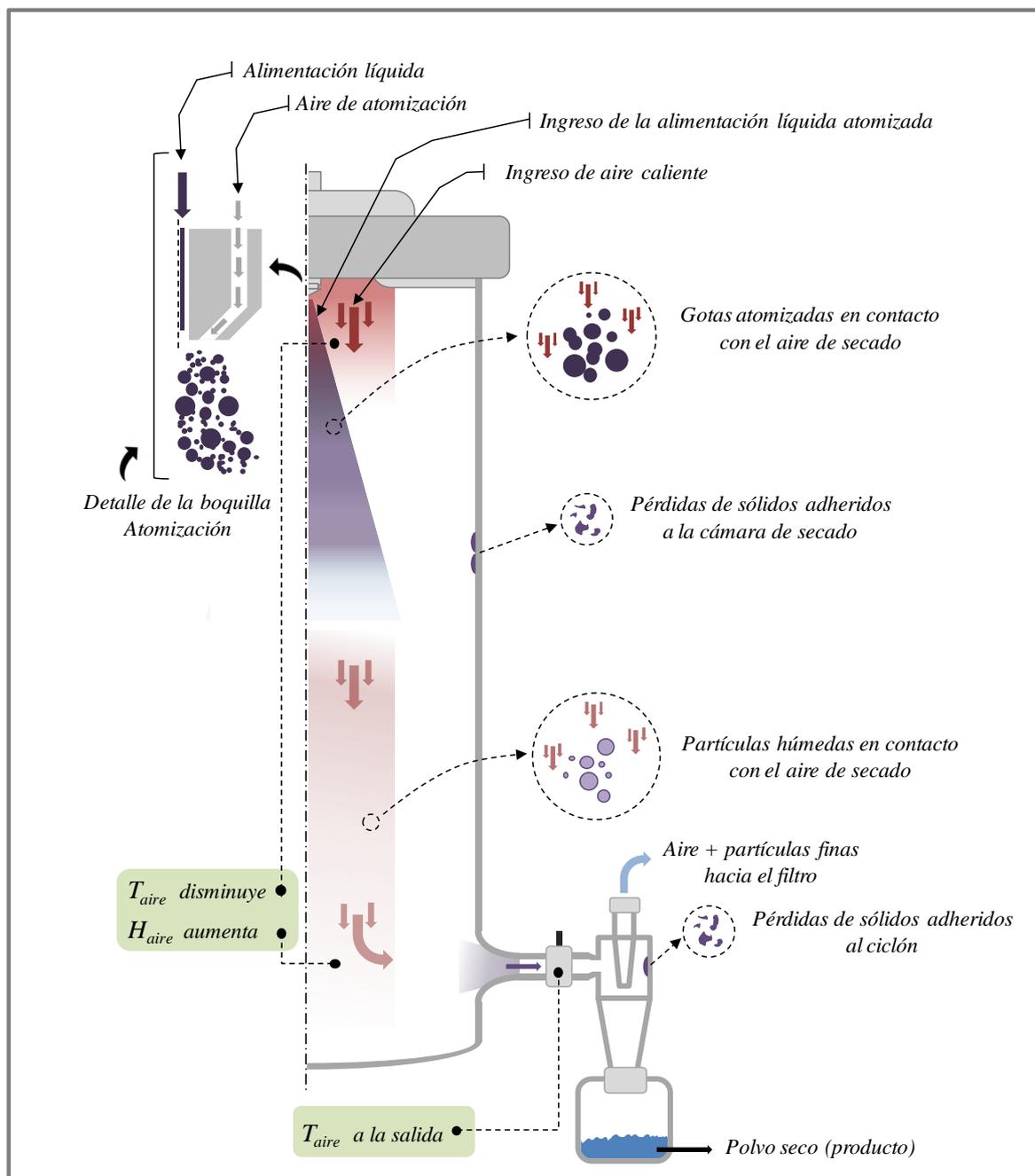


Figura 4.1. Esquema de las etapas del proceso de secado por atomización.

En general, el proceso de secado de las gotas puede ser dividido en dos etapas (Figura 4.2). En la primera etapa, la transferencia de calor desde el aire caliente hacia las gotas provoca la evaporación del solvente y el inicio de la disminución del tamaño de las gotas. La segunda etapa comienza con la formación de una corteza sólida en la superficie de las gotas, las cuales se van convirtiendo en partículas húmedas. La morfología de las partículas sólidas finales depende de múltiples variables, una de ellas está vinculada a la rigidez o flexibilidad que posea la corteza sólida inicial (Cotabarren et al., 2018).

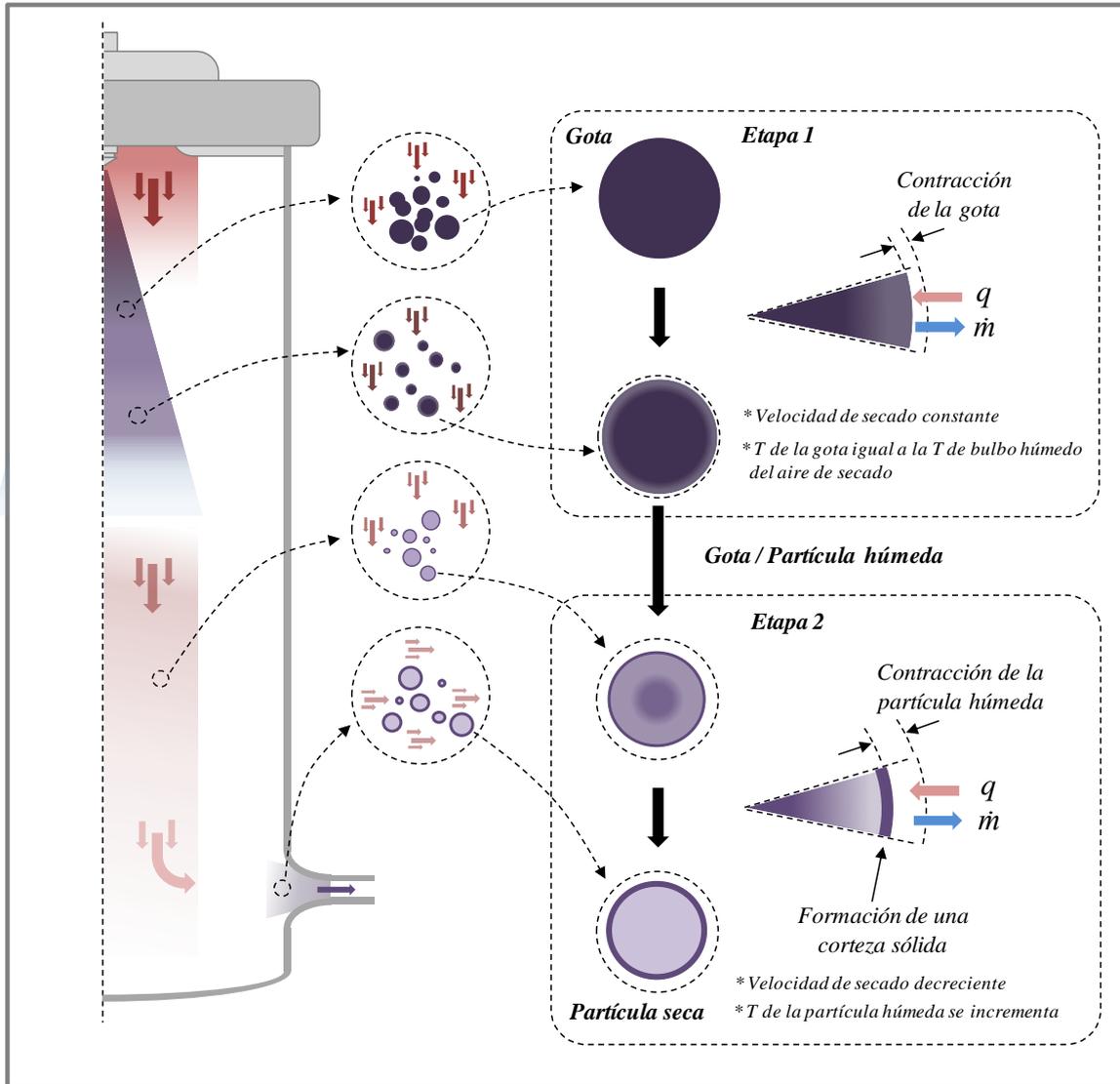


Figura 4.2. Etapas en el proceso de secado de las gotas/partículas.

Luego de un calentamiento inicial, tal como se ilustra en la [Figura 4.3](#), se desarrolla la primera etapa de secado. En esta fase se puede suponer que la velocidad de secado es prácticamente constante y la temperatura de la gota se aproxima a la temperatura de bulbo húmedo del aire. En la segunda etapa, la velocidad de secado comienza a disminuir y la temperatura de las partículas se incrementa ([Singh y Van den Mooter, 2016](#)).

Para procesar jugos o extractos de frutas mediante secado por atomización, se requiere frecuentemente del agregado de adyuvantes de secado. Estos aditivos permiten incrementar la temperatura de transición vítrea de los sólidos presentes en las formulaciones líquidas, y así, reducir el pegado de solutos en la cámara de secado. Por lo tanto, el uso de adyuvantes de secado permite incrementar el rendimiento del proceso ([Tonon et al., 2008](#); [Gallo et al., 2011](#)). Además, estos excipientes pueden proteger compuestos activos frente a distintos

factores medioambientales (calor, exposición al oxígeno y a la luz, entre otros), tanto durante el procesamiento como durante el almacenamiento, limitando así su reactividad (Shishir y Chen, 2017). Los adyuvantes de secado más utilizados suelen ser maltodextrina y goma arábica, principalmente debido a su elevada solubilidad y baja viscosidad en solución (Bhusari et al. 2014; Caliskan et al. 2016). Adicionalmente, se han utilizado celulosa microcristalina combinada con maltodextrina o goma arábica (Fazaeli et al., 2012), y dióxido de silicio coloidal en el caso de la producción de fitomedicamentos (Gallo et al., 2011 y 2015). El tipo y concentración de adyuvante, concentración de sólidos en la alimentación líquida y las condiciones operativas del secado por atomización, son parámetros del proceso que definen la calidad del producto en polvo. Por lo tanto, es necesario buscar la combinación óptima de estas variables para producir un producto en polvo con los atributos deseados.

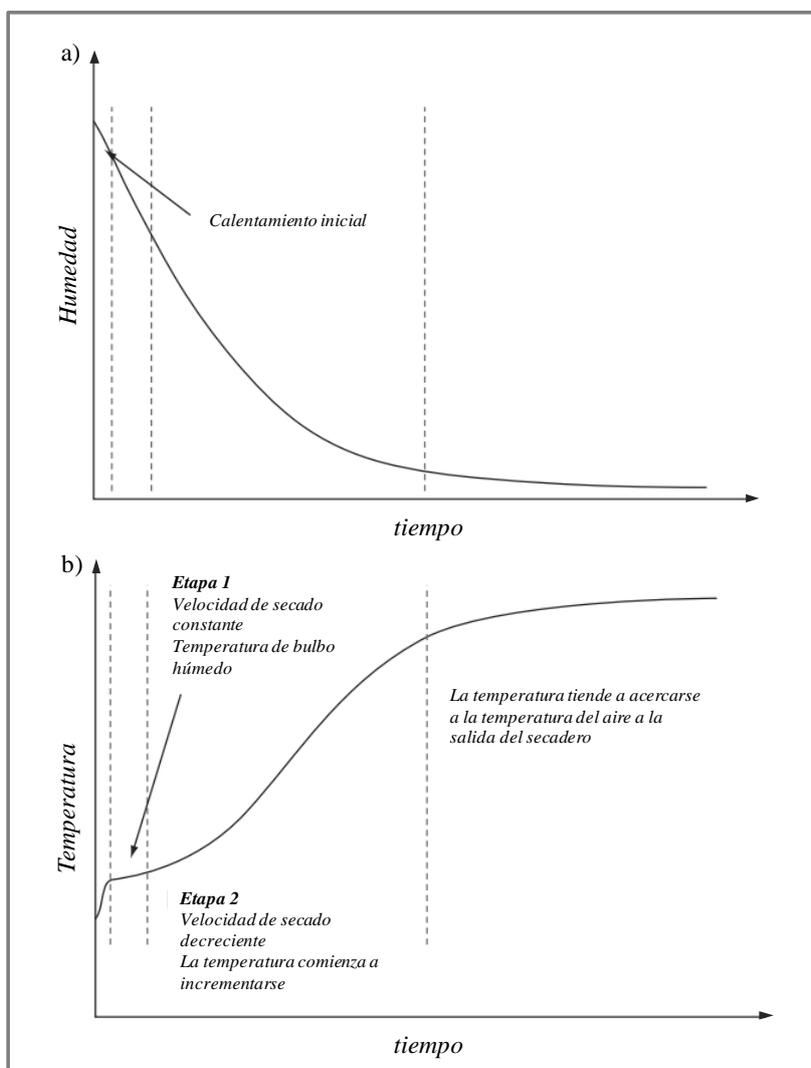


Figura 4.3. Perfiles de humedad (a) y temperatura (b) de la gota/partícula en función del tiempo.

Respecto al maqui, son escasos los trabajos sobre polvos. Recientemente, [Fredes et al. \(2018\)](#) obtuvieron polvos de maqui mediante secado por atomización. En dicho trabajo partieron de un jugo concentrado (comercial) de maqui y utilizaron inulina y alginato de sodio como adyuvantes de secado. Los polvos obtenidos tuvieron pobres propiedades físicas (por ejemplo, excesiva higroscopicidad), y concentraciones de antocianinas relativamente bajas (desaprovechando la potencialidad del maqui).

En este contexto, y partiendo del extracto acuoso de maqui obtenido según las condiciones óptimas de extracción detalladas en el Capítulo precedente, se propone obtener parámetros del proceso de secado por atomización óptimos para la producción de polvos con atributos específicos, tales como: elevada concentración de compuestos bioactivos e intensidad de color, buena fluidez y estabilidad física.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

Al igual que en los capítulos precedentes, se utilizó maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) recolectado en El Bolsón (provincia de Río Negro, Argentina), y conservado en condiciones detalladas en el Capítulo 2 hasta su procesamiento. La alimentación líquida sometida al proceso de secado por atomización fue el extracto acuoso del fruto de maqui obtenido según las condiciones optimizadas del proceso de extracción presentadas en el Capítulo 3.

Como adyuvantes de secado se utilizaron: maltodextrina de dextrosa equivalente (DE) 12, goma arábiga y celulosa microcristalina (Parafarm, Buenos Aires, Argentina), y dióxido de silicio coloidal (Aerosil 200®, Evonik Degussa Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina).

4.2.2. Producción de polvo de maqui mediante secado por atomización

4.2.2.1. Descripción del equipo de secado por atomización

El proceso de secado por atomización se llevó a cabo en un secadero escala laboratorio Mini Spray Dryer Büchi-290 (Flawil, Suiza) ([Figura 4.4](#)). Dicho secadero opera con una disposición en co-corriente entre la alimentación líquida y el aire de secado, dispone de una boquilla binaria para la atomización. Las condiciones operativas de secado que pueden

manipularse son: el caudal de la alimentación líquida, el caudal del aire de atomización, el caudal del aire de secado y su temperatura. La temperatura de salida se puede monitorear (se trata de una respuesta o variable dependiente), sin embargo no puede manipularse bajo la configuración de los lazos de control existentes en el equipo de laboratorio usado.

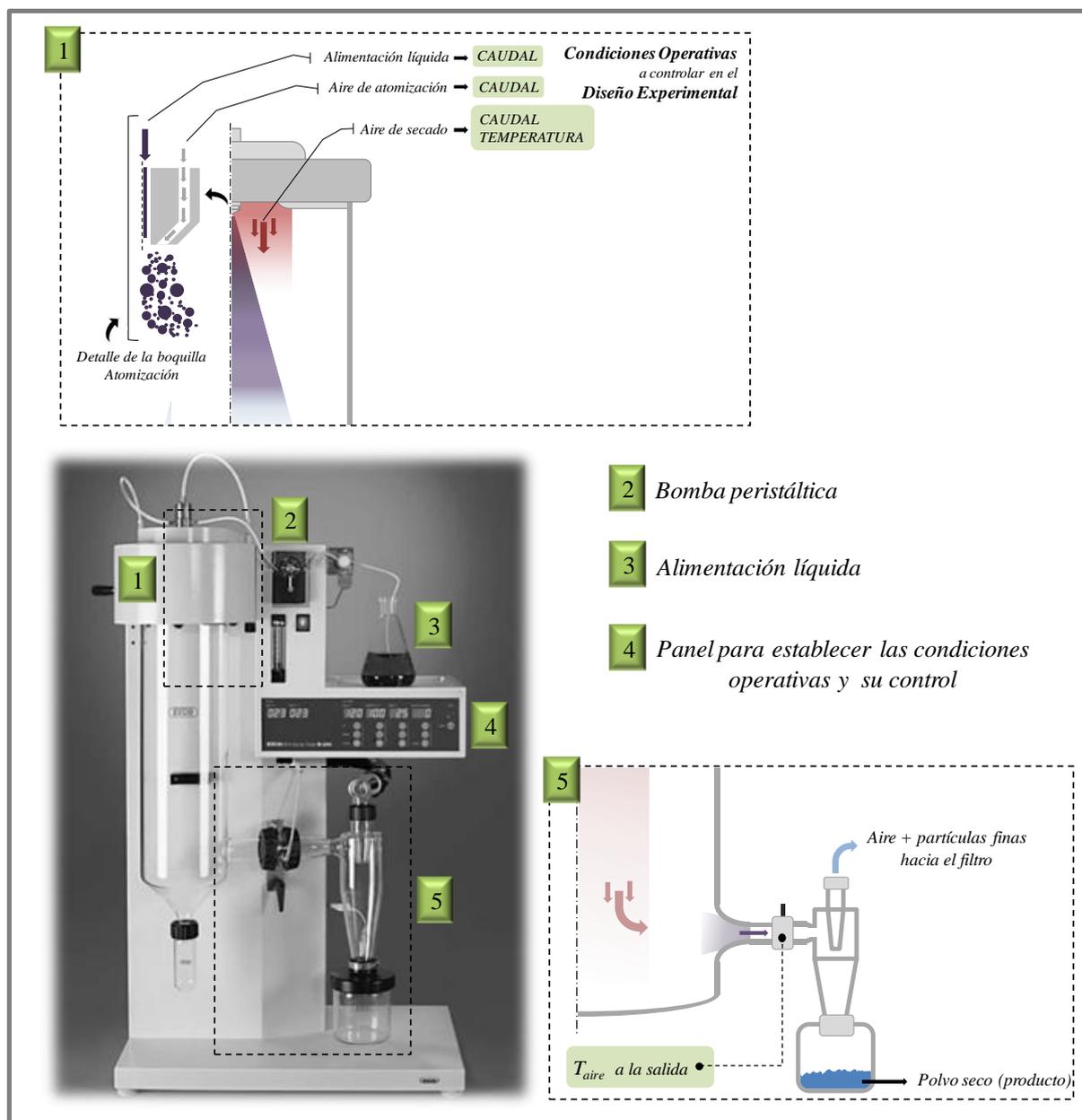


Figura 4.4. Secadero escala laboratorio Mini Spray Dryer Büchi-290. Descripción de condiciones operativas y variables medidas.

4.2.2.2. Preparación de la formulación de alimentación al proceso de secado

El extracto acuoso de maqui poseía un contenido de sólidos solubles (SS) de $10,0 \pm 0,1$ °Brix, una concentración de polifenoles totales (PT) de 595 ± 9 mg GAE / 100 ml, y un contenido de antocianinas monoméricas totales (ACY) de 263 ± 4 mg cy-3-glu / 100 ml. Dicho extracto y los adyuvantes se combinaron en diferentes proporciones Adyuvante:SS. Para asegurar la homogeneidad de la alimentación líquida, ésta se mantuvo en agitación vigorosa durante la mezcla del extracto acuoso y los adyuvantes de secado y a lo largo del proceso de secado. Para cada ensayo de secado se utilizaron 80 ml de alimentación líquida.

4.2.2.3. Selección del adyuvante de secado

A los fines de seleccionar el adyuvante de secado se realizaron ensayos utilizando las siguientes opciones: dióxido de silicio coloidal (SiO_2), goma arábica (GA), maltodextrina (M), y combinaciones de maltodextrina + celulosa microcristalina (CMC), y goma arábica + celulosa microcristalina. Con el propósito de obtener un polvo con alto contenido de compuestos bioactivos, se buscó minimizar las concentraciones de adyuvante de secado en la alimentación líquida.

En esta etapa del estudio, las condiciones operativas del equipo de secado por atomización fueron definidas mediante pruebas preliminares, utilizándose las mismas condiciones para todas las formulaciones líquidas ensayadas: temperatura del aire de secado a la entrada 130 °C, caudal del aire de atomización 400 l/h, caudal de la alimentación $1,5$ ml/min, y caudal del aire de secado 35 m³/h.

Las variables de respuesta analizadas en esta etapa fueron: rendimiento del proceso de secado, humedad de los polvos, parámetros de fluidez (ángulo de reposo e índice de Carr), concentración de compuestos bioactivos (antocianinas monoméricas y polifenoles), y color superficial de los polvos. Más adelante, en secciones específicas, se detalla la metodología utilizada para la determinación de cada una de las respuestas evaluadas.

4.2.2.4. Efectos de las condiciones operativas (CO)

4.2.2.4.1. Diseño experimental

El estudio de los efectos de las condiciones operativas de secado sobre un conjunto de variables de respuesta seleccionadas, fue llevado adelante mediante un diseño factorial completo 2^4 constituido por 16 ensayos. Todas las experiencias fueron realizadas de manera

aleatoria y por duplicado (32 experimentos en total). Las CO estudiadas fueron: temperatura del aire de secado a la entrada del secadero, caudal del aire de secado, caudal de la alimentación líquida, y caudal del aire de atomización (es decir, las cuatro variables independiente manipulables del secadero). Los niveles fijados para cada una de las variables se encuentran indicados en la [Tabla 4.1](#).

Tabla 4.1. Condiciones operativas del proceso de secado por atomización y niveles seleccionados para el diseño experimental 2^4 .

Condiciones operativas	Nivel bajo	Nivel alto	Unidad
	Valor codificado (-1)	Valor codificado (+1)	
A (temperatura del aire de secado en la entrada)	110	150	°C
B (caudal del aire de atomización)	400	700	l/h
C (caudal de la alimentación)	1,5	3,0	ml/min
D (caudal del aire de secado)	32	38	m ³ /h

En el presente diseño experimental, se analizaron las siguientes variables de respuesta: ángulo de reposo e índice de Carr para caracterizar la fluidez de los polvos, rendimiento del proceso de secado, humedad del polvo, distribución de tamaños de partícula, color superficial, ACY, PT, y CA de los polvos. La temperatura del aire a la salida del secadero también fue monitoreada y registrada.

Posteriormente, para un conjunto específico de polvos se determinó higroscopicidad, actividad acuosa, temperatura de transición vítrea, estructura de estado sólido, y la morfología de las partículas.

4.2.2.4.2. Análisis estadístico

Tanto para la etapa de la selección del adyuvante de secado como para la etapa del estudio de los efectos de las CO del proceso de secado, los resultados experimentales fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Para la selección del adyuvante de secado se utilizó el test de Tukey para discernir sobre diferencias significativas (o no) entre las medias de los resultados obtenidos con distintos excipientes. En el caso del diseño factorial 2^4 , se ajustaron las distintas variables de respuesta utilizando polinomios en función de las variables independientes tal como se describe en la [Ecuación 4.3](#).

$$Y=b_0+\sum_i b_i X_i+\sum_i \sum_{j \neq i} b_{ij} X_i X_j+\sum_i \sum_{j \neq i} \sum_{k \neq j \neq i} b_{ijk} X_i X_j X_k+b_{ijkl} X_i X_j X_k X_l \quad (4.3)$$

donde Y es la variable de respuesta, b_i , b_{ij} , b_{ijk} , b_{ijkl} (con i, j, k, y l desde A hasta D) son los coeficientes de los efectos principales y de las interacciones entre los factores, y X_i , X_j , X_k , X_l corresponden a los valores codificados de las variables independientes (ver [Tabla 4.1](#)). El parámetro b_0 representa la media aritmética (entre los ensayos del diseño completo) para cada variable de respuesta.

El resultado del test de Fisher (*F*-value) fue utilizado para evaluar el efecto de cada condición operativa y de sus interacciones sobre las variables de respuesta; y los resultados de *p*-value fueron empleados para detectar los niveles de significancia estadística de dichos efectos. Por último, el coeficiente de determinación (R^2) fue utilizado para determinar la calidad del modelo para reproducir los resultados experimentales.

4.2.3. Fluidéz de los polvos

Para la determinación de las propiedades de flujo de los polvos obtenidos por secado por atomización se calcularon los siguientes indicadores de fluidez: ángulo de reposo e índice de Carr.

4.2.3.1. Ángulo de reposo

Se vertió una masa de 2 g de polvo de maqui a través de un embudo, sostenido por un pie de mesada a una altura fija de 3 cm desde el extremo inferior del embudo hasta una superficie horizontal cubierta con papel. De esta manera se formó un “cono” de polvo al cual se le midió la altura (h) y el diámetro (d) de su base con un calibre. El ángulo de reposo (AR) se calcula como la función inversa tangente de $h / (d/2)$. Ángulos de reposo en los rangos 25-30°, 31-35°, 36-40°, indican fluidez excelente, buena y aceptable, respectivamente. Valores superiores a 41° indican que el polvo presenta una pobre fluidez ([USP 30-NF 25, 2007](#)).

4.2.3.2. Índice de Carr

Se determinó el Índice de Carr (IC) siguiendo la metodología propuesta por [Gallo et al. \(2015\)](#). En una probeta de 10 cm³ previamente tarada se vertió una masa determinada de

polvo de maqui (2 g). La densidad a granel (D_g) fue calculada como la relación entre la masa de polvo y el volumen ocupado. La densidad empaquetada (D_e) se determinó sometiendo a la probeta con el polvo pesado a una serie de impactos verticales suaves hasta que el volumen final ocupado no presentó variaciones. La densidad se calculó como la relación entre la masa del polvo y el volumen ocupado después de los impactos. El IC se calcula según la [Ecuación 4.4](#).

$$IC = \frac{(D_e - D_g)}{D_e} 100 \quad (4.4)$$

De acuerdo al rango de valores de IC, se pueden establecer las siguientes condiciones de fluidez: IC \leq 10% excelente, 11% < IC < 15% buena, c) 16% < IC < 20% razonable, 21% < IC < 25% aceptable, y 26% < IC < 31% pobre ([USP 30-NF 25, 2007](#)).

4.2.4. Rendimiento del proceso de secado por atomización

El rendimiento del proceso de secado (RP) fue calculado como la relación entre el peso del polvo colectado luego del secado por atomización, y la cantidad de sólidos contenidos en la alimentación líquida.

4.2.5. Humedad en los polvos

La humedad de los polvos (H) de maqui fue determinada por medio de un analizador de humedad con lámpara de halógeno como fuente de calor modelo M45 (OHAUS, Pine Brook, USA). Las mediciones fueron realizadas por triplicado inmediatamente después del secado. Aproximadamente 0,5 g de muestral fue calentada hasta 60 °C hasta que la variación del peso fue menor a 1 mg en un tiempo de 90 s.

4.2.6. Actividad acuosa de los polvos

Se determinó mediante el método oficial [AOAC \(1990\)](#). Las medidas se realizaron utilizando un higrómetro de punto de rocío modelo Series 3 (Aqua-Lab, Decagon Devices Inc., Pullman, Washington, USA) calibrado previamente con soluciones saturadas de sales.

4.2.7. Distribución de tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partículas de los polvos de maqui se determinó en un equipo de difracción de rayos láser modelo LA-950 V2 (Horiba, Kioto, Japón), con la metodología de polvo seco. Como indicadores de la distribución del tamaño de partículas se reportaron la mediana de la distribución de tamaños expresada en masa y el índice de span (Gallo et al., 2015). El span es una medida de la dispersión de la distribución de tamaño de partículas y se calculó según la Ecuación 4.5.

$$\text{span} = \frac{(D_{90}-D_{10})}{D_{50}} \quad (4.5)$$

donde D_{90} , D_{50} (mediana) y D_{10} son los diámetros para los cuales la masa de la población de partículas está por debajo del 90, 50 y 10 % de la masa total, respectivamente.

4.2.8. Morfología de las partículas

La morfología de un conjunto de polvos de maqui seleccionados, fue evaluada por microscopía de barrido electrónico (SEM) utilizando un microscopio modelo EVO 40-XVP, LEO (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las muestras de polvo fueron acondicionadas secándolas bajo corriente de aire sobre un portaobjeto, y posteriormente fueron metalizadas con oro para garantizar conductividad utilizando un pulverizador PELCO 91000 (Tell Pella, Canadá).

4.2.9. Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea (T_g) se obtuvo mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se trabajó con un equipo DSC modelo Pyris 1 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Las muestras de polvo de aproximadamente 10 mg fueron colocadas en cápsulas herméticas de aluminio. Se realizó un primer barrido desde 25 °C hasta 150 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, para eliminar la historia térmica del material. Luego las muestras fueron enfriadas hasta 25 °C y nuevamente recalentadas hasta 150 °C, siempre a la misma velocidad (10 °C/min). La T_g fue calculada como la temperatura a la que se produce la mitad del cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p).

4.2.10. Difracción de rayos X

La estructura de los polvos fue analizada por medio de difracción de rayos X utilizando un equipo modelo DMAX 3 C (Rigaku Geigerflek, Tokio, Japón). El ánodo se operó a 35 kV y 15 mA. Las mediciones fueron realizadas desde 2° hasta 60° sobre la escala 2θ, a una velocidad de barrido de 4°/min.

4.2.11. Higroscopicidad

La higroscopicidad de los polvos fue determinada de acuerdo con la metodología descrita por [Daza et al. \(2016\)](#). Las muestras secadas por atomización (aproximadamente 0,3 g) fueron almacenadas durante 7 días en un recipiente cerrado a 20 °C y a una humedad relativa de 75% (dada por una solución saturada de cloruro de sodio). La higroscopicidad fue expresada como g de agua adsorbida por 100 g de polvo seco.

4.2.12. Color superficial

El color superficial fue determinado mediante la medición de parámetros triestímulo (espacio de color CIELAB) con un fotocolorímetro modelo CR 400 (Minolta, Tokio, Japón), utilizando el iluminante C y un ángulo de observación de 2°. El fotocolorímetro fue calibrado con una placa de cerámica blanca. Los valores de L* (luminosidad), a* (cromaticidad en el eje verde-rojo), y b* (cromaticidad en el eje azul-amarillo) fueron registrados. Luego, con dichos valores se calcularon las funciones de color “croma” (C*_{ab}), “ángulo de tono” (h_{ab}) y “cambio global de color” (ΔE*_{ab}) utilizando las [Ecuaciones 4.6 a 4.8](#), respectivamente.

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (4.6)$$

$$h_{ab} = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (4.7)$$

$$\Delta E^*_{ab} = \left[(\Delta L^*_{ab})^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right]^{1/2} \quad (4.8)$$

4.2.13. Propiedades funcionales de los polvos

Para la determinación de las propiedades funcionales de los polvos se utilizaron las técnicas espectrofotométricas descritas para el caso del fruto de maqui: método del pH diferencial para la cuantificación de ACY, técnica del reactivo de Folin-Ciocalteu para la determinación de PT, y la técnica del reactivo ABTS para la evaluación de CA (ver las secciones 2.2.3.1, 2.2.3.2 y 2.2.3.3, respectivamente). Las técnicas se aplicaron a muestras líquidas obtenidas mediante disolución en agua del polvo obtenido en cada uno de los ensayos (500 mg de polvo en 10 ml de agua).

Los resultados de las determinaciones de ACY se expresaron en mg de cianidin-3-glucosido cada 100 g de polvo (mg cy-3-glu / 100 g), y para el caso de PT y CA fueron expresadas en mg de equivalentes de ácido gálico cada 100 g de polvo (mg GAE / 100 g).

4.2.14. Perfil de antocianinas del polvo óptimo mediante HPLC

Se tomó una masa de 200 mg del polvo óptimo y se diluyó en metanol utilizando un matraz de 10 ml. Luego, sobre una alícuota de dicha muestra se aplicó la metodología detallada en la sección 2.2.5, pero utilizando únicamente la señal del detector DAD a 520 nm y los estándares de antocianinas, para determinar su perfil mediante HPLC.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Selección del adyuvante de secado

En primer lugar, se evaluó la posibilidad de secar el extracto óptimo obtenido sin el agregado de adyuvante de secado. Debido a que los sólidos solubles del extracto acuoso de maqui (principalmente azúcares) poseen baja temperatura de transición vítrea, como era de esperar, no fue factible el secado sin el uso de adyuvante. En efecto, el rendimiento del proceso fue prácticamente nulo y se observó que el material seco quedaba adherido de forma “caramelizada” en la parte superior del ciclón (Figura 4.5). Por esta razón, manteniendo constantes las condiciones operativas del proceso, se evaluó el efecto del agregado de distintos adyuvantes de secado utilizando bajas concentraciones, tendiendo a maximizar la concentración de compuestos bioactivos en el polvo final. Se encontraron dos desafíos contrapuestos al momento de definir las concentraciones de adyuvante a utilizar en cada caso:

a) caída abrupta del rendimiento del proceso si se utilizaba una concentración de adyuvante menor a un valor límite inferior y b) incremento de la viscosidad de la formulación líquida al aumentar la concentración de adyuvante. Estas dificultades prácticas limitaron la posibilidad de utilizar la misma concentración para cada tipo de adyuvante ensayado. Sin embargo, se buscó que fueran aproximadamente del mismo orden de magnitud para poder comparar el desempeño de los distintos excipientes. Luego de varias pruebas preliminares se definieron las concentraciones de adyuvantes (solos o en combinación) que condujeron a las formulaciones de las alimentaciones líquidas presentadas en la [Tabla 4.2](#). Para todos los adyuvantes, se seleccionó la mínima concentración de los mismos que permitía obtener rendimientos del proceso satisfactorios.



Figura 4.5. Procesamiento sin uso de adyuvantes de secado: vista del producto caramelizado adherido a las paredes del ciclón (rendimiento nulo).

Tabla 4.2. Formulaciones de las alimentaciones líquidas.

Formulaciones líquidas	SiO ₂ :SS	GA:SS	M:SS	M:CMC:SS	GA:CMC:SS
Relaciones másicas	0,5:1	1:1	1:1	0,67:0,33:1	0,67:0,33:1

La [Tabla 4.3](#) presenta los valores obtenidos para las respuestas RP, H, AR, IC, ACY y PT para las formulaciones ensayadas. Las propiedades de flujo de un polvo es una característica relevante para su uso en diferentes aplicaciones. En este sentido, los polvos procesados con SiO₂ mostraron los valores más bajos de IC ($8,0 \pm 1,7$ %) y AR ($30,4 \pm 0,7$ °), los cuales indicaron una fluidez excelente. Varios estudios sobre polvos obtenidos a partir de

diferentes extractos de hierbas medicinales, también mostraron muy buenas propiedades de flujo al utilizar SiO₂ como adyuvante en proporciones SiO₂:SS entre 0,5:1 y 1:1 (Gallo et al., 2011 y 2015).

En los casos en los que se utilizaron M y GA como adyuvantes (aun cuando se utilizaron proporciones adyuvante:SS mayores que cuando se empleó SiO₂), los polvos de maqui mostraron una fluidez entre aceptable y pobre (valores de IC entre 23,5 y 30 %, y de AR entre 38 y 39 °). Estos resultados son similares a los reportados en otros trabajos publicados en los que se han utilizado M y GA. Por ejemplo, Caliskan et al. (2016) secaron extractos de frutos de sumac mediante secado por atomización, utilizando maltodextrina (proporción carrier:SS en el rango 0,67:1 - 1,5:1) y obtuvieron valores de IC entre 28 and 41%. Bhusari et al. (2014) produjeron polvos a partir de pulpa de tamarindo mediante secado por atomización utilizando los mismos adyuvantes (carrier:SS en el rango 0,67:1 - 1,5:1), obteniendo valores de IC entre 22-34 % (fluidez aceptable-pobre).

También se prepararon mezclas binarias de adyuvantes (M-CMC y GA-CMC). Según se observa en la Tabla 4.3, la adición de CMC modificó la fluidez de los polvos, sin embargo, esta propiedad no mejoró de manera considerable.

Tabla 4.3. Rendimiento del proceso (RP), humedad (H), ángulo de reposo (AR), índice de Carr (IC), antocianinas monoméricas (ACY) y polifenoles totales (PT).

Variables de Respuesta	Muestras				
	SiO ₂ :SS (0,5:1)	GA:SS (1:1)	M:SS (1:1)	M:CMC:SS (0,67:0,33:1)	GA:CMC:SS (0,67:0,33:1)
RP (%)	70 ± 1 ^a	61 ± 1 ^b	67 ± 1 ^c	53 ± 1 ^d	58 ± 1 ^e
H (%)	4,9 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,4 ^b	2,5 ± 1,0 ^b	3,4 ± 0,3 ^b	2,4 ± 0,1 ^b
AR (°)	30,4 ± 0,7 ^a	38,3 ± 0,2 ^b	38,8 ± 0,4 ^b	35,6 ± 0,8 ^c	33,9 ± 0,9 ^c
IC (%)	8,0 ± 1,7 ^a	30,3 ± 2,7 ^b	23,5 ± 2,9 ^b	27,4 ± 5,6 ^b	27,9 ± 3,6 ^b
ACY (mg cy-3glu/100g)	1528 ± 41 ^a	1284 ± 27 ^b	1275 ± 4 ^b	1352 ± 10 ^c	1345 ± 10 ^c
PT (mg GAE/100g)	3936 ± 132 ^a	3393 ± 114 ^b	3039 ± 66 ^c	3012 ± 45 ^c	3456 ± 102 ^b

En cada fila, las medias con diferentes letras en los superíndices difieren entre sí de manera significativa ($p < 0,05$).

Respecto al rendimiento del proceso, aunque los polvos elaborados con SiO₂ exhibieron el mejor desempeño (70 ± 1 %), los resultados obtenidos con M (67 ± 1%) y GA (61 ± 1%) también fueron satisfactorios. Daza et al. (2016) obtuvieron rendimientos del proceso en el rango de 41-81 % luego del secado por atomización de extractos de frutos de

cagaita utilizando GA como adyuvante (carrier:SS entre 0,56:1 y 1,67:1) . En el trabajo anteriormente mencionado de [Bhusari et al. \(2015\)](#), obtuvieron rendimientos entre 45-60 % y 60-70 % al utilizar M y GA, respectivamente. En el presente trabajo, el agregado de CMC provocó una disminución del rendimiento del proceso con respecto a la utilización de los adyuvantes de secado de manera individual.

En lo concerniente a la humedad, todos los polvos obtenidos mediante secado por atomización presentaron valores menores al 5 %. Este valor es lo suficientemente bajo como para que los polvos sean resistentes a la degradación microbiológica y oxidativa ([Shishir y Chen, 2017](#)).

Con respecto a la concentración de compuestos bioactivos, se pudo observar que el uso de SiO₂ permitió obtener polvos con los valores más altos (PT = 3936 ± 132 mg GAE/100 g, ACY = 1528 ± 41 mg cy-3glu/100 g). Este resultado es consistente con la menor cantidad de excipiente usada como adyuvante de secado.

Por otro lado, han sido reportados otros efectos positivos del SiO₂ en la calidad de polvos obtenidos a partir de extractos. [Georgetti et al. \(2008\)](#) resaltaron la baja degradación de compuestos fenólicos observada al utilizar SiO₂ como adyuvante de secado al procesar extractos de proto de soja mediante secado por atomización. Los autores encontraron que las concentraciones de polifenoles fueron entre un 5 y un 11% más altas que en aquellos casos en los cuales utilizaron otros adyuvantes de secado como maltodextrina y almidón.

En cuanto al color de los polvos usando distintos adyuvantes, los parámetros de color (L*, a*, b*; mostrados en la [Figura 4.6](#)) indicaron que todos productos se encontraron en el cuarto cuadrante del espacio de color CIELAB. Específicamente se ubicaron en el área de las tonalidades púrpuras oscuras. De acuerdo con los valores de las coordenadas de color, se pudieron distinguir dos grupos. Por un lado, los polvos que no poseen CMC, los cuales exhibieron una luminosidad mayor, y un ángulo de tono más desplazado hacia las tonalidades azules (los valores de h_{ab} variaron entre -9,9 y -13,1°, y los valores de C*_{ab} lo hicieron entre 16,9 y 20,6). Por otro lado, los polvos que sí poseen CMC, los cuales mostraron una leve disminución de la luminosidad, y un ángulo de tono ligeramente desplazado hacia zonas más rojizas (h_{ab} = -5,4 ± 0,5°, C*_{ab} = 16,9 ± 0,5). La diferencia global de color (ΔE^*_{ab}) calculada entre los dos grupos mencionados varió entre 5,3 y 6,2, lo cual indicó que la diferencia de color es distinguible por inspección visual ([Lao y Giusti 2017](#)).

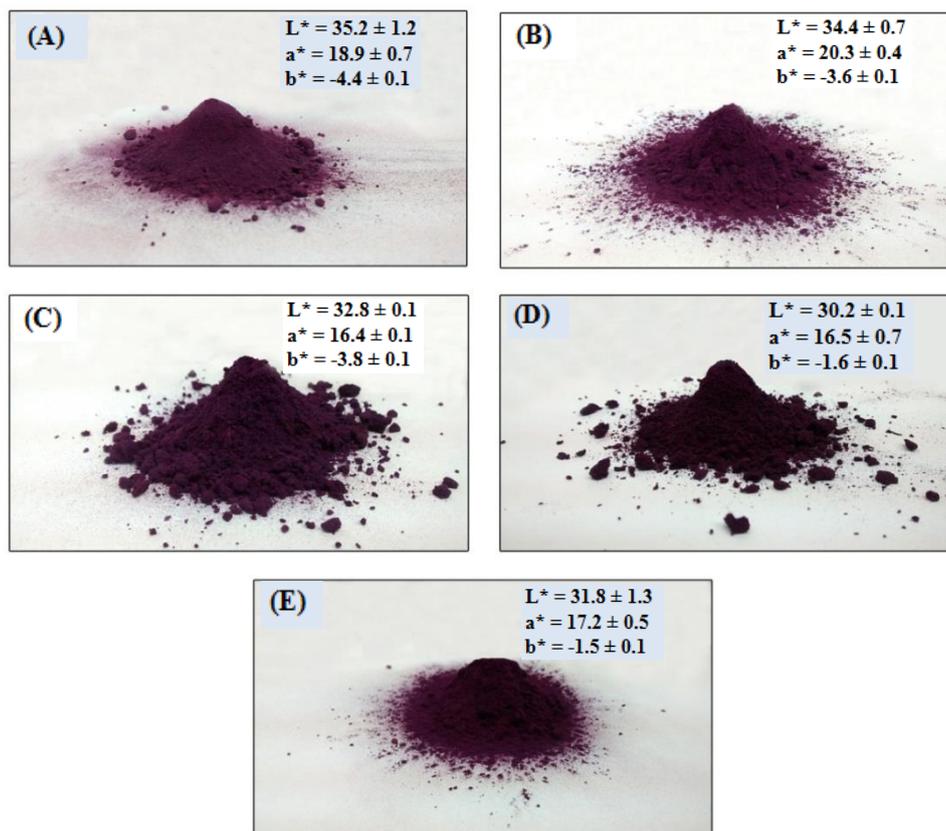


Figura 4.6. Coordenadas de color en el espacio CIELAB (L^* , a^* , b^*) e imágenes de los polvos de maqui obtenidos con los distintos adyuvantes: (A) SiO_2 , (B) GA, (C) M, (D) M/CMC, and (E) GA/CMC.

La evaluación integral de los resultados indica que el SiO_2 presenta ventajas respecto a los otros excipientes empleados: 1) fue el adyuvante que pudo ser combinado en menor concentración (es decir, menor consumo de carrier por unidad de volumen procesado), y aun así, presentó el mayor rendimiento de proceso; 2) los parámetros de fluidez se ubicaron en valores de fluidez excelente, contrastando significativamente con los resultados obtenidos haciendo uso de los otros excipientes (fluidez en los límites de aceptabilidad); y 3) los niveles de concentración de compuestos bioactivos fueron los más elevados. Por las razones antes expuestas, se seleccionó al dióxido de silicio coloidal como adyuvante de secado de extractos acuosos de maqui.

La proporción $\text{SiO}_2:\text{SS} = 0,5:1$ resultó adecuada para obtener muy buenos rendimientos de secado, buenas propiedades de flujo y color de los polvos. Por esta razón para

el estudio de búsqueda de condiciones óptimas se mantuvo el tipo y concentración de adyuvante.

4.3.2. Análisis del diseño experimental factorial 2⁴: efectos de las condiciones operativas sobre las variables de respuesta

La [Tabla 4.4](#) muestra las respuestas obtenidas para los distintos niveles de las condiciones operativas ensayadas ([Tabla 4.1](#)): temperatura del aire de secado en la entrada (A), caudal del aire de atomización (B), caudal de la alimentación (C), y caudal del aire de secado (D). Los resultados del ANOVA y de los coeficientes de regresión de los modelos polinómicos para las variables de respuesta se resumen en la [Tabla 4.5](#).

4.3.2.1. Fluidez: ángulo de reposo (AR) e Índice de Carr (IC)

Todos los polvos presentaron excelente o buena fluidez (los valores de ángulo de reposo se encontraron entre 23,3° y 33,5°). Los polvos pudieron ser clasificados en dos grupos: a) aquellos que fueron obtenidos con el nivel más bajo de B (400 l/h) y que exhibieron los valores más bajos de AR, y b) los que fueron producidos con el nivel más alto de B (700 l/h) y presentaron los resultados de ángulo de reposo más altos. De hecho, el factor que tuvo mayor incidencia sobre la fluidez de los polvos fue B ($F = 230,50$). Cuanto más bajo sea el caudal de aire de atomización, más grandes serán las dimensiones de las gotas a la salida de la boquilla del atomizador ([Vicente et al., 2013](#)). Considerando que la alimentación líquida tuvo la misma concentración de sólidos para todos los ensayos, las gotas más grandes son precursoras de partículas con diámetros más grandes, y por lo tanto ángulos de reposo más bajos. Consecuentemente, la fluidez de los polvos fue afectada positivamente por la disminución del caudal de aire de atomización. El valor de B también tuvo un efecto importante sobre el índice de Carr ($F = 135,13$). Al igual que para el ángulo de reposo, los valores más bajos de IC fueron obtenidos al utilizar el nivel más bajo del caudal de aire de atomización. El índice de Carr, como puede observarse en la [Tabla 4.5](#), depende tanto de efectos principales de factores como de interacciones. Junto con el factor B, la interacción entre los factores BC también fue significativa ($F = 30,98$). Para el caso de bajos caudales de aire de atomización, los valores de IC indicaron buena fluidez de los polvos, en acuerdo con los resultados obtenidos para AR.

Tabla 4.4. Matriz experimental del diseño factorial 2⁴ y resultados de las respuestas evaluadas.

Corrida	A	B	C	D	AR ^a (°)	IC ^a (%)	RP ^b (%)	H ^b (%)	D ₅₀ ^b (µm)	Span	T _{salida} ^b (°C)	CA ^a (mg GAE/100g)	ACY ^a (mg cy-3-glu/100g)	PT ^a (mg GAE/100g)
1	-1	+1	+1	-1	32,0 ± 0,6	15,9 ± 1,9	80,8 ± 0,8	4,4 ± 1,2	7,16 ± 0,07	1,19	68,0 ± 1,4	1857 ± 14	1392 ± 110	4179 ± 153
2	+1	+1	+1	+1	31,8 ± 1,0	21,1 ± 1,1	77,0 ± 0,1	3,6 ± 0,4	8,11 ± 0,03	1,25	96,0 ± 1,4	1851 ± 66	1513 ± 41	4116 ± 161
3	-1	+1	-1	+1	28,9 ± 0,8	24,3 ± 0,1	84,1 ± 1,9	3,5 ± 0,8	7,21 ± 0,74	1,4	80,5 ± 0,7	1886 ± 72	1372 ± 87	4217 ± 97
4	-1	+1	+1	+1	31,8 ± 3,2	16,5 ± 1,9	82,6 ± 3,2	3,7 ± 0,3	7,38 ± 1,58	1,28	72,0 ± 1,4	1866 ± 45	1426 ± 47	4260 ± 48
5	-1	-1	-1	+1	23,4 ± 0,2	14,6 ± 1,1	63,8 ± 3,1	3,6 ± 0,5	13,65 ± 0,56	1,25	85,5 ± 0,7	1799 ± 21	1612 ± 12	4167 ± 47
6	-1	-1	+1	+1	25,4 ± 1,4	14,9 ± 0,1	64,9 ± 1,9	3,4 ± 0,2	13,54 ± 0,12	1,31	75,5 ± 0,7	1816 ± 14	1528 ± 11	4294 ± 133
7	-1	-1	+1	-1	24,2 ± 0,3	14,6 ± 0,4	67,1 ± 2,3	3,0 ± 0,2	13,73 ± 1,24	1,95	71,5 ± 0,7	1815 ± 15	1612 ± 12	4221 ± 41
8	+1	-1	+1	+1	23,5 ± 1,3	15,1 ± 1,5	61,6 ± 2,9	3,1 ± 0,7	14,07 ± 0,89	1,23	104,5 ± 0,7	1992 ± 104	1616 ± 44	4464 ± 134
9	+1	-1	+1	-1	23,7 ± 0,3	14,1 ± 1,5	59,8 ± 3,9	3,4 ± 0,8	15,49 ± 0,08	1,25	96,0 ± 1,4	1907 ± 16	1600 ± 7	4253 ± 163
10	+1	+1	+1	-1	31,5 ± 0,5	19,8 ± 1,9	77,3 ± 0,7	3,1 ± 0,1	8,61 ± 0,78	1,12	88,5 ± 0,7	1817 ± 24	1471 ± 19	4152 ± 45
11	+1	+1	-1	+1	31,9 ± 2,2	20,6 ± 2,2	65,1 ± 2,2	3,1 ± 0,3	7,52 ± 0,22	1,12	105,5 ± 0,7	1798 ± 10	1385 ± 40	4408 ± 33
12	+1	+1	-1	-1	33,5 ± 1,8	24,6 ± 2,6	69,6 ± 4,7	3,4 ± 0,3	7,73 ± 0,88	1,29	98,5 ± 0,7	1821 ± 73	1409 ± 19	4199 ± 269
13	-1	+1	-1	-1	32,1 ± 0,8	25,9 ± 0,1	81,3 ± 1,4	3,2 ± 0,4	7,39 ± 0,83	1,09	75,0 ± 1,4	1863 ± 107	1443 ± 37	4350 ± 56
14	-1	-1	-1	-1	23,6 ± 0,8	11,7 ± 2,7	64,6 ± 1,9	3,5 ± 1,4	13,93 ± 1,12	2,00	80,5 ± 0,7	1940 ± 10	1516 ± 85	4258 ± 81
15	+1	-1	-1	-1	22,3 ± 1,6	13,4 ± 2,5	69,9 ± 4,3	3,3 ± 0,6	12,83 ± 1,36	1,06	105,5 ± 0,7	2054 ± 41	1573 ± 68	4365 ± 57
16	+1	-1	-1	+1	25,6 ± 2,2	13,7 ± 1,9	69,5 ± 1,8	3,1 ± 0,1	14,13 ± 0,95	1,13	111,5 ± 0,7	2017 ± 50	1643 ± 36	4311 ± 138

^a Los valores de las respuestas son expresados como la media de tres determinaciones ± el desvío estándar.

^b Los valores de las respuestas son expresados como la media de dos determinaciones ± el desvío estándar.

Las variables A, B, C, D corresponden a las condiciones operativas utilizadas. En cada una de sus respectivas columnas se representan los valores codificados de sus niveles (Tabla 4.1).

Tabla 4.5. Coeficientes de los efectos principales y de las interacciones entre dos y tres factores (Ecuación 4.3).

Respuesta	b_0	b_a	b_b	b_c	b_d	b_{ab}	b_{ac}	b_{ad}	b_{bc}	b_{bd}	b_{cd}	b_{abc}	b_{abd}	b_{acd}	b_{bcd}	b_{abcd}	R^2
AR	27,82	Ns	3,86**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-0,55*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,94
IC	17,64	Ns	3,61**	-1,11*	Ns	Ns	0,67*	Ns	-1,73**	Ns	Ns	0,86*	Ns	Ns	Ns	Ns	0,93
RP	71,16	-2,43**	6,01**	Ns	Ns	-2,49**	Ns	Ns	2,04**	Ns	Ns	2,69**	Ns	Ns	Ns	Ns	0,94
H	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-
D ₅₀	10,78	Ns	-3,14**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,97
CA	1881,16	25,91**	-36,34**	Ns	Ns	-48,97**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,81
ACY	1506,72	Ns	-80,59**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	25,22**	Ns	0,86
PT	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-

* Efecto principal o de interacción significativo ($p < 0,05$).

** Efecto principal o de interacción altamente significativo ($p < 0,01$).

Ns: Efecto principal o de interacción no significativo.

4.3.2.2. Rendimiento del proceso (RP)

El rendimiento del proceso de secado varió entre 59,8 % y 84,1 % (Tabla 4.4), valores en el orden a los esperados para secaderos de atomización de escala laboratorio. Esta variable de respuesta también fue fuertemente dependiente de efectos principales y de interacción de distintos factores (ver Tabla 4.5). El factor B presentó un efecto altamente significativo ($F = 162,51$), y adicionalmente las interacciones ABC ($F = 32,63$) y AB ($F = 27,96$), junto con el efecto principal de A ($F = 18,66$), fueron estadísticamente significativas. En general, se obtuvieron altos rendimientos de proceso al utilizar altos caudales de aire de atomización. El aumento del caudal de atomización causa una disminución del tamaño de gotas (Cotabarren et al., 2018). Este efecto permitió un secado más eficiente y menores pérdidas de material por adhesión en las paredes del equipo. Aunque el incremento de B tuvo un efecto positivo sobre RP, los experimentos 11 y 12 presentaron un rendimiento de proceso relativamente más bajo debido a la interacción triple ABC.

4.3.2.3. Humedad de los polvos (H)

La humedad de los polvos varió entre 3,0 y 4,4 % (Tabla 4.4), valores satisfactorios para polvos de frutas obtenidos mediante secado por atomización (Tontul y Topuz, 2017). Ninguna de las condiciones operativas estudiadas en el diseño experimental afectó de manera estadísticamente significativa esta respuesta (Tabla 4.5).

4.3.2.4. Distribución de tamaño y morfología de partículas

El caudal del aire de atomización (B) fue la única condición operativa que afectó de manera estadísticamente significativa a la mediana (D_{50}) de la distribución de tamaño de partículas expresada en masa (Tabla 4.5). De la misma manera que fuera observado para el ángulo de reposo, se distinguieron claramente dos grupos de polvos. Para el nivel más alto de B, el valor promedio de las medianas estuvo en torno a 7,64 μm , mientras que para el caso del nivel más bajo de B dicho valor se ubicó en torno a 13,92 μm . Las gotas más grandes, y consecuentemente, las partículas más grandes, fueron obtenidas cuando se empleó el nivel más bajo de B. Este resultado concuerda con la tendencia observada para los indicadores de fluidez. De hecho, para el nivel más bajo de B los polvos presentaron los mejores valores para el ángulo de reposo y el índice de Carr, ambos parámetros mejoran cuando las medianas de

las poblaciones de partículas aumentan (Zhou et al., 2001). Los valores de span fueron iguales o menores a 2 (Tabla 4.4), por lo tanto, las distribuciones de tamaño de partículas para todos los experimentos pueden considerarse estrechas (Sarrate et al., 2015).

Respecto a la morfología de las partículas, la Figura 4.7 muestra las micrografías SEM para algunos polvos seleccionados. Para los polvos #3 y #4 (materiales obtenidos al utilizar el nivel más alto de B), se encontró que las partículas fueron más pequeñas al compararlas con las muestras de los polvos #15 y #16 (producidas con el nivel bajo de B), en concordancia con los resultados de D₅₀ obtenidos por difracción laser. Además, los polvos #3 and #4 exhibieron cierto grado de aglomeración de partículas pequeñas que resultó ser mayor al observado para las muestras #15 y #16, las cuales además mostraron una elevada esfericidad.

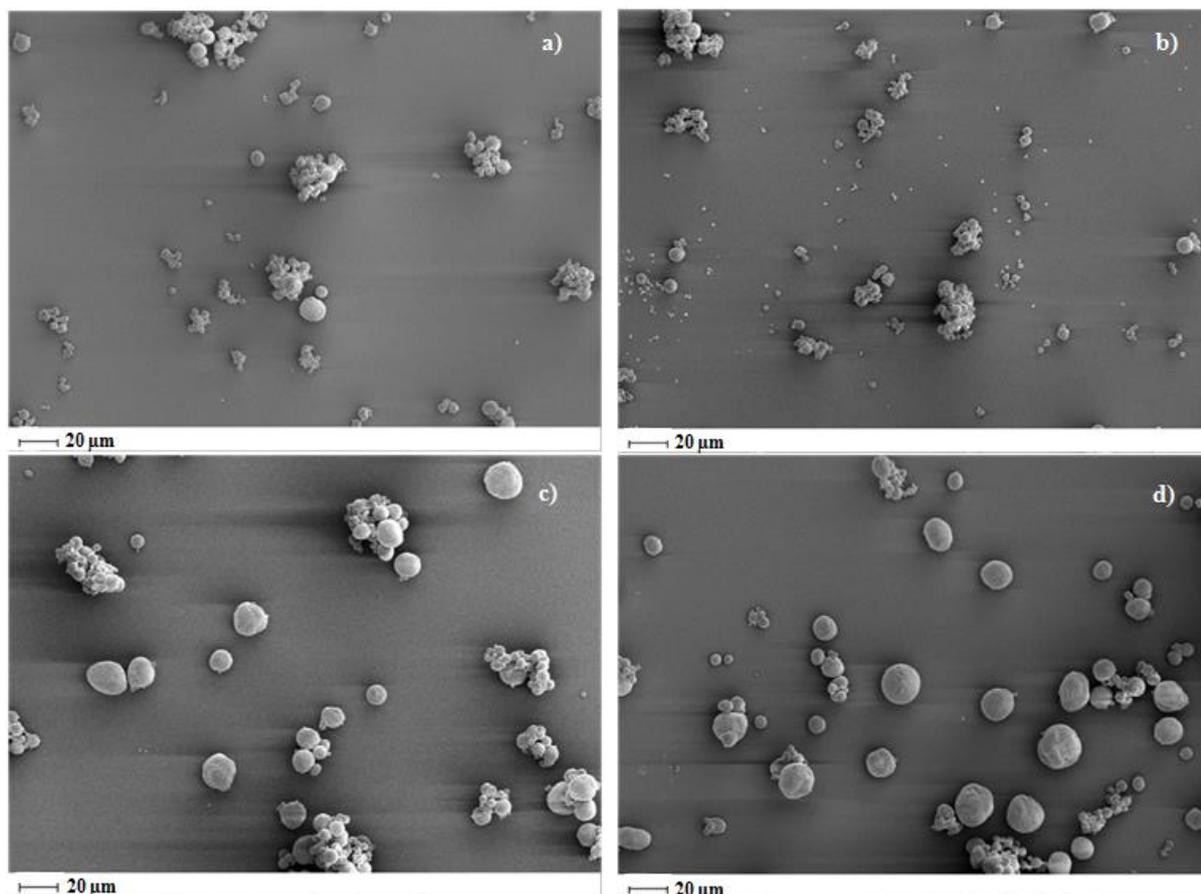


Figura 4.7. Micrografías SEM (x 1000). Polvos obtenidos mediante secado por atomización: a) Muestra #3, b) Muestra #4, c) Muestra #15, y d) Muestra #16.

4.3.2.5. Capacidad antioxidante, antocianinas monoméricas y polifenoles totales

Para analizar el efecto de las condiciones operativas sobre la capacidad antioxidante y los compuestos bioactivos es necesario tener en cuenta que durante el secado coexisten varios fenómenos fisicoquímicos que ocurren a distintas velocidades. Por un lado se produce la transformación de gotas en partículas sólidas, proceso que involucra transferencia de calor y masa de manera simultánea (Singh y Van den Mooter, 2016). Por otro lado, dependiendo de los niveles térmicos empleados en el secado y la naturaleza del extracto, pueden ocurrir diversas reacciones químicas de las cuales pueden participar los compuestos bioactivos (Schmitz-Schug et al., 2016).

Respecto a la capacidad antioxidante, todos los polvos obtenidos presentaron valores de CA entre 1798 ± 10 y 2054 ± 41 mg GAE/100g (ver Tabla 4.4). Como se puede observar en la Tabla 4.5, para la capacidad antioxidante la interacción AB ($F=27,09$), y los efectos principales de B ($F=14,92$) y A ($F=7,58$) fueron significativos. El nivel más alto de A (temperatura de entrada de aire de secado) junto con el nivel más bajo de B (caudal de atomización), produjeron polvos con la capacidad antioxidante más elevada. Por un lado, mientras más bajo fue el caudal de aire de atomización, más grandes fueron las gotas de alimentación líquida atomizada, y así, la relación superficie /volumen de las mismas resultó menor. Puede suponerse, por lo tanto, que la exposición de las gotas al oxígeno y la luz también fue menor. Este efecto puede haber contribuido a una mayor protección de los compuestos bioactivos. Este comportamiento de protección fue también mencionado por Yousefi et al. (2014), Tonon et al. (2008) y Goula et al. (2005), al estudiar la degradación de compuestos bioactivos (polifenoles, antocianinas y licopeno) durante el proceso de secado por atomización. Por otro lado, al utilizar el nivel más alto de temperatura del aire de secado en la entrada, en lugar de obtener un efecto neto negativo sobre CA debido a la tendencia general de favorecer las reacciones de degradación, se observó una mejora en dicha variable. Dado que la velocidad de degradación de los compuestos bioactivos también depende de la actividad acuosa de la muestra, y ésta se reduce más rápidamente a mayor temperatura, la extensión de las reacciones de degradación podrían verse limitadas. De esta manera, la temperatura tendría tanto un efecto negativo como positivo sobre los compuestos bioactivos, y la prevalencia de uno u otro dependería de cada caso específico estudiado. Este punto es señalado por Langrish y Premarajah (2013), y Shofinita y Langrish (2016), al analizar el efecto de la temperatura de entrada del aire en un proceso de secado por atomización, sobre la capacidad antioxidante y la concentración de polifenoles en polvos de *H. sabdariffa* y extractos de cascara de naranja, respectivamente.

En relación a los compuestos bioactivos, se obtuvieron valores entre 1385-1643 mg cy-3-glu/100 g para ACY y desde 4116 hasta 4464 mg GAE/100 g para PT (Tabla 4.4). En general, estos resultados fueron notablemente altos en comparación con otros trabajos. Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk (2011), estudiaron el efecto de la temperatura de entrada del aire de secado (150-205 °C) y de la utilización de diferentes adyuvantes de secado (inulina, maltodextrina DE 11, 18 y 21) sobre la producción de polvos de casis (fruto reconocido por poseer elevados niveles de capacidad antioxidante). Dichos autores reportaron los siguientes rangos de concentración para compuestos bioactivos: 315-454 mg cy-3-glu/100 g y 1116-1251 mg GAE/100 g para ACY y PT, respectivamente. Fredes et al. (2018), produjeron mediante secado por atomización polvo de maqui a partir de jugo comercial diluido, utilizando inulina y alginato de sodio como adyuvantes de secado (relación carrier:SS = 6,6:1 y 3,4:1, respectivamente), reportando un contenido de antocianinas monoméricas de 280 mg cy-3-glu/100 g al emplear inulina, y 590 mg cy-3-glu /100 g en el caso del alginato de sodio. En el presente trabajo, la alimentación líquida formulada a partir de un extracto optimizado condujo a un polvo con una concentración de compuestos bioactivos al menos tres veces más elevada que aquellas reportadas por las contribuciones mencionadas anteriormente. El análisis estadístico mostró que los siguientes efectos resultaron significativos para ACY: B ($F=77,41$) y BCD ($F=7,58$). El nivel más bajo de B produjo la concentración de antocianinas monoméricas más elevada. Este resultado estuvo en concordancia con el análisis sobre capacidad antioxidante realizado previamente. Por otro lado, ninguna de las condiciones operativas tuvo un efecto significativo sobre PT.

4.3.2.6. Color

En cuanto al color, los resultados obtenidos mostraron que los polvos se ubicaron en el cuarto cuadrante del espacio de color CIELAB (a^* , $-b^*$), más específicamente en la zona de tonalidades púrpuras (Figura 4.8). Aunque el ángulo de tono de las muestras no fue afectado por las condiciones operativas, puede observarse claramente que el color superficial los polvos puede ser clasificado en dos grupos, debido a algunas diferencias en cuanto a la luminosidad y la saturación. Dicha diferencia de color puede ser asociada principalmente a los niveles del factor B. En efecto, los colores más oscuros ($<L^*$) con los valores más bajos de saturación ($<C^*_{ab}$) fueron obtenidos para bajos caudales de aire de atomización; esto es, a las condiciones de atomización que generan diámetros de gota más grandes. Nuevamente, el tamaño de las partículas de polvo juega un rol importante, no solamente en la retención de

antocianinas, sino también en los atributos de color. Mientras mayor fue el tamaño de las partículas (producidas a bajos niveles de B), mayor fue la retención de pigmentos, y los polvos exhibieron un color más similar al color púrpura oscuro de los frutos de maqui. Consecuentemente, en el presente estudio un color púrpura más oscuro puede ser un indicador de elevada capacidad antioxidante.

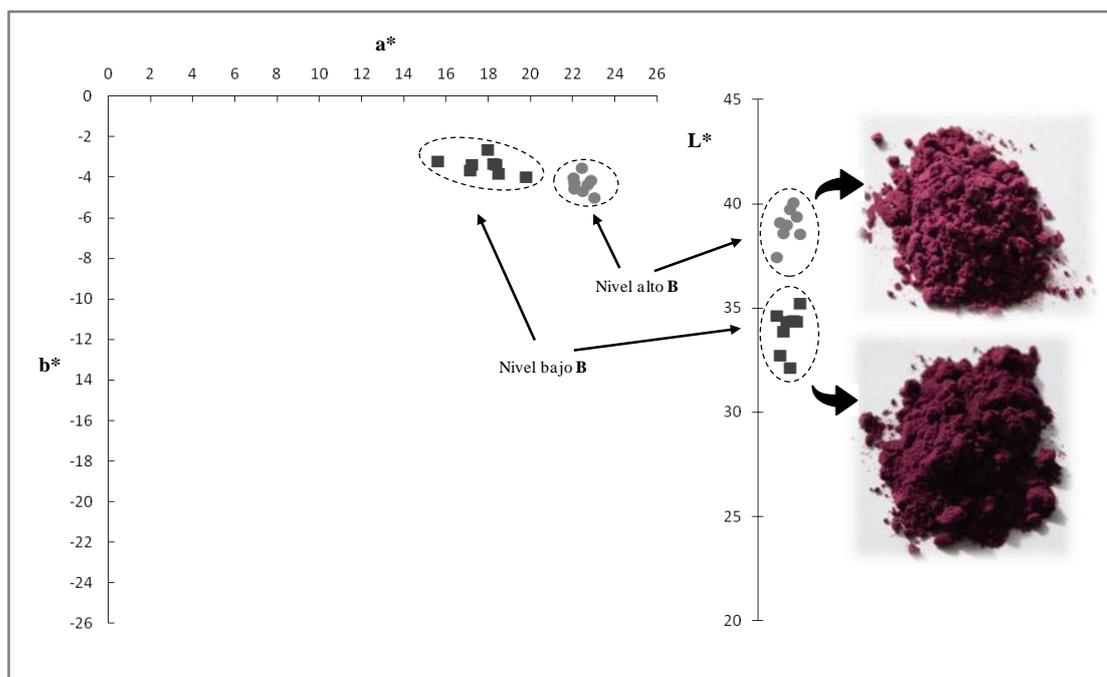


Figura 4.8. Coordenadas L^* , a^* y b^* de los polvos obtenidos por secado por atomización en el espacio de color CIELAB.

Considerando que, para todos los ensayos realizados, tanto los resultados de rendimiento del proceso de secado como de humedad de los polvos fueron satisfactorios, la selección de las mejores condiciones operativas se basó en los siguientes atributos de los polvos: a) buena fluidez (una propiedad sumamente importante para la factibilidad del uso de los polvos), y b) elevada capacidad antioxidante (fuertemente vinculada al contenido de compuestos bioactivos y al color). Las Figuras 4.9 a y 4.9 b muestran la relación entre la capacidad antioxidante y ACY, y entre la capacidad antioxidante y PT, respectivamente. En ambas figuras, los colores verde y azul representan a las muestras obtenidas con los niveles alto y bajo del caudal de aire de atomización, respectivamente. La intensidad del color azul denota el nivel de la temperatura del aire de secado a la entrada del secadero (azul oscuro: nivel alto de A, y azul claro: nivel bajo de A). El tamaño de las burbujas de la Figura 4.9 permite distinguir el ángulo de reposo de los polvos (burbujas pequeñas: bajo AR, burbujas

grandes: alto AR). El polvo con las mejores características debe poseer altos niveles de CA y bajos valores de AR (burbujas pequeñas en la Figura 4.9). Como puede observarse, el polvo #15 emerge como el mejor, dado que exhibió el valor más elevado de CA y el menor valor de AR. Dicho polvo se obtuvo mediante la utilización del nivel bajo de B y el nivel alto de A.

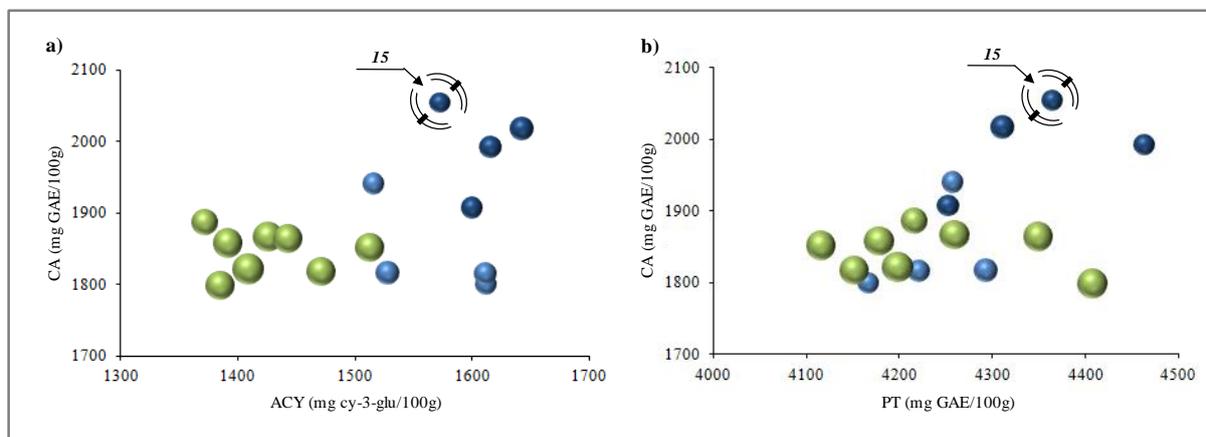


Figura 4.9. Efecto de la temperatura del aire de secado en la entrada y del caudal del aire de atomización sobre las respuestas: a) CA, ACY y AR; b) CA, PT y AR. En verde y azul: niveles alto y bajo del factor B, respectivamente. La intensidad del color azul denota los niveles de A (azul oscuro: alto nivel de A; azul claro: bajo nivel de A). Burbujas pequeñas: AR bajos; burbujas grandes: AR altos.

4.3.2.7. Perfil de antocianinas del polvo óptimo mediante HPLC

Al comparar el perfil de antocianinas del polvo #15 obtenido por HPLC con el obtenido para el extracto óptimo utilizado para la formulación de la alimentación al secadero (Figura 4.10), puede observarse una gran similitud. Por un lado, se verifica en el polvo la presencia de los mismos cinco picos presentes en el extracto de partida. Además, prácticamente no se detectan diferencias en la composición relativa de antocianinas, tanto al comparar la proporción de mono-glucósidos/di-glucósidos, como la proporción de glucósidos de cianidina/delfinidina. Estos resultados sumados a que no se observó un efecto estadísticamente significativo de la temperatura del aire a la entrada del secadero sobre la variable ACY (ver Tabla 4.5), indicarían que los compuestos antociánicos no sufrieron degradación por efectos del calor durante el proceso de secado por atomización.

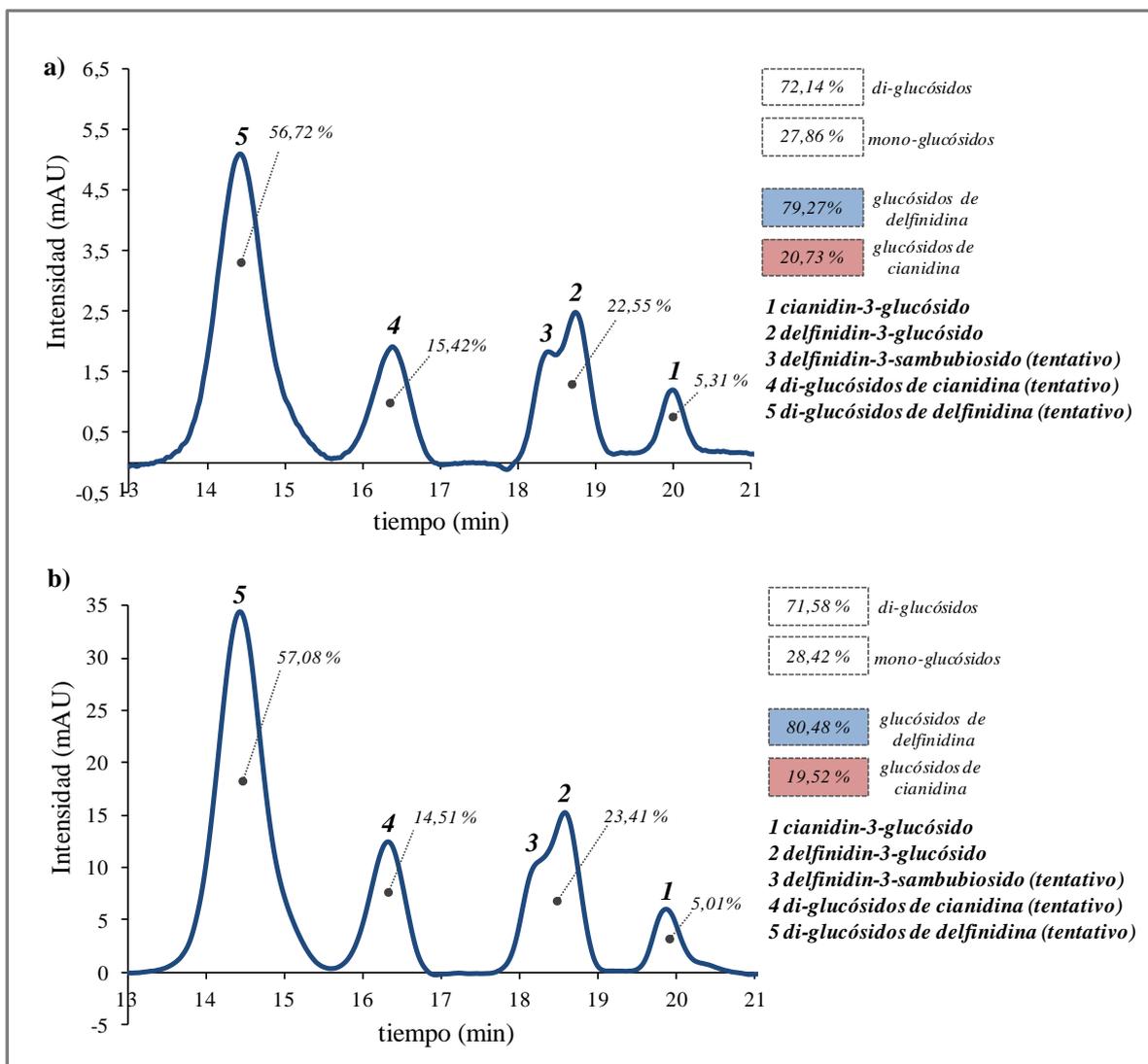


Figura 4.10. Cromatogramas correspondientes a los perfiles de antocianinas obtenidos por HPLC: a) extracto óptimo y b) polvo #15.

4.3.3. Estabilidad física de los polvos: T_g , higroscopicidad y a_w

Se realizaron algunas determinaciones adicionales relacionadas con la estabilidad del producto para cuatro muestras de polvos, divididas en dos grupos. El Grupo I incluyó a la muestra #15 (producto óptimo) y a la muestra #16, ambas muestras pertenecientes al conjunto de polvos de color púrpura oscuro, con mejores propiedades de fluidez y elevada capacidad antioxidante. Por otro lado, el Grupo II comprendió las muestras #3 y #4, representativas del conjunto de polvos de color púrpura más claro, con niveles más bajos de capacidad antioxidante y peores propiedades de flujo comparadas con las muestras del Grupo I.

La [Tabla 4.6](#) muestra los resultados de las propiedades medidas: T_g , a_w e higroscopicidad. También se analizaron los polvos por la técnica de difracción de rayos X. Los espectros presentados en la [Figura 4.11](#) revelan que los cuatro polvos evaluados presentan un estado amorfo. Este estado fue confirmado mediante la presencia de picos amplios e indefinidos en el espectro de difracción de rayos X. Los materiales amorfos con valores de T_g por encima de la temperatura ambiente, pueden ser considerados estables físicamente ([Gallo et al., 2011](#)). En el presente trabajo, todos los polvos seleccionados presentaron valores de T_g mayores a 54 °C, sugiriendo una apropiada estabilidad. Adicionalmente, las muestras presentaron valores de a_w menores a 0,3 (ver [Tabla 4.6](#)), indicando que las reacciones de deterioro y el crecimiento de microorganismos se encontrarían fuertemente limitados ([Daza et al., 2016](#); [Quek et al., 2007](#)). En cuanto a la higroscopicidad, los polvos de maqui mostraron valores entre 15,5-16,5 g/100 g ([Tabla 4.6](#)). Considerando que valores menores a 20 g/100 g indican polvos poco higroscópicos ([Tontul y Topuz, 2017](#)), todos los materiales ensayados tienen una baja tendencia a captar humedad.

En síntesis, todos los polvos presentaron resultados satisfactorios respecto a las propiedades vinculadas a la estabilidad física. Por lo tanto, la consideración de esta dimensión de análisis no alteró la selección del polvo #15 como el óptimo.

Tabla 4.6. Propiedades físicas de polvos de maqui seleccionados: T_g , a_w , e higroscopicidad.

	Muestra #	T_g (°C)	a_w	Higroscopicidad (g/100g)
Grupo I	15	55,6	0,242 ± 0,022	16,5 ± 0,4
	16	54,7	0,240 ± 0,003	16,3 ± 0,9
Grupo II	3	54,8	0,259 ± 0,046	15,6 ± 1,5
	4	54,6	0,264 ± 0,019	15,5 ± 0,9

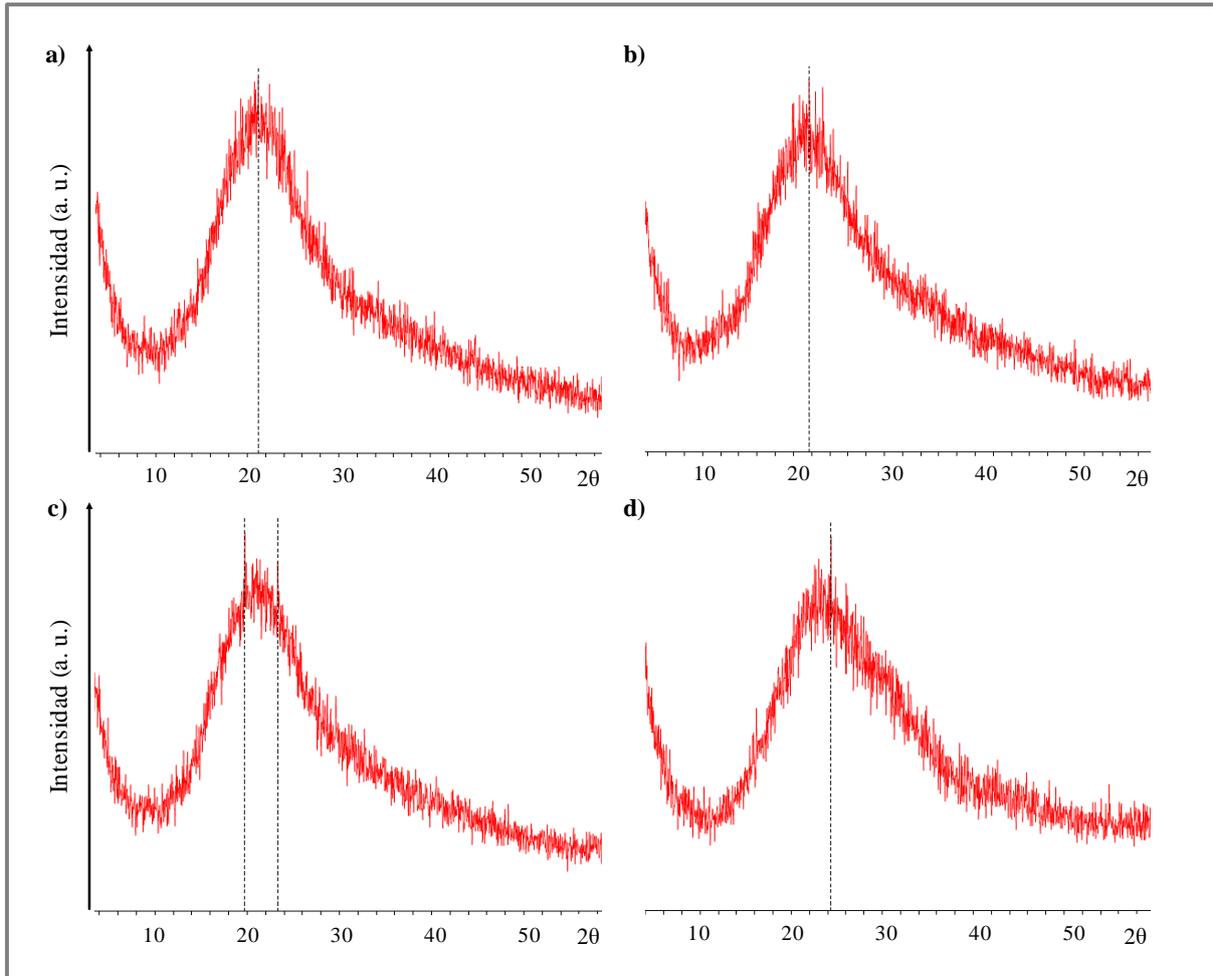


Figura 4.11. Espectros de difracción de rayos X de los polvos obtenidos por secado por atomización: a) muestra #3, b) muestra #4, c) muestra #15 y d) muestra #16.

4.4. Conclusiones

El estudio del impacto de distintos tipos y concentraciones de adyuvante de secado en la alimentación líquida al secadero, permitió concluir que el SiO_2 fue el excipiente que presentó el mejor desempeño. Permite obtener una alimentación de relativa baja viscosidad y buen rendimiento de secado, utilizando una baja relación adyuvante: sólidos solubles. Esta característica contribuyó también a producir polvos con alta intensidad de color y alta concentración de productos bioactivos.

Mediante un diseño experimental factorial fue posible analizar los efectos de las distintas condiciones operativas del proceso sobre un conjunto amplio de respuestas seleccionadas. Se encontró que trabajar con un nivel bajo del caudal de aire de atomización y uno alto de temperatura de entrada del aire de secado, permitió producir los polvos con los

niveles más altos de compuestos bioactivos, y con buenas propiedades físicas en términos de fluidez, higroscopicidad y temperatura de transición vítrea. Fue posible establecer las condiciones operativas del proceso (A = 150 °C, B = 400 l/h, C = 1,5 ml/min y D = 32 m³/h) que permiten tener un polvo óptimo, definido por una elevada capacidad antioxidante (2054 ± 41 mg GAE/100 g) y altas concentraciones de antocianinas monoméricas y polifenoles totales (1573 ± 68 mg cy-3-glu/100 g y 4365 ± 57 mg GAE/100 g, respectivamente). La concentración de compuestos bioactivos fue significativamente más alta que las reportadas en otros trabajos para polvos de frutas reconocidas por ser ricas en antioxidantes.

Dados estos resultados, el polvo de maqui óptimo resulta un atractivo producto no existente en el mercado argentino, que puede emplearse como ingrediente funcional para distintas aplicaciones (alimentos funcionales o nutraceuticos). Más aún, su atractivo color púrpura intenso, permite vincularlo sensorialmente al fruto de maqui y sugiere un gran poder tintóreo con potencial para ser utilizado como colorante natural en alimentos o en aplicaciones cosméticas (cosmecético).

Capítulo 5

Estudio de estabilidad durante el almacenamiento

5.1. Introducción

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

La interacción con el agua del medio ambiente puede incrementar la actividad acuosa (a_w) del polvo, y así, generar condiciones más desfavorables para su estabilidad. El concepto de actividad acuosa fue introducido para diferenciar la intensidad con la que el agua se asocia a los componentes no acuosos de los productos alimenticios, distinguiendo entre agua fuertemente asociada y agua “libre” (Fennema, 2001). El agua que interacciona fuertemente con la matriz alimenticia no se encuentra disponible para participar en fenómenos de deterioro del producto, tales como crecimiento de microorganismos, reacciones de pardeamiento y químicas de hidrólisis, entre otros. En cambio, el agua débilmente asociada sí participa en dichos procesos. La definición rigurosa del concepto de actividad proviene de la termodinámica y refiere a un cociente de fugacidades. Para el caso del agua y considerando bajas presiones para la fase gas, las fugacidades pueden reemplazarse por presiones de vapor. Por lo tanto, la actividad acuosa queda definida por la [Ecuación 5.1](#).

$$a_w = \frac{p}{p_0} \quad (5.1)$$

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

Suponiendo que se alcanza el equilibrio respecto a la interacción del agua entre el sistema y el entorno, es posible relacionar la actividad acuosa del sistema con la humedad relativa porcentual del entorno (humedad relativa de equilibrio), tal como lo expresa la Ecuación 5.2.

$$HR\% = a_w 100 \quad (5.2)$$

La isoterma de sorción de agua permite analizar la relación entre la humedad relativa del entorno y la humedad adsorbida/desorbida por el sistema, por lo tanto, es una herramienta útil para predecir la estabilidad física y química del material evaluado. El tipo de isoterma está determinado por diversos factores, como por ejemplo la composición y la estructura física de la muestra, los pretratamientos aplicados a la misma y la temperatura a la cual se realiza el ensayo. En la Figura 5.1 se representa una isoterma genérica (cuya forma es una de las más frecuentes), distinguiendo las zonas relevantes.

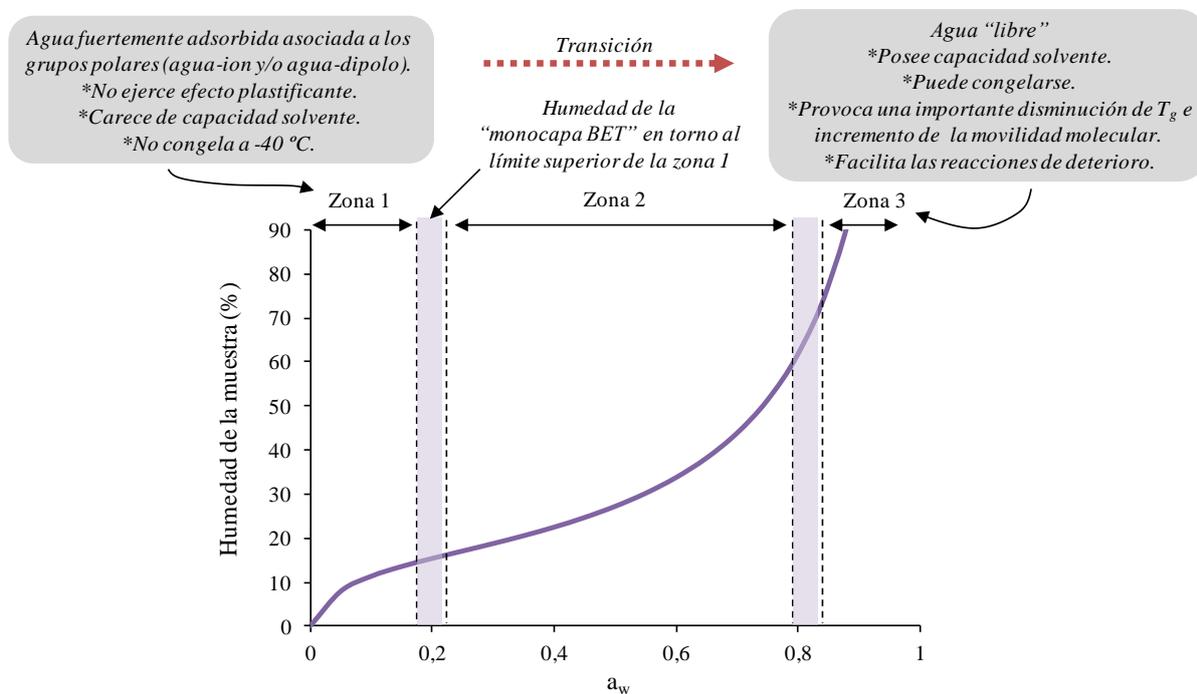


Figura 5.1. Isoterma de adsorción genérica.

Existen distintos modelos matemáticos para describir las isotermas de sorción, entre los cuales se encuentran: el modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET), aplicable en el

intervalo de baja humedad relativa (Ecuación. 5.3) y el modelo de Guggenheim, Anderson y de Boer (GAB). Este último modelo es uno de los más usados porque se puede aplicar en todo el rango de humedad relativa (Ecuación. 5.4).

$$H_e = \frac{H_{oBET} C_{BET} a_w}{(1-a_w)(1-a_w+C_{BET} a_w)} \quad (5.3)$$

$$H_e = \frac{H_{oGAB} C_{GAB} K_{GAB} a_w}{(1-K_{GAB} a_w)(1-K_{GAB} a_w+C_{GAB} K_{GAB} a_w)} \quad (5.4)$$

donde H_e es la humedad de la muestra en el equilibrio, H_o es la humedad de la monocapa (BET o GAB), C (BET o GAB) y K_{GAB} son parámetros de ajuste.

Los materiales amorfos pueden experimentar una transición de fase desde un estado vítreo hacia un estado líquido sobreenfriado (“gomoso”). Se trata de estados que no están en equilibrio termodinámico sino que pueden alcanzar estados de equilibrio metaestables. El cambio de estado vítreo a líquido sobreenfriado se conoce como transición vítrea. La temperatura de transición vítrea (T_g), asociada a dicho cambio de estado, es característica de cada material. Desde el punto de vista físico, el incremento de a_w en un producto en polvo generará una disminución de su T_g . Por lo tanto, resulta relevante el estudio de la interrelación de T_g con el contenido de agua dado que dicha propiedad está relacionada con posibles transformaciones estructurales del producto a lo largo del almacenamiento como colapso estructural, aumento de la pegajosidad, cristalización, etc. (Roos, 2010). Por otro lado, a mayor actividad de agua resulta más factible que se produzcan reacciones químicas de deterioro dado que se incrementa la movilidad de los reactivos, fenómeno que puede afectar la velocidad de reacción (Fennema, 2001).

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

(Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011; Fang y Bhandari, 2011; González et al., 2019). Dentro de los trabajos de estabilidad durante el almacenamiento, existen los denominados estudios de vida útil acelerada. En ellos, estableciendo condiciones de almacenamiento abusivas como por ejemplo elevados niveles térmicos y/o actividades acuosas, se busca acelerar los procesos de degradación del producto. A partir de estos ensayos se puede obtener información que puede ser extrapolada a condiciones de almacenamiento no abusivas (Fennema, 2001). De esta manera se acortan considerablemente los tiempos del estudio de almacenamiento, obteniendo la máxima información respecto a la estabilidad del producto en el menor tiempo posible (Mizrahi, 2011). Este tipo de estudios ha sido utilizado para, entre otro tipo de productos, polvos obtenidos por liofilización (Rocha-Parra et al., 2016; Sanchez et al., 2015) y secado por atomización (Ferrari et al., 2013; Tonon et al., 2010).

En el Capítulo 3, se estudió el proceso de extracción acuosa del fruto de maqui, obteniéndose un producto rico en compuestos bioactivos, y luego en el Capítulo 4 se abordó la optimización del secado por atomización del extracto acuoso de maqui utilizando SiO₂ como adyuvante de secado. Como resultado de estas investigaciones, se obtuvo un polvo con elevada concentración de compuestos bioactivos, un atractivo color púrpura, buena fluidez, y una distribución de tamaño de partícula angosta, apto para su uso como ingrediente funcional, nutracéutico, colorante, entre otras aplicaciones.

En este contexto, los objetivos del presente Capítulo fueron: 1) analizar la estabilidad del polvo de maqui obtenido en el proceso de secado por atomización optimizado y 2) proporcionar pautas de almacenamiento de dicho polvo. Para ello se analizó en primer lugar el comportamiento de sorción de agua y de la transición vítrea del polvo. En segundo lugar, se realizó un estudio de almacenamiento acelerado centrado en el análisis de la evolución del color y de los compuestos bioactivos, como parámetros de deterioro más relevantes.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materiales

Se utilizó polvo de maqui obtenido mediante secado por atomización en las condiciones óptimas establecidas en el estudio de optimización del Capítulo 4.

5.2.2. Isoterma de sorción

Las muestras de polvo de maqui (0,2 g) se almacenaron en desecadores a 20 °C a diversas humedades relativas (HR) hasta alcanzar peso constante (28 días). Se emplearon soluciones saturadas de las siguientes sales: cloruro de litio, acetato de potasio, cloruro de magnesio, carbonato de potasio, nitrato de magnesio, cloruro de sodio y cloruro de potasio logrando humedades relativas de 11, 22, 33, 44, 52, 75 y 84%, respectivamente. Luego, la determinación del contenido de agua de equilibrio de las muestras de polvo se realizó mediante desecación de las mismas hasta peso constante en una estufa de vacío VacuCell 111-Standard (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Munchen, Alemania) a una temperatura de 60 °C. La humedad se expresó como g agua / 100 g de polvo seco. Posteriormente, se realizaron ajustes matemáticos para determinar los parámetros de los modelos BET (en la zona de baja humedad relativa, $HR \leq 52\%$) y GAB (en todo el intervalo de HR estudiado).

5.2.3. Temperatura de transición vítrea

La determinación de T_g se realizó sobre muestras de polvo equilibradas en el rango de HR estudiado (11-84%). Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Mettler Toledo modelo 822 (Mettler Toledo AG, Suiza). Se pesaron entre 5 y 10 mg de cada muestra en cápsulas de aluminio selladas herméticamente, y se realizaron los barridos en el rango de temperatura entre -10 y 100°C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C / min. Luego, la T_g fue calculada como la temperatura en la que se produce la mitad del cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p). Para ello, se analizaron las curvas con el programa STARe Thermal Analysis System versión 3.1 (Mettler Toledo AG).

5.2.4. Estabilidad del color superficial y de compuestos bioactivos durante el almacenamiento

5.2.4.1. Análisis preliminar de la estabilidad del color superficial

Se realizó en primer lugar un estudio de almacenamiento del producto en distintas condiciones de actividad de agua y de temperatura, seleccionando como variable dependiente el color superficial del polvo, por ser ésta una propiedad física crítica desde el punto de vista sensorial. Se planteó un diseño utilizando dos niveles de temperatura ($T_1 = 20\text{ °C}$ y $T_2 = 40\text{ °C}$) y tres niveles de a_w (0,22, 0,52 y 0,75). Para ello, las muestras de polvo (0,2 g) fueron esparcidas en placas de Petri pequeñas garantizando una buena exposición superficial, y

posteriormente fueron expuestas a tres humedades relativas (22, 52 y 75 %) en recipientes cerrados conteniendo las soluciones salinas saturadas necesarias para garantizar los respectivos niveles de a_w . Los recipientes fueron almacenados a las dos temperaturas propuestas al resguardo de la luz durante un tiempo total de 70 días.

El color superficial fue determinado al inicio y a los 70 días mediante la medición de parámetros triestímulo (espacio de color CIELAB) de acuerdo a la metodología detallada en la [sección 4.2.12](#) del Capítulo 4.

5.2.4.2. Estudio de vida útil acelerado

Niveles térmicos en torno a 35-40 °C son los recomendados como temperaturas abusivas para los estudios de almacenamiento acelerado de productos que son almacenados y comercializados a temperatura ambiente (Labuza y Schmidl, 1985; Sanchez et al., 2015). El incremento de la temperatura permite realizar estudios de vida útil acortando los tiempos de almacenamiento a 4-6 meses (Tonon et al., 2010; Fredes et al., 2018). Por tal motivo, el estudio de vida útil acelerado se llevó adelante a dos temperaturas de almacenamiento: $T_1 = 20$ °C (seleccionada como la condición de temperatura ambiente estándar en condiciones de almacenamiento real del producto) y $T_2 = 40$ °C (elegida como temperatura abusiva). Los polvos fueron almacenados en viales de vidrio cerrados herméticamente (a_w de los polvos $\approx 0,20$) y al resguardo de la luz durante un tiempo total de 147 días, extrayendo periódicamente (cada 21 días) muestras para análisis de compuestos bioactivos (ACY y PT) y % de color polimérico (% CP). El color superficial se determinó cada 7 días al inicio y luego cada 14 y 21 días. Por otro lado se analizó el perfil de antocianinas del polvo mediante cromatografía líquida (HPLC) al inicio y al final del estudio de almacenamiento (a ambas temperaturas).

5.2.4.3 Determinaciones analíticas de compuestos bioactivos y color

Antocianinas monoméricas totales (ACY) y polifenoles totales (PT)

Las determinaciones de ACY y PT se realizaron por espectrofotometría según la metodología descrita en [sección 4.2.12](#) del Capítulo 4.

Perfil de antocianinas mediante cromatografía líquida (HPLC)

Se tomó una masa de 200 mg del polvo óptimo y se diluyó en metanol utilizando un matraz de 10 ml. Luego, sobre una alícuota de dicha muestra se aplicó la metodología detallada en la [sección 2.2.5](#), pero utilizando únicamente la señal del detector DAD a 520 nm y los estándares de antocianinas, para determinar su perfil mediante HPLC.

Color polimérico

El color polimérico (CP) se determinó utilizando el método del bisulfito ([Giusti y Wrolstad, 2001](#)). La muestra de partida fue una alícuota de polvo resuspendido en agua destilada (a una dilución que garantizó lecturas de absorbancia < 1 a 515 nm). Las muestras “blanqueadas” con bisulfito se obtuvieron mediante la adición de 0,2 ml de una solución al 20% de metabisulfito de potasio a 2,8 ml de solución de muestra de partida. Las muestras control se obtuvieron mediante la adición de 0,2 ml de agua a la muestra de partida, en lugar de los 0,2 ml de solución de metabisulfito de potasio. Las lecturas de absorbancia de las muestras se realizaron a 420 nm y 515 nm (λ_{\max} de las antocianinas). También se realizaron lecturas de absorbancia a 700 nm para corregir interferencias por turbidez.

Utilizando las absorbancias (A) medidas sobre la muestra control se calculó la densidad de color (DC) ([Ecuación 5.5](#)). DC representa la suma de todo lo que proporciona color en la muestra, es decir las antocianinas totales (monoméricas y poliméricas) y los compuestos pardos.

$$DC = [(A_{420}-A_{700})+(A_{\lambda_{\max}}-A_{700})] \cdot \text{Factor Dilución} \quad (5.5)$$

Luego, utilizando las lecturas de absorbancia de la muestra blanqueada se evaluó CP ([Ecuación 5.6](#)). CP es un indicador de la presencia de pigmentos polimerizados; incluye a los complejos taninos-antocianinas y los compuestos pardos.

$$CP = [(A_{420}-A_{700})+(A_{\lambda_{\max}}-A_{700})] \cdot \text{Factor Dilución} \quad (5.6)$$

Luego, el porcentaje de color polimérico (% CP) se obtiene como:

$$\% \text{ CP} = \left(\frac{CP}{DC} \right) \cdot 100 \quad (5.7)$$

El fundamento de la técnica reside en que sólo las antocianinas monoméricas se vuelven incoloras por la adición del bisulfito en la posición del carbono 4 (C4), mientras que las antocianinas poliméricas no sufren esta reacción debido a que la posición del C4 no está disponible por encontrarse covalentemente unida a otro compuesto fenólico (Wrolstad et al.,2005).

Color superficial

El color superficial se evaluó a través de los parámetros triestímulo (espacio de color CIELAB) de acuerdo a la metodología detallada en la [sección 4.2.12](#) del Capítulo 4.

5.2.4.4. Evaluación de la cinética de degradación de ACY

A partir de los datos de ACY en función del tiempo, se ajustaron los parámetros cinéticos suponiendo una cinética de degradación de primer orden ([Ecuación 5.8](#)).

$$\ln ACY_t = \ln ACY_0 - k t \quad (5.8)$$

donde, ACY_t y ACY_0 representa la concentración de antocianinas monoméricas totales en el tiempo t y al inicio del experimento, respectivamente. Por su parte, k representa la constante de la velocidad de reacción.

La velocidad expresada según la [Ecuación 5.8](#) también puede expresarse en términos del tiempo de vida media ($t_{1/2}$). El tiempo de vida media es el tiempo para el cual la concentración de ACY es el 50% de la concentración inicial ([Ecuación 5.9](#)).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (5.9)$$

5.2.5. Análisis estadístico de los resultados

El modelado matemático de isotermas de sorción y de cinéticas de degradación fue realizado utilizando el software estadístico STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Para evaluar la bondad del ajuste se utilizaron los siguientes parámetros estadísticos: R^2 (coeficiente de determinación) y χ^2 (chi cuadrado) con un grado de significancia $\alpha = 0,05$.

Para evaluar el impacto de los factores analizados sobre las variables dependientes se realizó un ANOVA. Se realizó un test de comparaciones múltiples (test de Tukey) para detectar diferencias significativas entre medias ($p < 0.05$).

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Isoterma de sorción y T_g

La Figura 5.2 muestra los datos experimentales correspondientes a la isoterma de sorción ($T = 20\text{ }^\circ\text{C}$) junto con la evolución de la T_g de los polvos equilibrados a las distintas humedades relativas. Respecto a la isoterma, se realizaron ajustes mediante los modelos de BET (en la zona de baja humedad relativa, $HR \leq 52\%$) y GAB (en todo el intervalo estudiado), con el objetivo de obtener la humedad de monocapa del polvo, considerado un valor de referencia en alimentos deshidratados en cuanto a la estabilidad fisicoquímica. La Figura 5.3 compara los datos experimentales de la isoterma de sorción a $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ con los valores predichos mediante los modelos BET y GAB ajustados. La isoterma presentó la forma característica de las matrices con sólidos solubles como las provenientes de frutas, correspondiendo a un comportamiento intermedio entre los tipos II y III de acuerdo a la clasificación de Brunauer, Emmett y Teller (Brunauer et al., 1940). De acuerdo a los parámetros utilizados para evaluar la bondad del ajuste (Tabla 5.1), se puede observar que ambos modelos fueron adecuados para describir el comportamiento de sorción de agua exhibido por el polvo de maqui.

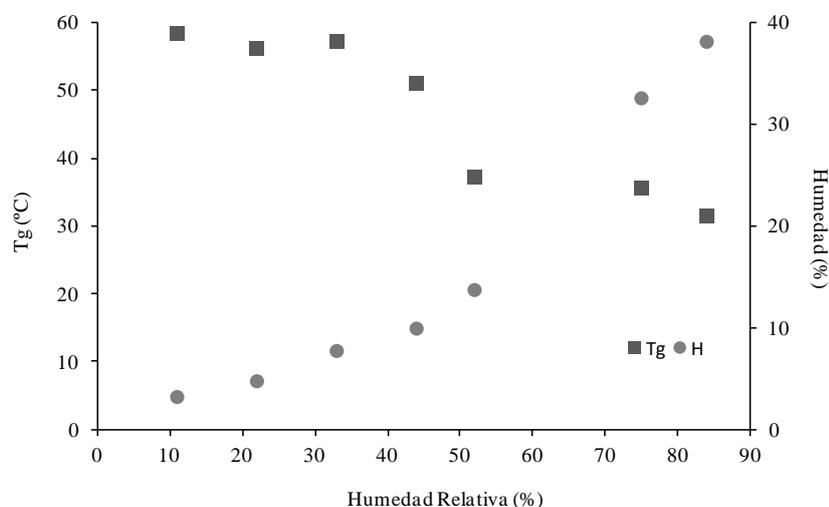


Figura 5.2. Isoterma de sorción a $20\text{ }^\circ\text{C}$ y variación de T_g en función de la humedad relativa.

Tabla 5.1. Ajuste de la isoterma de sorción ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) mediante los modelos BET y GAB

Modelo	Parámetros	Bondad del ajuste
BET (Ajuste para $HR \leq 52\%$)	$H_{o\text{ BET}} = 8,16\%$ $C_{\text{BET}} = 3,28$	R^2 (ajustado) = 0,97 $\chi^2 = 0,38 \ll \chi^2_{\text{critico}} = 22,35$ ($\alpha = 0,05$)
GAB (Ajuste para todo el rango de HR)	$H_{o\text{ GAB}} = 8,44\%$ $C_{\text{GAB}} = 4,04$ $K_{\text{GAB}} = 0,96$	R^2 (ajustado) = 0,96 $\chi^2 = 7,41 \ll \chi^2_{\text{critico}} = 30,14$ ($\alpha = 0,05$)

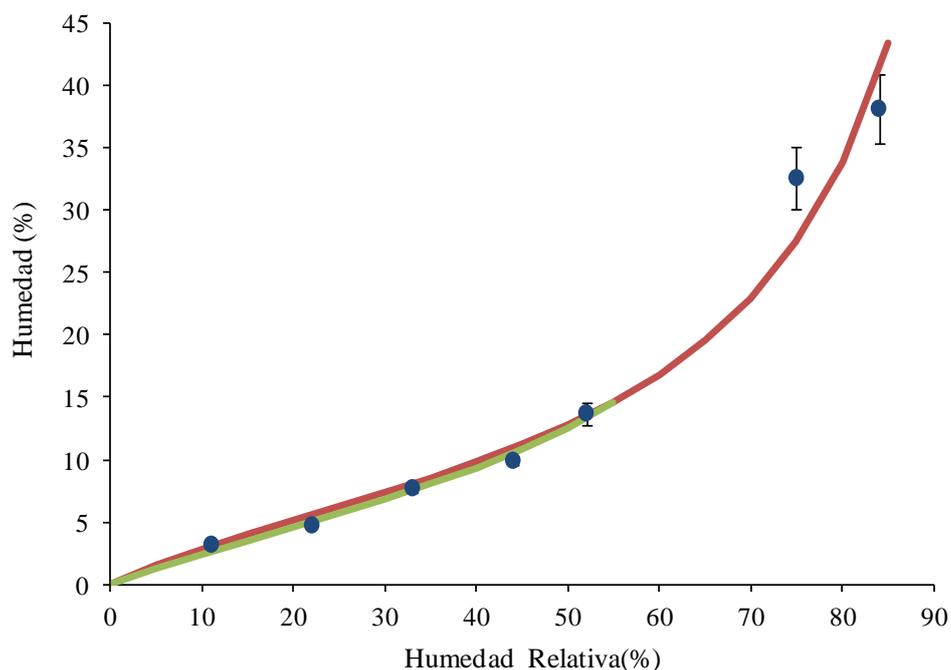


Figura 5.3. Ajustes de la isoterma de sorción ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$): resultados experimentales (puntos azules), ajuste mediante el modelo BET para $HR \leq 52\%$ (línea verde), y ajuste mediante el modelo GAB (línea roja).

La isoterma del polvo de maqui fue similar en cuanto a la forma a las reportadas en bibliografía para otros polvos frutales obtenidos por secado por atomización, como por ejemplo: a) polvo de zarzamora con una relación maltodextrina DE12:SS de 12:1 (Franceschinis et al., 2014), b) polvos de cassis y sauco con relaciones maltodextrina DE12:SS 8:1 y 11:1, respectivamente (Gagneten et al. 2019) y c) polvo de açai con relaciones adyuvante de secado:SS 2:1 utilizando maltodextrina DE10 y DE20, goma arábica y almidón de tapioca (Tonon et al., 2009). A pesar de las diferencias de las formulaciones en cuanto a la proporción adyuvante de secado:SS, el comportamiento de sorción fue similar a bajas

humedades relativas (11-33%). Sin embargo a mayores HR el polvo de maqui presentó mayor adsorción de agua en comparación al resto de los polvos, llegando a duplicar la cantidad de agua adsorbida a humedades relativas cercanas al valor crítico (52 %) reportado por los autores mencionados. En concordancia con las diferencias observadas en el comportamiento de sorción, el valor de humedad de monocapa obtenido en polvos de maqui osciló entre 8,16 y 8,44 %, mientras que por ejemplo los valores reportados para polvo de açai oscilaron entre 3,1-3,2 % con almidón de tapioca, 4,5-6,3 % con maltodextrina DE10 y DE20, y 5,3-5,4 % con goma arábica (Tonon et al., 2009). Estos resultados se deben a diferencias en cuanto a la conformación y topología de las partículas y a los sitios hidrofílicos/hidrofóbicos en la interfase para cada tipo de adyuvante.

En cuanto a la evolución de T_g con HR (Figura 5.2), se pudo observar que la temperatura de transición vítrea fue superior a la temperatura ambiente estándar (20-25 °C) en todo el rango estudiado, variando desde 58,5 hasta 31,4 °C al variar la humedad relativa de equilibrio desde 11% hasta 84%, respectivamente. Este comportamiento de T_g fue marcadamente diferente a lo reportado para otros polvos frutales, tal como se describe a continuación. Por ejemplo, Fang y Bhandari (2011) estudiaron la estabilidad durante el almacenamiento de polvo de bayberry obtenido por secado por atomización, utilizando maltodextrina DE10 en una proporción adyuvante:SS 1:1. Trabajaron en el rango de a_w 0,11 - 0,44 y a tres temperaturas (5, 25 y 40 °C), llegando a valores de T_g entre 20 - 28 °C para $a_w = 0,44$. En el trabajo de Tonon et al. (2009) anteriormente mencionado el límite crítico de $T_g = 25$ °C lo obtuvieron para a_w en el rango 0,535 - 0,574, alcanzando valores muy bajos de T_g (entre -54 °C y -62 °C) para los polvos equilibrados a HR = 84 %. Por otro lado, Franceschinis et al. (2014) obtuvieron valores de T_g en torno a los 20 °C para HR entre 43 % y 52 %. Por lo tanto, el límite de T_g crítica (20 – 25 °C) en dichos estudios fue alcanzado en torno a actividades acuosas de 0,53, descendiendo esta variable de manera significativa superado dicho nivel de a_w . Este descenso dependió del tipo y concentración de adyuvante de secado empleado. En comparación con estos polvos frutales reportados en bibliografía, el polvo de maqui del presente trabajo presenta una estabilidad física marcadamente superior, a pesar de la baja proporción de carrier utilizada en su elaboración (relación carrier = sólidos solubles 0,5:1). En efecto, los polvos de maqui pueden mantener el estado vítreo sin envase a temperaturas mayores que 30 °C, en todo el rango de humedades relativas. Este comportamiento no sólo se relaciona con diferencias en la interacción agua-carrier sino en la estabilidad térmica de los distintos adyuvantes puros usados en los estudios reportados. En este sentido, la Tabla 5.2 muestra la T_g para distintos tipos de adyuvantes. Tal como se puede

observar, se verifica que la transición vítrea del SiO₂ se da a temperaturas que superan en un orden de magnitud a la de los adyuvantes usados por otros autores.

Tabla 5.2. Temperatura de transición vítrea para distintos adyuvantes de secado.

Adyuvante de secado	T _g (°C)	Referencia
Maltodextrina DE10	160	Tontul y Topuz (2017)
Maltodextrina DE20	141	Tontul y Topuz (2017)
Maltodextrina DE5 - DE36	200 - 100	Roos (1995)
Goma arábica	126	Shishir y Chen (2017)
Trehalosa	100	Roos (1995)
Almidón	243	Tontul y Topuz (2017)
SiO ₂	1209	Ojovan (2004)
Aerosil 200®	1200	Degussa AG (2001)

Por otro lado, se encuentra extensamente reportado que un mayor contenido de agua ejerce un mayor efecto plastificante sobre matrices sólidas y causa una menor temperatura de transición vítrea del material (Roos, 2010). En sólidos amorfos constituidos por carbohidratos de bajo peso molecular, oligosacáridos, polisacáridos y proteínas, la interacción con el agua genera un incremento de la movilidad molecular, una disminución de su viscosidad y de la T_g (Roos, 1995; Fennema, 2001). Este comportamiento puede presentarse en polvos frutales conteniendo carriers como maltodextrina, trehalosa, goma arábica, o almidón de distinto origen, cuando son expuestos a elevadas humedades relativas, tal como fuera observado en polvos de otras berries conteniendo estos polímeros de alto peso molecular. En cambio, el dióxido de silicio coloidal utilizado en el presente trabajo (Aerosil 200®) es un material inorgánico, amorfo e hidrofílico que, a diferencia de los agentes encapsulantes de los trabajos mencionados, es capaz de adsorber grandes cantidades de agua debido a su elevada área superficial específica (200 m²/g) interactuando mediante puentes de hidrógeno con los grupos silanol superficiales, manteniendo una alta estabilidad física (Evonik, 2019). Esto permitió minimizar el efecto plastificante del agua al ser expuesto el polvo a elevadas humedades relativas.

5.3.2. Estabilidad del color superficial y compuestos bioactivos durante el almacenamiento

5.3.2.1. Análisis preliminar del color superficial mediante un diseño factorial

La Figura 5.5 presenta los parámetros cromáticos (espacio de color CIELAB) obtenidos luego de 70 días de almacenamiento en las distintas condiciones ensayadas. Por otro lado, la Figura 5.6 muestra un registro fotográfico realizado al inicio del proceso de almacenamiento y a los 35 y 70 días (a las distintas T y a_w). En función de los parámetros cromáticos se calcularon las variables h_{ab} y C^*_{ab} (Ecuaciones 4.6 y 4.7, respectivamente). Manteniendo el nivel más bajo de temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e incrementando a_w se observó que el ángulo de tono (h_{ab}) se desplazó hacia valores correspondientes a tonalidades más rojizas (desde $-13,4 \pm 0,5\text{ }^{\circ}$ hasta $-3,2 \pm 0,7^{\circ}$) y que disminuyó la saturación del color (C^*_{ab}) desde $18,6 \pm 0,2$ hasta $14,8 \pm 0,3$. Por su parte, la variación de luminosidad (L^*) fue menos relevante, manteniéndose en niveles cercanos a los del polvo inicial. Por otro lado, al incrementar la temperatura a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, las variaciones fueron notablemente mayores que para el nivel de temperatura más bajo. En particular, al aumentar a_w se observó el cambio del ángulo de tono desde $-17,1 \pm 0,9\text{ }^{\circ}$ hasta $51,1 \pm 0,3\text{ }^{\circ}$ (desde tonos púrpuras hacia tonos pardos). Además, se verificó un incremento en la luminosidad y una disminución de la saturación.

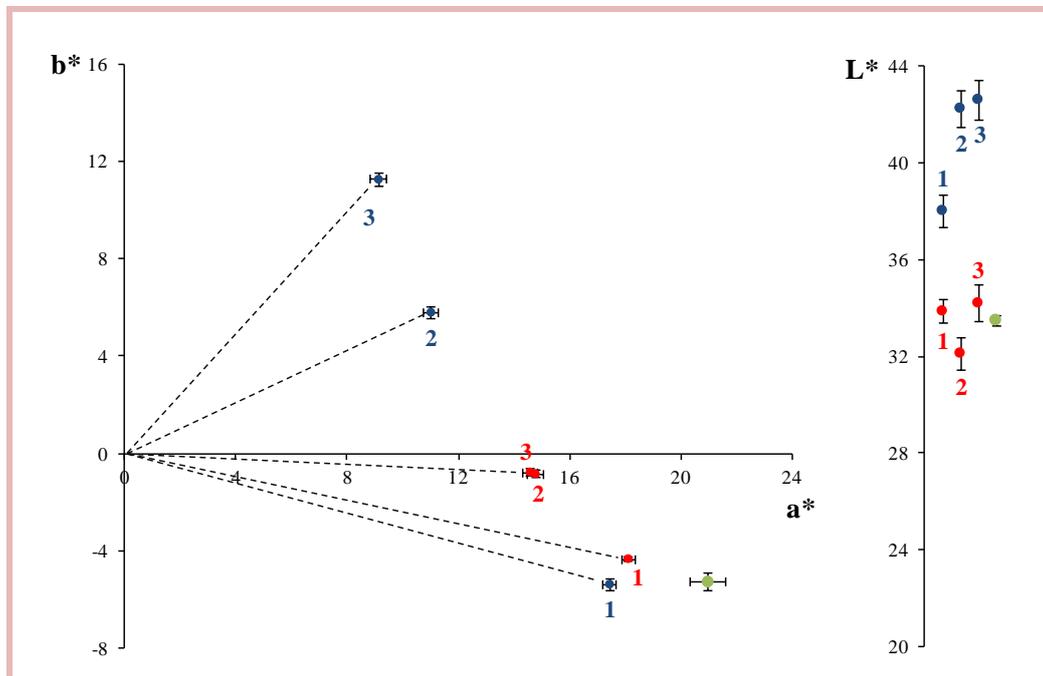


Figura 5.5. Parámetros cromáticos correspondientes a polvo de maqui almacenado en distintas condiciones de temperatura y a_w . El factor temperatura está representado por los colores rojo ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y azul ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los números 1, 2 y 3 representan los niveles crecientes de a_w . El punto verde corresponde a los parámetros cromáticos del polvo inicial.

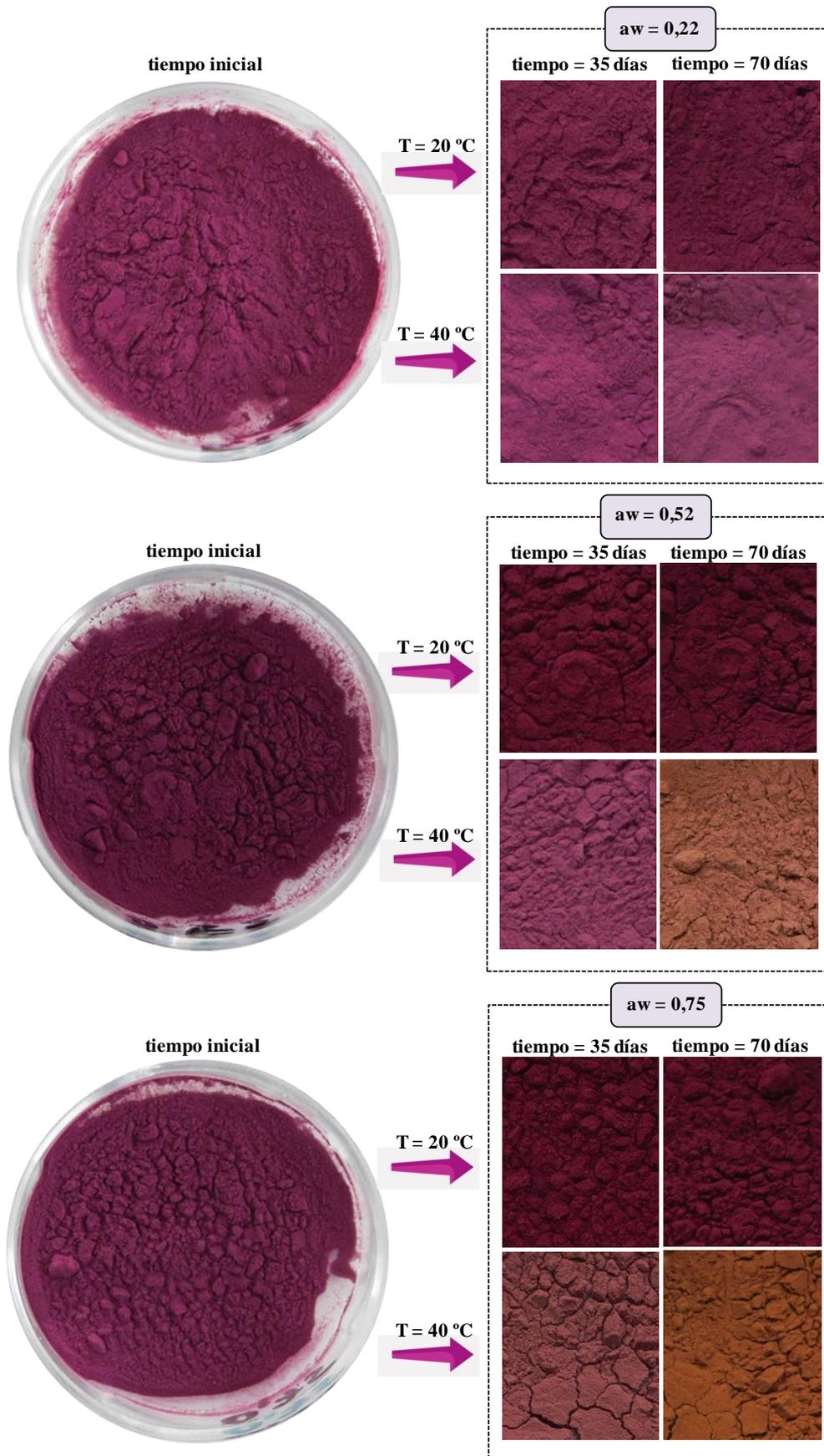


Figura 5.6. Fotografías correspondientes a los polvos almacenados a distintas condiciones de T y a_w .

El cambio global de color (ΔE^*_{ab} , ver Ecuación 4.8) que sufrió el polvo a lo largo del tiempo se presenta en la Figura 5.7. Se puede observar que a 20 °C y $a_w = 0,22$ (nivel próximo a la actividad acuosa de los polvos a la salida del secadero, ver Tabla 4.6), se obtuvo un $\Delta E^*_{ab} = 3,61 \pm 0,07$ siendo ésta la menor variación del color a los 70 días, y se incrementó hasta $\Delta E^*_{ab} = 22,89 \pm 0,40$ para 40 °C y $a_w = 0,75$. En el primer caso el valor de ΔE^*_{ab} indicó una buena estabilidad del color dado que en el rango $1,5 < \Delta E^*_{ab} < 5$ el cambio de color es poco perceptible (o perceptible sólo para un observador entrenado) (Lao y Giusti, 2017).

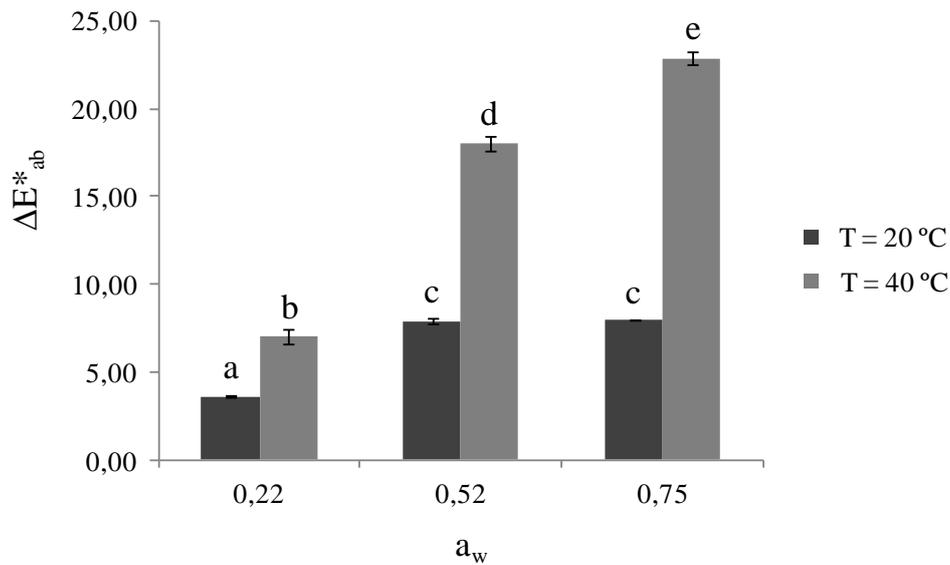


Figura 5.7. Cambio global de color (ΔE^*_{ab}) luego de 70 días de almacenamiento a distintas condiciones de T y a_w . Las barras con letras minúsculas distintas difieren significativamente en sus medias ($p < 0,05$).

El análisis estadístico permitió determinar que tanto T como a_w ejercieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la luminosidad, el ángulo de tono, la saturación y el cambio global de color o ΔE^*_{ab} . Además, se verificó un efecto de interacción entre ambos factores. La Figura 5.8 muestra que la temperatura fue el factor de mayor incidencia sobre los parámetros cromáticos a excepción del croma que fue mayormente afectado por la a_w .

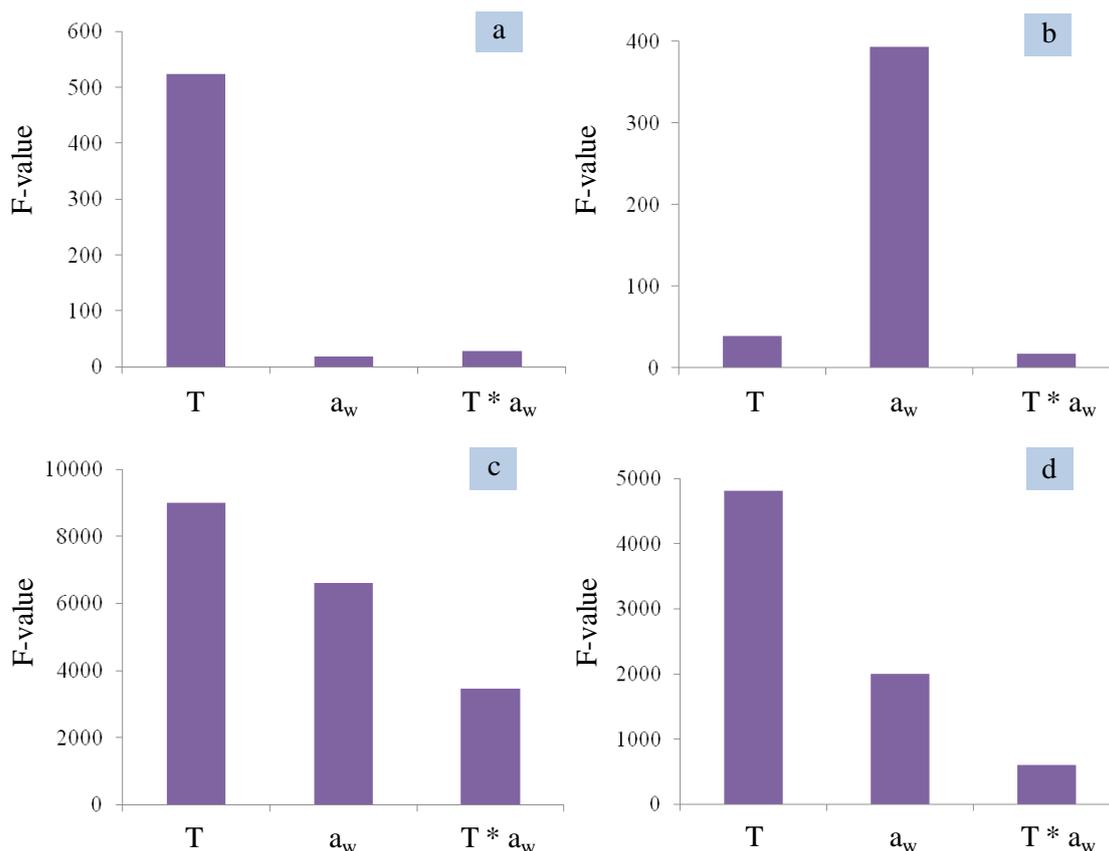


Figura 5.8. *F*-values correspondientes a los efectos principales de T, a_w, y su interacción sobre: a) luminosidad, b) croma, c) ángulo de tono, y d) ΔE*_{ab}.

El color púrpura inicial del polvo se debe a la elevada concentración de antocianinas del maqui (principalmente glucósidos de delphinidina y cianidina). Por lo tanto, los cambios observados pueden asociarse a las distintas transformaciones que sufren dichos pigmentos en las distintas condiciones de almacenamiento. Tanto la temperatura como la actividad de agua inciden sobre la estabilidad de las antocianinas, afectando tanto la factibilidad del desarrollo de reacciones químicas de degradación como la velocidad de las mismas (Tonon et al., 2010; Fang y Bhandari, 2011). A niveles altos de ambos factores se verán favorecidas las reacciones de degradación, produciéndose una disminución en la concentración de los pigmentos antociánicos que aportan tonalidad rojiza y azul, y un incremento de pigmentos pardos debido la formación de compuestos poliméricos vinculados a las reacciones de Maillard (en las secciones dedicadas al estudio de vida útil acelerada se profundizará la discusión sobre esta temática). Por el contrario, las antocianinas serán más estables en los niveles más bajos de T y a_w. De esta manera, los resultados obtenidos respecto a las variaciones de color que puede sufrir el polvo durante el almacenamiento guardan coherencia con las tendencias esperables respecto a la estabilidad de los pigmentos antociánicos.

Es posible concluir que, aunque a niveles elevados de humedad relativa el polvo puede ser relativamente estable desde el punto de vista físico (T_g elevada), no es recomendable que sea expuesto de manera prolongada a esas condiciones debido al efecto negativo sobre el color superficial. Por otro lado, dado que la temperatura fue el factor con mayor incidencia sobre el color, en la próxima sección se profundizará sobre su efecto en la estabilidad del polvo, restringiendo el estudio a bajos niveles de a_w (situación que se puede lograr fácilmente mediante un adecuado empaque del polvo).

5.3.2.2. Estudio de vida útil acelerado

5.3.2.2.1. Análisis de bioactivos

La [Figura 5.9](#) presenta la evolución de los compuestos bioactivos en función del tiempo para las dos temperaturas estudiadas. Se puede observar que a 20 °C no se produjeron variaciones significativas en ACY, % CP y PT, lo cual indica una gran estabilidad del polvo a esta temperatura. A 40 °C, la variable ACY disminuyó de manera significativa desde 1522 ± 15 hasta 267 ± 40 mg cy-3-glu /100 g ([Figura 5.9 a](#)), y al mismo tiempo se observa un aumento de un 30 % en el porcentaje de color polimérico ([Figura 5.9 b](#)), siendo más relevante su aumento en los primeros 42 días. Se encontró una correlación inversa entre dichas variables ($r = -0,95$, $p < 0,05$). Por otro lado, se observó que no hubo variación significativa en PT (al igual que a 20 °C) ([Figura 5.9 c](#)). Este resultado indica una diferencia relevante entre la estabilidad del conjunto de polifenoles y de las antocianinas monoméricas. Resultados similares fueron observados por otros autores. Por ejemplo, [Rocha-Parra et al. \(2016\)](#) estudiaron la estabilidad de polvo liofilizado de vino tinto durante 145 días de almacenamiento a 38 °C y tres condiciones de a_w (0,11, 0,33 y 0,58). Tanto ACY, como específicamente la concentración de malvidina-3-glucósido (mayoritaria en vino tinto), disminuyeron significativamente, mientras que los polifenoles no-antociánicos mayoritarios mostraron mayor estabilidad, sobre todo a baja a_w . Por otro lado, [Fang y Bhandari \(2011\)](#) al estudiar el almacenamiento (tiempo = 6 meses; $a_w = 0,11-0,44$; $T = 5-40$ °C) de polvo de bayberry obtenido por secado por atomización, también observaron una diferencia relevante de estabilidad, no sólo entre PT y ACY, sino también al evaluar específicamente cianidina-3-glucósido y cuatro polifenoles no-antociánicos, confirmándose que el conjunto de polifenoles fue más estable.

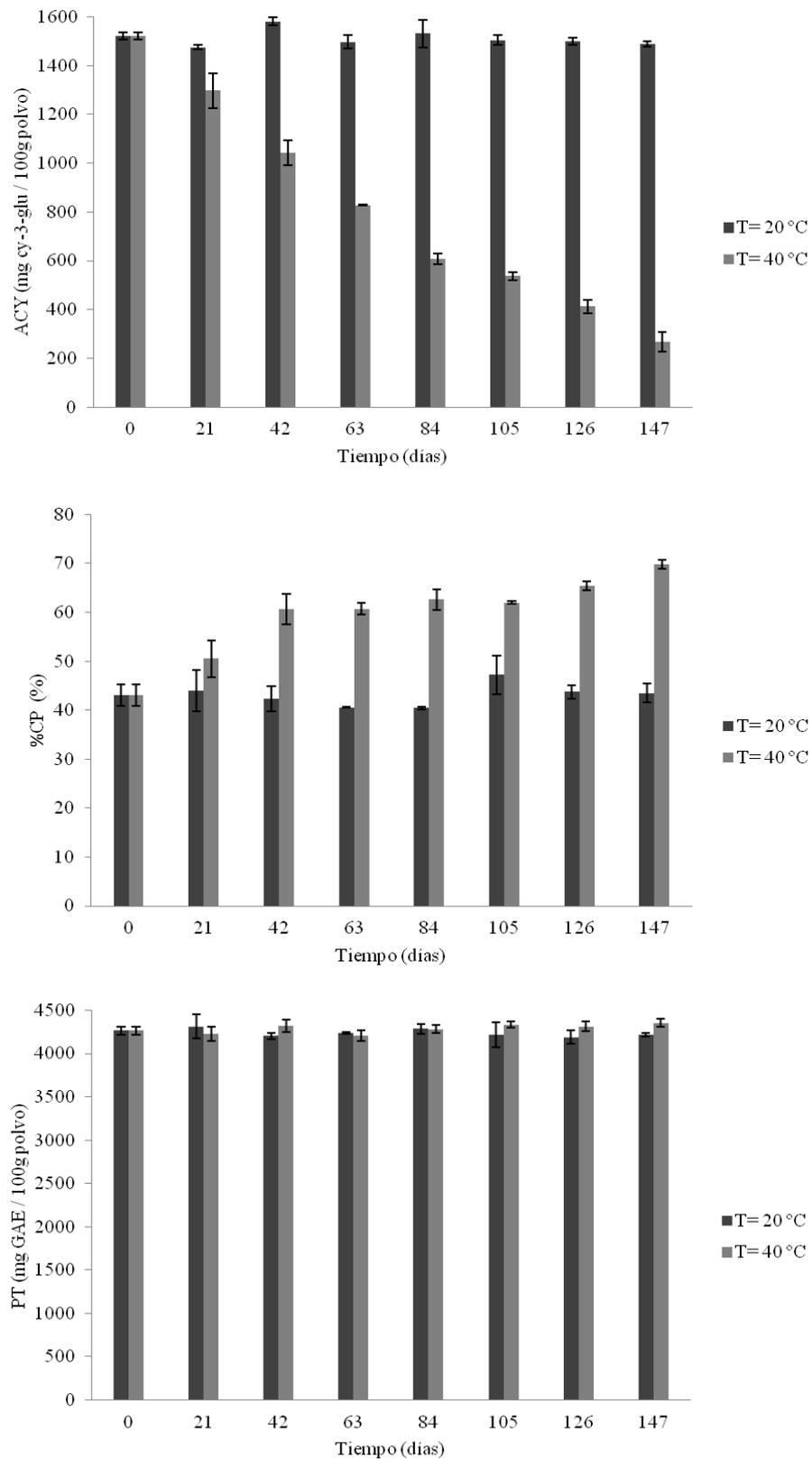


Figura 5.9. Compuestos bioactivos en función del tiempo de almacenamiento: a) ACY, b) % CP y c) PT.

Cabe aclarar que uno de los mecanismos de degradación de antocianinas es la condensación con otros polifenoles dando lugar a nuevos compuestos fenólicos, los cuales son cuantificables en la determinación de PT mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Casati et al., 2017). Este fenómeno de condensación podría estar contribuyendo a la estabilidad observada en los niveles de PT.

Al ajustar el contenido de ACY en función del tiempo ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) se determinó que su degradación siguió una cinética de pseudo-primer orden (Figura 5.10). La constante cinética de la reacción fue $k = 0,0115\text{ día}^{-1}$, lo que indica que el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue 60,3 días.

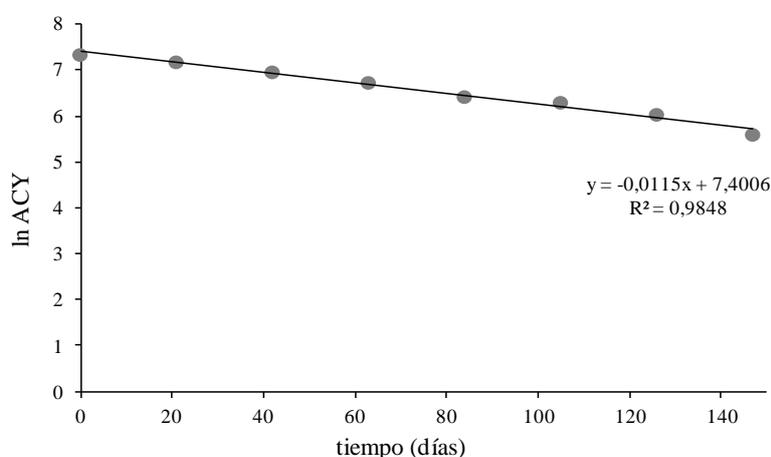


Figura 5.10. Cinética de degradación de ACY durante el proceso de almacenamiento a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$: ajuste lineal de \ln ACY como función del tiempo.

Adicionalmente, los cromatogramas obtenidos por HPLC (Figura 5.11) permitieron analizar el perfil de antocianinas de los polvos almacenados a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (P20) y a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (P40) al finalizar el proceso (147 días). Se pudo observar en ambas condiciones la presencia de los cuatro grupos de antocianinas anteriormente identificados en el fruto de maqui (sección 2.3.2.2): 1) di-glucósidos de delphinidina, 2) di-glucósidos de cianidina, 3) mono-glucósidos de delphinidina, y 4) mono-glucósidos de cianidina. El polvo P40 mostró una fuerte reducción en la concentración de todos los grupos en comparación con P20. Mediante la relación de las áreas del cromatograma a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A_{20}) y a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A_{40}), se determinó que los glucósidos de delphinidina sufrieron una mayor degradación en comparación con los glucósidos de cianidina (Figura 5.11 a). Adicionalmente se pudo determinar, al sumar los porcentajes correspondientes a las áreas de cada grupo de antocianinas que los di-glucósidos fueron más estables que los mono-glucósidos (Figuras 5.11 b y c).

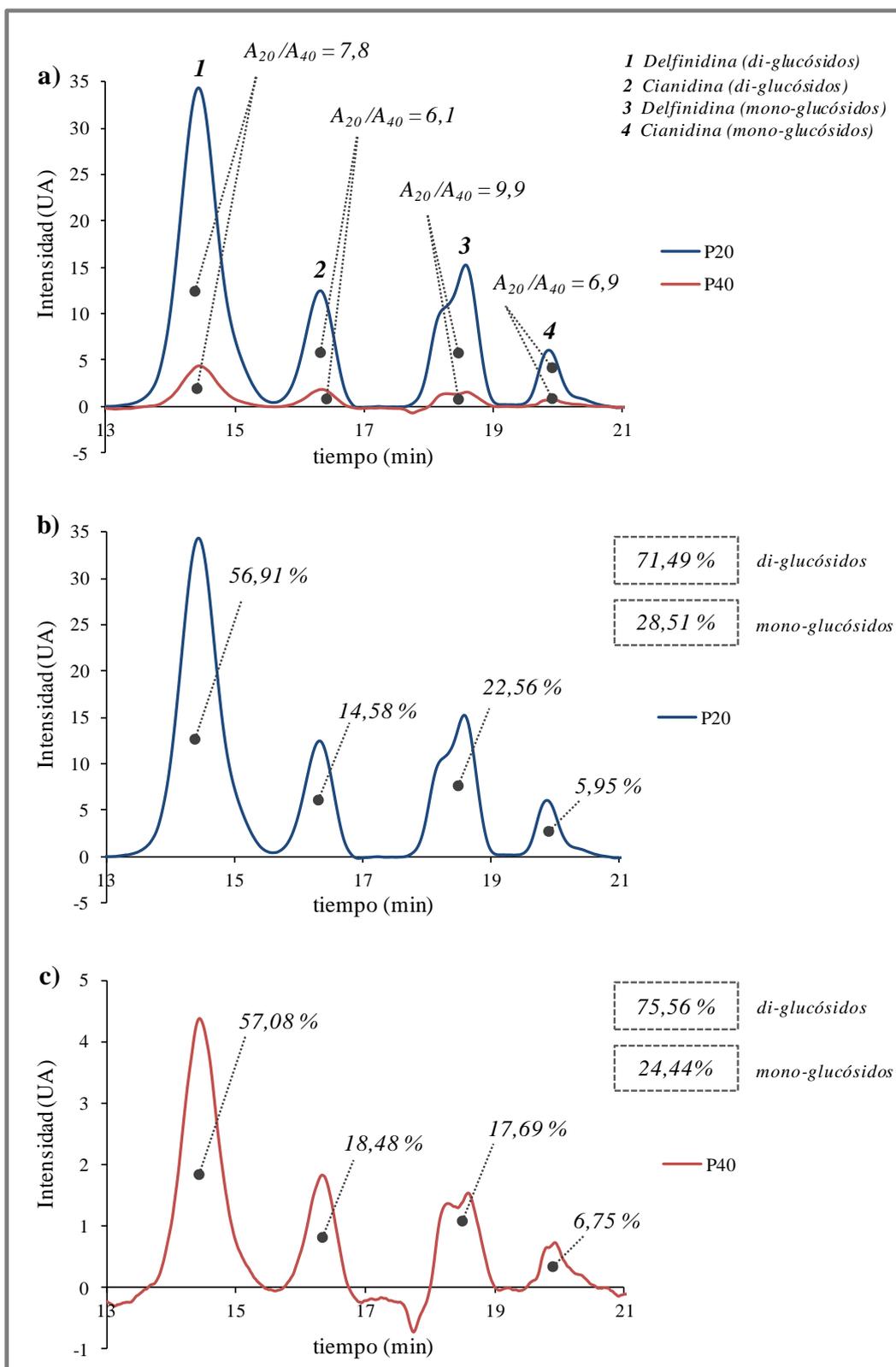


Figura 5.11. Cromatogramas correspondientes a los perfiles de antocianinas (HPLC-DAD señal de 520 nm): a) cromatograma conjunto de los polvos a 20 °C (P20) y 40 °C (P40) a los 147 días de almacenamiento; b) y c) cromatogramas individuales para P20 y P40 respectivamente.

Respecto a la cinética de degradación de las antocianinas, existen reportes en la bibliografía científica que informan cinéticas de pseudo primer orden tanto para productos en polvo como para pulpas o jugos. Por ejemplo, [Tonon et al. \(2010\)](#) estudiaron la estabilidad durante el almacenamiento de las antocianinas en polvos de açai obtenidos por secado por atomización utilizando maltodextrina DE10 y DE20, goma arábica y almidón de tapioca (relación SS/carrier: 1/2). Realizaron el almacenamiento a dos niveles de actividad acuosa ($a_w = 0,328$ y $a_w = 0,529$) y de temperatura (25 y 35 °C), durante un tiempo total de 120 días. Observaron en todos los casos cinéticas de degradación de ACY de pseudo-primer orden, con un incremento en la constante cinética, tanto al aumentar T como a_w . En otro trabajo, [Ferrari et al. \(2013\)](#) observaron el mismo comportamiento en ACY durante el almacenamiento de jugo de zarzamora obtenido por secado por atomización, utilizando como carriers maltodextrina DE20, goma arábica, y una mezcla 1:1 entre ellos (en los tres casos la proporción carriers:SS fue 0,94:1). Sobre los polvos obtenidos realizaron un estudio de almacenamiento acelerado durante cinco meses a dos temperaturas (25 y 35 °C) y $a_w = 0,33$. De acuerdo a los trabajos arriba mencionados, el aumento con la temperatura de la velocidad de degradación de ACY estaría relacionado con la ocurrencia de reacciones de Maillard (pardeamiento no enzimático) cuyos productos (furfural e hidroximetilfurfural) se condensan fácilmente con las antocianinas formando compuestos pardos. Estas reacciones suelen tener lugar durante largos períodos de almacenamiento (o durante distintas etapas de procesamiento) de los alimentos, intensificándose ante la presencia de oxígeno. [Fredes et al. \(2018\)](#) evaluaron la estabilidad durante el almacenamiento (6 meses a T = 60 °C) de polvos de maqui elaborados mediante secado por atomización utilizando inulina y alginato de sodio como carriers (carrier: SS= 6,6:1 y 3,4:1, respectivamente). En dicho trabajo determinaron las cinéticas de degradación de antocianinas específicas cuantificadas por HPLC, observando en todos los casos, cinéticas de pseudo-primer orden y una mayor estabilidad de los di-glucósidos en comparación con los mono-glucósidos tanto de cianidina como de delfinidina. Según estos autores las reacciones de degradación térmica de las antocianinas inician con la hidrólisis del enlace glucosídico ([Rhim, 2002](#); [Sadilova et al., 2006](#)), y dado que los di-glucósidos poseen un enlace glucosídico adicional serían más estables. Tal como fuera discutido previamente en la [sección 3.3.4](#) esta mayor estabilidad de los di-glucósidos también podrían deberse al efecto del enlace glucosídico del carbono 5 que reduce el carácter nucleofílico de los carbonos 6 y 8 del anillo aromático de la antocianina y, por lo tanto, serían menos propensos al ataque electrofílico ([Brauch et al., 2015](#)).

Por otro lado, la disminución observada de ACY conjuntamente con el aumento del % CP que experimentaron los polvos de maqui durante el almacenamiento a 40 °C estaría indicando que además de la degradación térmica, estarían teniendo lugar reacciones de polimerización entre antocianinas monoméricas y otros polifenoles (Fredes et al., 2018). Esta correlación entre ACY y % CP fue también observada durante el almacenamiento de otros productos de berries como jugos, pulpas o purés. En particular Casati et al. (2017) estudiaron la cinética de degradación de ACY en pulpas de arándano, cassis y maqui luego de tratamientos térmicos (75, 80 y 90 °C), obteniendo en todos los casos cinéticas de degradación de ACY de pseudo-primer orden, junto con incrementos en % CP.

En síntesis, el comportamiento observado de los compuestos antociánicos durante el almacenamiento podría justificarse a través de las tres vías discutidas de transformación de las antocianinas monoméricas: degradación térmica, condensación de antocianinas con los productos de las reacciones de Maillard formando productos pardos, y condensación de antocianinas con otros polifenoles conformando nuevos compuestos fenólicos.

5.3.2.2.2 Análisis de color

Respecto al color, la Figura 5.12 exhibe los parámetros cromáticos obtenidos. El polvo de maqui fue muy estable a 20 °C lo cual fue coherente con lo observado respecto a los compuestos bioactivos (estabilidad de ACY, % CP y PT). Por otro lado, a 40° C se pudieron distinguir tres etapas de comportamiento diferente (Figura 5.12):

- Etapa I: se observó que hasta los primeros 35-42 días el cambio principal fue un desplazamiento del ángulo de tono hacia tonalidades más azuladas (desde $h_{ab} = -13,6 \pm 0,6$ °, hasta $h_{ab} = -18,1 \pm 0,3$ °), manteniéndose sin diferencias significativas la luminosidad y la saturación.
- Etapa II: entre los 42-63 días no hubo diferencias significativas en L^* , C^*_{ab} y h_{ab} .
- Etapa III: a partir del día 84 se observó un incremento en la luminosidad (desde $L^* = 35,92 \pm 1,79$, hasta $L^* = 40,32 \pm 2,03$), una disminución en la saturación (desde $C^*_{ab} = 21,96 \pm 0,75$, hasta $C^*_{ab} = 18,46 \pm 1,47$), y un corrimiento del ángulo de tono en sentido creciente del parámetro b^* (desde $h_{ab} = -17,5 \pm 0,5$ °, hasta $h_{ab} = -13,1 \pm 0,3$ °).

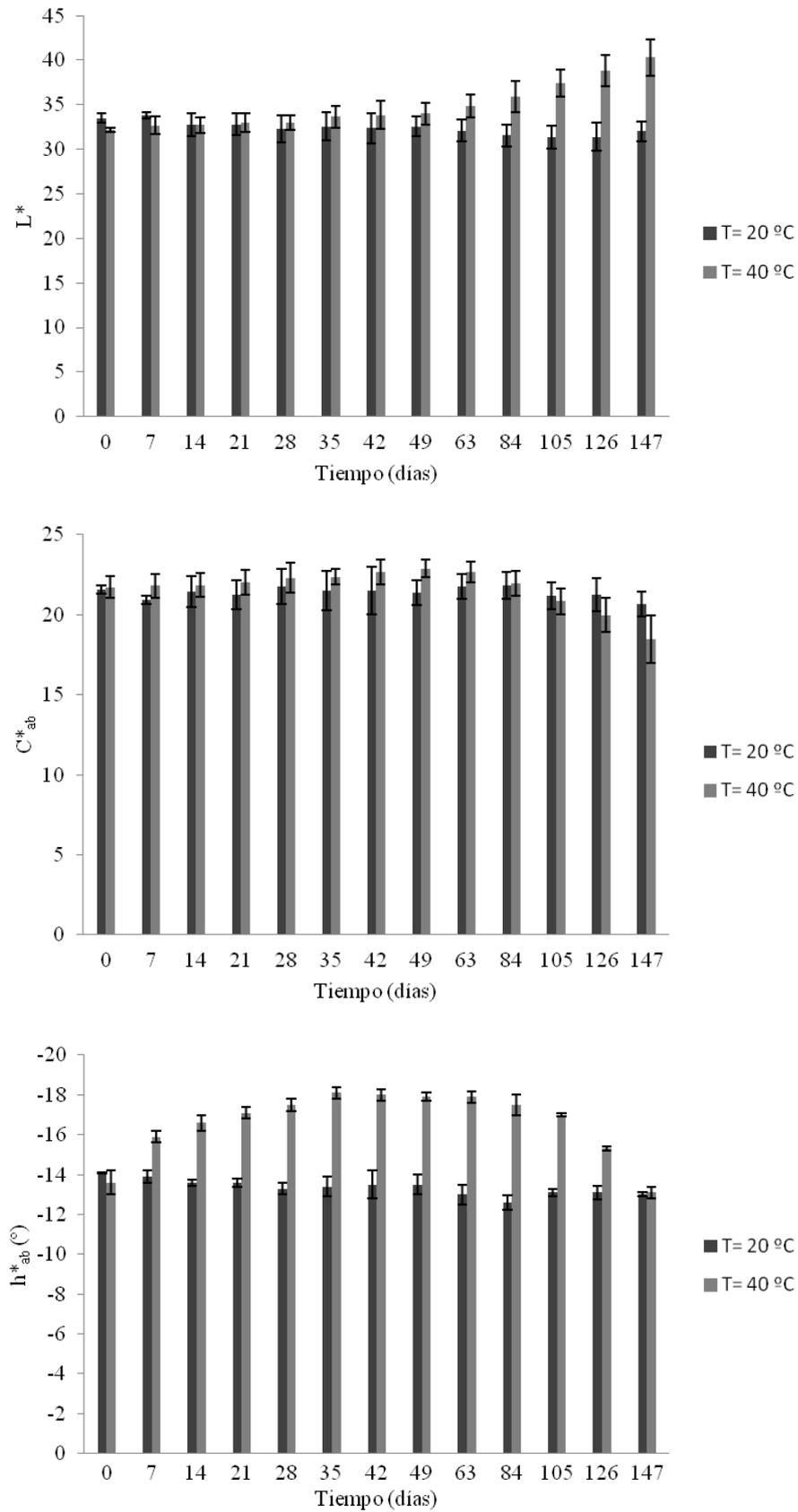


Figura 5.12. Resultados obtenidos para L^* , C^*_{ab} y h^*_{ab} en función del tiempo de almacenamiento.

5.3.2.2.3 Integración de resultados

En la etapa I se verificó un incremento significativo del color polimérico (desde $43,1 \pm 2,2$ % a $60,6 \pm 3,1$ %) y una disminución de ACY hasta aproximadamente el 70 % de su valor inicial. No obstante, la concentración de ACY siguió siendo elevada (superior a los 1000 mg cy-3-glu /100 g) (ver [Figura 5.9](#)). Como fuera mencionado previamente, una de las vías de degradación de antocianinas monoméricas es la formación de estructuras poliméricas mediante reacciones de condensación con otros polifenoles con el consecuente incremento de % CP. La condensación de antocianinas con otros compuestos fenólicos o con ellas mismas, son dos mecanismos posibles de copigmentación, denominados copigmentación intermolecular e intramolecular respectivamente ([Rein, 2005](#); [Trouillas et al., 2016](#)). Los copigmentos generalmente son compuestos incoloros ricos en electrones π que poseen la capacidad de interactuar con el catión flavilio (una de las estructuras de las antocianinas monoméricas), conformando un complejo π - π ([Castañeda-Ovando et al., 2009](#)). Dicho complejo altera el espectro de absorción del catión flavilio generando un efecto hiperacrómico (mayor intensidad de absorción) y un desplazamiento batocrómico de la longitud de onda de máxima absorción. De esta manera, la evolución del color en esta etapa, es decir, el desplazamiento hacia tonalidades más azuladas ($< h_{ab}$), manteniendo el nivel de saturación y luminosidad, podría deberse a un efecto de copigmentación de antocianinas. Dicha copigmentación podría intensificar la tonalidad azulada de las antocianinas mayoritarias del maqui (delfinidinas), desplazando el ángulo de tono y aportando saturación. Este fenómeno probablemente haya compensado la pérdida de saturación por disminución de ACY, al final de esta etapa.

Luego, en la etapa II el porcentaje de color polimérico se mantuvo sin diferencias significativas en torno a 61 %, ACY disminuyó desde 1042 ± 51 mg cy-3-glu / 100 g hasta 828 ± 3 mg cy-3-glu / 100 g, y los niveles de L^* , C^*_{ab} y h_{ab} se mostraron estables. Por lo tanto, la disminución de ACY conservando aproximadamente un 55 % de su nivel inicial no fue suficiente para provocar una variación significativa en el color superficial del polvo a lo largo de la etapa II.

Finalmente, a partir de los 84 días de almacenamiento (inicio de la etapa III) el % CP volvió a incrementarse pero de manera menos pronunciada que en la etapa I (desde % CP = $62,6 \pm 2,1$ %, hasta % CP = $69,8 \pm 1,0$ %). Simultáneamente, los niveles de ACY disminuyeron, pasando desde aproximadamente un 40 % (84 días) hasta un 18 % (147 días) de su nivel inicial. Por lo tanto, los cambios del color en esta última fase estuvieron

relacionados principalmente con la pronunciada disminución de ACY, producto de la degradación térmica, dando como resultado compuestos incoloros (ácidos fenólicos y aldehídos) o compuestos que aporten tonalidades amarillas (chalconas). Por otro lado las antocianinas monoméricas pueden haberse degradado formando pigmentos pardos al condensarse con productos de las reacciones de Maillard. Estos mecanismos de degradación de ACY que se desencadenan normalmente durante tratamientos térmicos prolongados, incidieron en el color del polvo disminuyendo la saturación, incrementando la luminosidad y desplazando el ángulo de tono de manera tal que se incremente el parámetro b^* (Figura 5.12). Un comportamiento similar fue reportado por Rocha-Parra et al. (2016) y Sanchez et al. (2015) en estudios de vida útil acelerada en polvos de vino tinto y de cereza, respectivamente.

Finalmente la evaluación del perfil de antocianinas por HPLC de los polvos al final del almacenamiento permitió verificar a 40 °C la degradación de las antocianinas específicas del maqui, reduciéndose su concentración entre 6 y 10 veces con respecto al polvo original y al almacenado a 20 °C. En términos del color esta disminución de los compuestos antociánicos tuvo un impacto directo en la intensidad del color y en la luminosidad del producto final obtenido, pero manteniendo la tonalidad púrpura. La diferencia de color al final del almacenamiento entre el polvo almacenado a 20 °C y el almacenado a 40 °C puede visualizarse en las imágenes presentadas en la Figura 5.13.

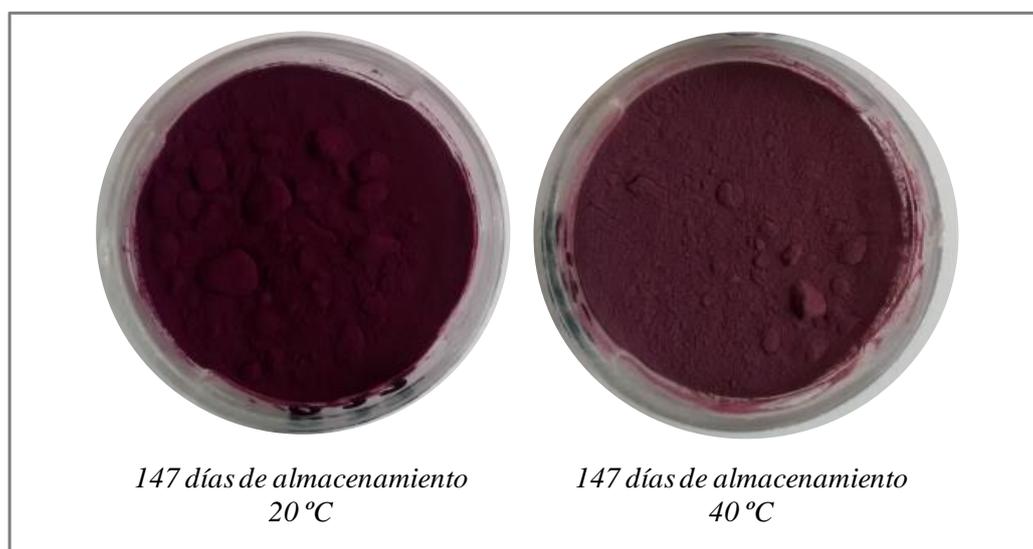


Figura 5.13. Color de los polvos de maqui al final del almacenamiento acelerado a las dos temperaturas evaluadas.

5.4. Conclusiones

Los estudios realizados permitieron obtener información valiosa respecto a la estabilidad del polvo de maqui, posibilitando así la recomendación de pautas de almacenamiento.

El estudio de la isoterma de sorción y de la temperatura de transición vítrea permitió comprobar una estabilidad física satisfactoria del polvo. El polvo de maqui óptimo puede ser expuesto a humedades relativas elevadas manteniendo el estado vítreo aún a 30 °C.

En cuanto a los compuestos bioactivos si bien se observó una elevada estabilidad de los polifenoles totales tanto a 20 °C como a 40 °C, tuvo lugar una degradación de los pigmentos antociánicos en el nivel térmico más alto. Esto último tuvo un impacto apreciable en el color final obtenido, sobre todo a niveles de actividad de agua elevados ($a_w \geq 0,52$). Sin embargo, a 20 °C se observó una alta estabilidad de todos los compuestos fenólicos, en particular pudo verificarse mediante HPLC la conservación de las antocianinas específicas del maqui.

En este sentido, es posible establecer que a una temperatura de 20 °C y resguardando el polvo en un envase apropiado que garantice su nivel inicial de actividad acuosa ($a_w \approx 0,20$), el producto será muy estable tanto físicamente como desde el punto de vista de sus compuestos bioactivos y del color durante un almacenamiento prolongado. En estas condiciones puede ser conservada la calidad del producto para su utilización como ingrediente funcional para la elaboración de nutraceuticos y/o alimentos funcionales. Adicionalmente podrá ser utilizado como colorante natural.

Capítulo 6

Aplicaciones del polvo de maqui

6.1. Introducción

El polvo de maqui óptimo elaborado y analizado en los capítulos precedentes posee un conjunto de características que lo convierten en un producto atractivo para diversas aplicaciones. Dentro de las múltiples aplicaciones posibles, en esta Tesis se estudia el uso del polvo: 1) como ingrediente funcional, 2) para la elaboración de un nutracéutico, y 3) como colorante natural y agente antimicrobiano en sidra.

Ingrediente funcional

Uno de los atributos del polvo de maqui óptimo obtenido en el Capítulo 4 es el contenido particularmente elevado de compuestos bioactivos (polifenoles y antocianinas), lo que junto con su elevada capacidad antioxidante lo convierte en una nueva fuente alimentaria que no sólo permitirá aportar a una diversificación de la dieta sino que podrá utilizarse como materia prima para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Para completar su caracterización y evaluar su potencial uso como ingrediente funcional, resulta relevante poder determinar la bioaccesibilidad de sus compuestos bioactivos.

Los efectos beneficiosos de los nutrientes y/o compuestos bioactivos en la salud de las personas están condicionados a su bioaccesibilidad y biodisponibilidad luego del proceso digestivo. La biodisponibilidad es definida como la fracción del nutriente alimenticio ingerido que está disponible para su uso en funciones fisiológicas o para ser almacenado en el cuerpo (Fairweather-Tait, 1993), abarcando la liberación de la matriz alimenticia, las distintas etapas de transformación digestiva, la absorción, el metabolismo, la distribución entre los tejidos y la bioactividad. A su vez, la bioaccesibilidad es definida y aplicada en muchos trabajos como la fracción liberada en el tracto gastrointestinal (Versantvoort et al., 2005), sin abarcar la

absorción a través de la pared intestinal o cualquier procesamiento metabólico a nivel pre-sistémico. Para determinar la bioaccesibilidad existen metodologías *in vitro* en las cuales se simula el proceso de digestión, incluyendo las fases oral, gástrica y del intestino delgado (Minekus et al., 2014).

Nutracéutico

En cuanto a los nutracéuticos, las formas de administración pueden tener múltiples presentaciones (e.g., polvo, cápsulas y comprimidos). Más del 80% de los medicamentos producidos en el mundo son comprimidos (Sarraguça, et al., 2010); además dicho formato dominó el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos en los años 2016-2018 (Dai et al., 2019). La popularidad de esta forma farmacéutica se debe a las múltiples ventajas que ofrece tanto para el fabricante (simplicidad y economía de producción, conveniencia para el envasado, distribución y dispensación) como para el paciente (exactitud en la dosis, facilidad en el transporte y administración) (Gallo et al., 2015; Nguyen et al., 2013).

El método más utilizado para la elaboración de comprimidos es la compresión directa de la mezcla de polvos constituida por el/los ingrediente/s activo/s y excipientes (Li et al., 2017; Dai et al., 2019). No obstante, para emplear esta técnica se requiere de ingredientes activos y excipientes con buenas propiedades físico-mecánicas (fluidez y compactibilidad) y adecuada estabilidad física (Gallo et al., 2011). De acuerdo a lo analizado en los Capítulos 4 y 5, el polvo de maqui obtenido mediante secado por atomización presentó excelente fluidez, y adecuados valores de humedad, temperatura de transición vítrea e higroscopicidad, entre otras propiedades. De esta manera, el polvo de maqui óptimo tiene potencial para poder ser procesado por la técnica de compresión directa. En este capítulo se estudia la capacidad del polvo de maqui de ser comprimido y propiedades relacionadas con la calidad de los comprimidos para su administración oral.

Colorante y antimicrobiano para bebidas

Por otro lado, existe actualmente un interés creciente por la utilización de extractos o jugos de berries para su incorporación en distintos tipos de bebidas fermentadas, entre las que se encuentra la sidra. En la Norpatagonia se concentra el 75% de la producción nacional de sidras, teniendo esta actividad un gran impacto económico regional (Ministerio de Agricultura

y Ganadería de la Argentina, 2016). El consumo de dicha bebida posee una marcada estacionalidad, el 80 % del mismo se da entre los meses de octubre-diciembre, en especial durante las fiestas de fin de año. Por tal motivo, el sector productivo ha buscado desestacionalizar el consumo de la sidra y reposicionarla como una bebida saludable y natural. Entre otras cosas, ha aumentado la producción de sidra artesanal de la mano de pequeños productores que apuestan a reinventar el mercado con productos de alta calidad, realizados con manzanas seleccionadas (sidras varietales), sidras de pera y sidras champagnizadas (Gonzalez Flores, 2019). En este marco, la incorporación de polvos de frutos rojos, en particular de polvo de maqui al proceso de elaboración de la sidra podría aportar elementos interesantes: posibilitar la generación de una gama de colores mediante la incorporación de pigmentos naturales y un enriquecimiento en antioxidantes.

En la industria de las bebidas fermentadas como el vino y la sidra se utiliza SO₂ como antimicrobiano para lograr la estabilidad microbiológica de los productos, evitando el desarrollo de microorganismos contaminantes como bacterias o levaduras (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Sin embargo, el contenido de este compuesto se encuentra estrictamente controlado (no debe superar los 200 mg/l) debido a que puede generar problemas en la salud del consumidor (CAA 2018; Vally et al., 2009). Por esta razón existe actualmente una tendencia a reducir el contenido de SO₂ en bebidas fermentadas (Lisanti et al., 2019). En la Figura 6.2 se muestra un esquema del proceso de producción de sidra, en el que puede observarse que el sulfitado se realiza en un primer momento en el mosto de manzana para eliminar la microbiota inicial de la fruta y que el proceso fermentativo sea conducido principalmente por los microorganismos inoculados. El segundo momento del sulfitado se realiza con posterioridad a la obtención de la sidra base como factor de conservación del producto.

La actividad antimicrobiana de distintos compuestos fenólicos provenientes de fuentes naturales como hierbas medicinales, té verde, o frutos rojos, ha sido investigada sobre un amplio espectro de microorganismos (Daglia, 2012). En este sentido, el aprovechamiento del efecto antimicrobiano de los polifenoles podría contribuir a reducir el contenido de SO₂ en este tipo de bebidas fermentadas, manteniendo su seguridad microbiológica (García-Ruiz et al., 2008). En el caso de los frutos rojos existen numerosos estudios de efecto antimicrobiano de polifenoles sobre bacterias patógenas asociadas a distintas enfermedades de transmisión alimenticia (Das et al., 2017), siendo menos frecuentes los ensayos de efecto antimicrobiano sobre levaduras contaminantes. Respecto al maqui, en los trabajos de Genskowsky et al.

(2015 y 2016) se analizó el efecto antimicrobiano sobre bacterias patógenas relacionadas con alimentos refrigerados. Los autores obtuvieron resultados positivos, verificando la existencia de efecto antimicrobiano y atribuyéndolo a la elevada concentración de polifenoles del fruto.



Figura 6.2. Esquema del proceso de producción de sidra. Extraído y adaptado de [Gonzalez Flores \(2019\)](#).

La industria alimentaria ha realizado muchos esfuerzos en las últimas décadas para ofrecer productos funcionales. Sin embargo expertos en marketing aseguran que entre el 60 y el 80% de los nuevos productos que se lanzan al mercado finalmente fracasan. Para ello es primordial incluir desde las primeras etapas del desarrollo del nuevo alimento, técnicas de análisis y percepción sensorial que integren las demandas de los consumidores de manera de mejorar la eficiencia del proceso de diseño de los nuevos productos alimenticios para garantizar su éxito en el mercado ([Ares y Delisa, 2010](#)). La percepción de los consumidores sobre nuevos productos alimenticios es una información muy valiosa para las empresas alimentarias y resulta esencial para el desarrollo y comercialización de nuevos productos. Por

lo tanto, para diseñar productos alimenticios que cumplan con las expectativas sensoriales del consumidor, es necesario conocer qué atributos sensoriales impulsan el gusto del consumidor, es decir los direccionamientos de preferencia (Ares et al., 2010).

De acuerdo a las características del polvo de maqui óptimo y las aplicaciones seleccionadas, en este Capítulo se presentan los resultados obtenidos referidos a:

- Bioaccesibilidad del polvo de maqui y su potencialidad uso como ingrediente funcional.
- Compactación del polvo de maqui, desintegración y disolución de comprimidos nutracéuticos.
- Impacto del uso de polvo de maqui en la producción de sidra: a) color del producto, b) enriquecimiento en compuestos bioactivos y c) aceptabilidad del color y percepción por parte de los potenciales consumidores. Se incluyen resultados referidos al efecto antimicrobiano del polvo de maqui sobre levaduras alterantes vinculadas al proceso de elaboración de la sidra.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Materiales

Se utilizó polvo de maqui obtenido mediante secado por atomización en las condiciones establecidas en el estudio de optimización del Capítulo 4. Para el estudio con sidra, se utilizó una sidra base (mosto que ya ha sufrido fermentación alcohólica) elaborado a partir de manzanas de la variedad Red Delicious, el cual fue provisto por la empresa Saenz Briones y Cía. SAIC (elaboradora de sidras de la Provincia de Río Negro). Para evaluar el efecto antimicrobiano del polvo de maqui se utilizaron tres levaduras obtenidas de procesos fermentativos regionales: dos levaduras corresponden a especies contaminantes (*Meyerozyma guilliermondii* NPCC1070 y *Pichia membranifaciens* NPCC1099) (Saez et al., 2011), y la restante corresponde a la especie fermentativa por excelencia *Saccharomyces cerevisiae* (NPCC1178) (Lopes et al., 2007).

6.2.2. Digestión *in vitro* del polvo de maqui y determinación de bioaccesibilidad

Se disolvió una masa de aproximadamente 700 mg de polvo de maqui en 5 ml de agua destilada. Posteriormente, se tomaron 5 g de dicha muestra y se simularon las fases de digestión oral, gástrica y del intestino delgado, de acuerdo a Minekus et al. (2014). En todas las fases, las muestras fueron incubadas a 37 °C en una estufa modelo Function Line 7000 (Heraeus, Alemania), manteniendo una agitación constante a 100 rpm con un agitador orbital modelo Vicking M-23 (Vicking SRL, Argentina). Luego del proceso de digestión *in vitro*, las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min, separando por un lado la fracción soluble (sobrenadante), y por otro la fracción insoluble (residuo). Sobre la fracción soluble se determinó el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de acuerdo a la metodología descrita en las secciones 2.2.3.2 y 2.2.3.3, respectivamente. Posteriormente, teniendo en cuenta el volumen de la fracción soluble (V_{fs}), la masa inicial de polvo (m_p), y los valores de PT y CA del polvo, se calculó la bioaccesibilidad (%) para PT y CA según las Ecuaciones 6.1 y 6.2.

$$\text{Bioaccesibilidad}_{PT}(\%) = \frac{\text{mg GAE}_{fs}}{\text{mg GAE}_p} = \left(\frac{V_{fs} \cdot PT_{\text{fracción soluble}}}{m_p \cdot PT_{\text{polvo}}} \right) \cdot 100 \quad (6.1)$$

$$\text{Bioaccesibilidad}_{CA}(\%) = \frac{\text{mg GAE}_{fs}}{\text{mg GAE}_p} = \left(\frac{V_{fs} \cdot CA_{\text{fracción soluble}}}{m_p \cdot CA_{\text{polvo}}} \right) \cdot 100 \quad (6.2)$$

donde mg GAE_{fs} y mg GAE_p representan los mg equivalentes de ácido gálico en la fracción soluble y en el polvo, respectivamente.

6.2.3. Preparación de los comprimidos

Los comprimidos de polvo de maqui fueron elaborados mediante compresión directa utilizando una prensa hidráulica (Delfabro, Córdoba, Argentina) operada a 2,9 kN manteniendo la presión durante 5 s. Se utilizó una matriz circular de 10 mm de diámetro con un punzón de cara plana, una masa de 1 g de polvo de maqui para cada comprimido y pequeñas cantidades de estearato de magnesio (en polvo) para lubricar el punzón.

6.2.4. Tiempo de desintegración de los comprimidos

El tiempo de desintegración de los comprimidos fue medido según la norma USP 30-NF 25 (2007), utilizando un desintegrador (Scout, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) (Figura 6.3). El test fue llevado a cabo sobre 6 comprimidos en 800 ml de agua destilada a $37 \pm 0,5$ °C. El tiempo de desintegración fue definido como el tiempo requerido para la desintegración completa (identificada visualmente) de los 6 comprimidos.

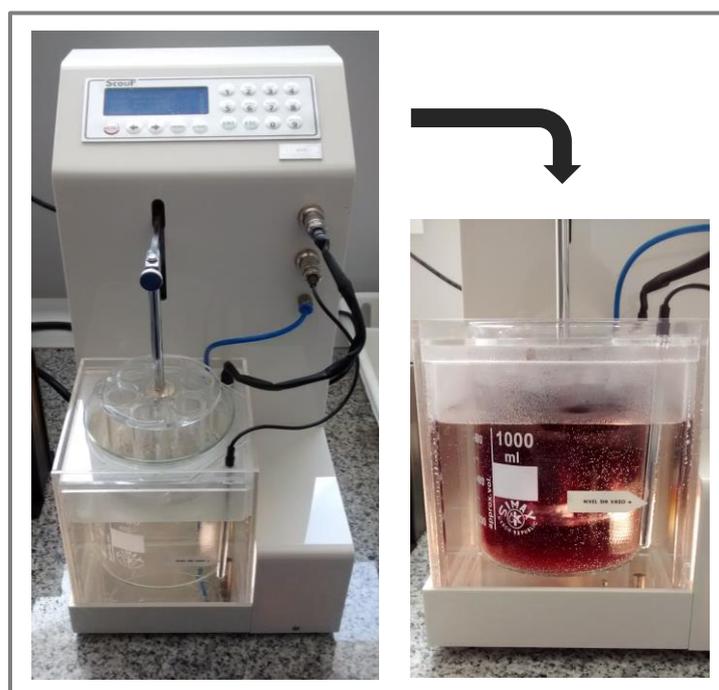


Figura 6.3. Desintegrador (izquierda) y desintegración de comprimidos de maqui (derecha).

6.2.5. Perfil de disolución de antocianinas de los comprimidos

La liberación de las antocianinas desde los comprimidos producidos fue investigada utilizando un equipo de disolución modelo 708-DS (Dissolution Apparatus, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) (Figura 6.4). Se colocó un comprimido de 1 g en cada uno de los vasos de disolución (réplicas). Cada vaso fue llenado con un volumen de 500 ml de agua destilada. La temperatura y la velocidad de agitación en los vasos fueron fijadas en 37 °C y 100 rpm. Luego, de manera automatizada utilizando un extractor de muestras modelo Agilent 8000 (Dissolution Sampling Station, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), se extrajeron muestras de 5 ml de los vasos de disolución a tiempos predeterminados, e inmediatamente después de cada extracción se adicionó a los vasos un volumen igual de agua destilada para mantener constante el volumen total. A las muestras extraídas se les determinó el contenido de antocianinas monoméricas totales de acuerdo a la metodología de pH

diferencial descrita en la [sección 2.2.3.1](#), obteniendo el perfil de disolución a lo largo del tiempo. Se seleccionó para este análisis, la variable ACY teniendo en cuenta que los compuestos antociánicos constituyen el subconjunto mayoritario de polifenoles del maqui. Por otra parte, esta variable puede determinarse fácilmente mediante la técnica espectrofotométrica.

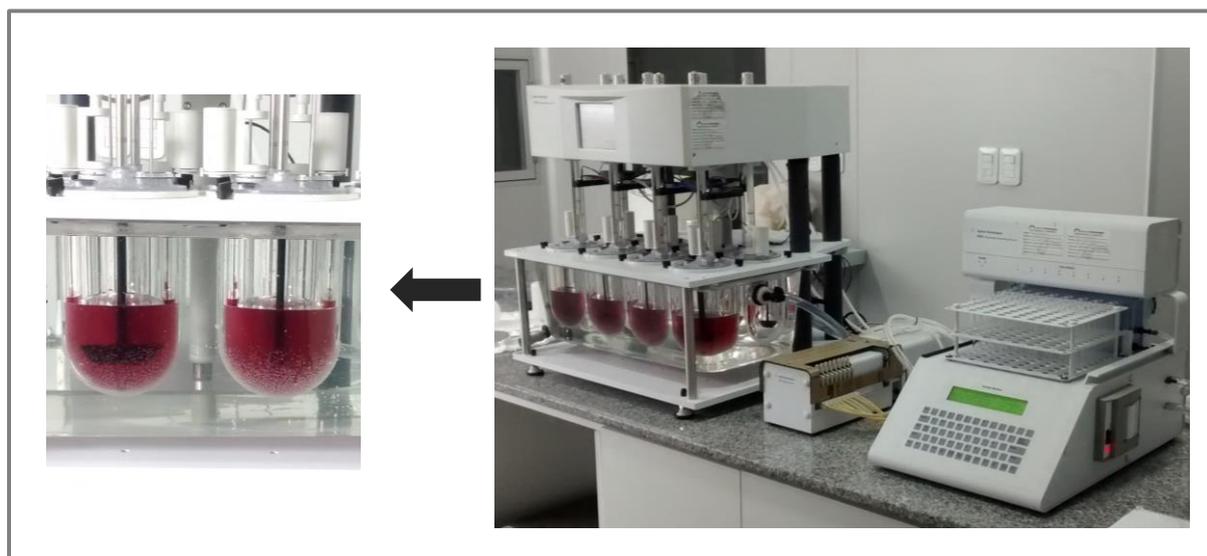


Figura 6.4. Equipo de disolución y muestreador automático.

6.2.6. Preparación de las sidras con agregado de polvo de maqui

Se formularon las siguientes mezclas: 200, 400, 600, 800 y 1000 mg de polvo de maqui cada 100 ml de sidra (en adelante denominadas como SP₂₀₀, SP₄₀₀, SP₆₀₀, SP₈₀₀ y SP₁₀₀₀ respectivamente), siendo la muestra “control” la sidra sin agregado de polvo (SC). En todos los casos se combinó la cantidad necesaria de polvo de maqui y sidra en un vaso de precipitados agitando vigorosamente la mezcla durante 10 min. Posteriormente, se almacenó en heladera durante dos horas para que tenga lugar la decantación del SiO₂ presente en el polvo. Finalmente se extrajo el sobrenadante, siendo éstas las muestras definitivas sometidas a los distintos ensayos.

6.2.7. Determinación de compuestos bioactivos y pH

El pH fue determinado mediante un pH-metro modelo TPX II (Altronix, NY, USA). Para las determinaciones de los compuestos bioactivos de las formulaciones de sidra y polvo

de maqui se utilizaron las técnicas espectrofotométricas descritas para el caso del fruto de maqui: método del pH diferencial para la cuantificación de ACY y la técnica del reactivo de Folin-Ciocalteu para el caso de PT (ver secciones 2.2.3.1 y 2.2.3.2). La diferencia respecto a lo descrito en dichas secciones, fue que en este caso las determinaciones se realizaron sobre alícuotas de las formulaciones de sidra + polvo de maqui. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE / 1000 ml) en el caso de PT, y en mg de cianidin-3-glucosido por litro (mg cy-3-glu/1000 ml) para ACY.

El porcentaje de color polimérico (% CP) se determinó utilizando el método de la reacción con metabisulfito de potasio (Giusti y Wrolstad, 2001) descrito en la sección 5.2.4.3. La diferencia metodológica consistió en que las muestras blanqueadas con metabisulfito de potasio fueron las mezclas de sidra y polvo de maqui, formuladas de acuerdo a la sección 6.2.6, cuyo máximo de absorción en este caso fue a la longitud de onda $\lambda_{\max} = 525$ nm (en lugar de 515 nm).

6.2.8. Color de las sidras combinadas con polvo de maqui

Las determinaciones se realizaron por espectrofotometría (equipo descrito en la sección 2.2.3). Se realizaron barridos espectrales registrando la transmitancia entre las longitudes de onda 780 nm y 380 nm (con intervalos de 5 nm). Luego, siguiendo los procedimientos estandarizados presentados en ASTM E 308-01 (ASTM, 2001), se transformó la información obtenida por espectrofotometría en las coordenadas L^* , a^* y b^* del espacio de color CIELAB (iluminante C y ángulo de observación de 2°). A partir de estos parámetros se calcularon las funciones de color “croma” (C^*_{ab}) y “ángulo de tono” (h_{ab}), mediante las Ecuaciones 4.6 y 4.7.

6.2.9. Estudio de aceptabilidad del color de la sidra con polvo de maqui y percepción del consumidor

Se realizó un estudio con 123 consumidores (73% mujeres y 27% hombres), con edades comprendidas entre 18 y 69 años con el objetivo de evaluar la aceptabilidad del color de los diferentes productos (sidras combinadas con polvo de maqui). Se aplicaron diferentes metodologías de percepción del consumidor a través de una encuesta electrónica (la versión

resumida se presenta en la [Figura 6.5](#)) realizada a potenciales consumidores y enviada a través de diversas redes sociales.

La encuesta estuvo centrada en el color de la bebida como atributo sensorial de relevancia, y fue estructurada de manera tal que se pudieran analizar los siguientes aspectos sobre el nuevo producto propuesto:

- Evaluar la aceptabilidad del color individual de cada bebida y la percepción del consumidor. Se presentaron imágenes de las bebidas de forma monódica y en un orden aleatorio, y se solicitó al consumidor que evalúe cuánto le gustaba el color de la bebida utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos; desde 1 = me disgusta mucho, hasta 9 = me gusta mucho y donde el puntaje intermedio 5 correspondía a la descripción “me es indiferente”. Además se utilizaron preguntas abiertas solicitando al consumidor que exprese las características por las cuales les gustaba o disgustaba el color percibido ([Ares et al., 2010](#)).
- Conocer la preferencia entre las bebidas. Se presentaron de manera simultánea todas las opciones de bebidas y se consultó cuál de todas era la preferida.
- Evaluar la intención de compra de los posibles productos. Para ello se utilizó una escala Sí/No ([Sae-Eaw et al., 2007](#)).
- Influencia del conocimiento de información sobre beneficios de la salud en la elección del consumidor: se suministró información adicional sobre el maqui y se volvió a preguntar sobre la preferencia de la bebida ([Tepsongkroh et al., 2020](#)).

Los resultados fueron analizados mediante herramientas gráficas de estadística descriptiva. Adicionalmente se realizó un ANOVA y se utilizó el test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar diferencias significativas entre medias correspondientes a los puntajes de aceptabilidad de cada bebida. El análisis de las respuestas a las preguntas abiertas se llevó a cabo en forma independiente por dos analistas, los cuales realizaron el conteo de palabras, empleando en caso de ser necesario truncamiento y familia de palabras, acordando los criterios para lograr una categorización representativa del conteo.

Se desea introducir en el mercado una nueva bebida para adultos a base de sidra de manzana (4-6% de alcohol) con agregado de un polvo de maqui. El maqui es una fruta fina silvestre de la Patagonia argentino-chilena.

Manzana



Maqui





Sidra con agregado de polvo de maqui

Por favor observe a continuación las imágenes de sidra con agregado de maqui en diferentes cantidades, e indique cuánto piensa ud. que le gustaría cada una de esas bebidas

Bebida 563



Marque en la siguiente escala cuánto le gusta el color de la bebida 563 *

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Me disgusta mucho Me gusta mucho

Lo que me gusta del color de la bebida 563 es...

Tu respuesta

Lo que no me gusta del color de la bebida 563 es...

Tu respuesta

Con el mismo formato (fotografía, escala, y preguntas), se muestran sucesivamente tres bebidas más. Luego continúa la encuesta...

Teniendo en cuenta el color de las 4 bebidas presentadas

Cuál es la que usted prefiere? *

Bebida 563

Bebida 381

Bebida 236

Bebida 178

Compraría el producto? *

Si

No

Justifique su respuesta

Tu respuesta

¿Sabía que el maqui se considera un superalimento por aportar numerosos beneficios a la salud (poder antioxidante, efectos antiinflamatorio e hipoglucemiantes)? Considerando que a mayores concentraciones de polvo de maqui añadido a la bebida se obtiene una mayor coloración, por favor indique:

Cambiaría Ud. la elección de la bebida? *

Si

No

Qué bebida elegiría? *

Bebida 563

Bebida 381

Bebida 236

Bebida 178

Por último, por favor complete:

Edad *

Tu respuesta

Genero *

Tu respuesta

ENVIAR

Figura 6.5. Encuesta (versión resumida) utilizada para evaluar la aceptabilidad del producto propuesto por parte del consumidor. La versión completa se presenta en el Anexo.

6.2.10. Efecto antimicrobiano del polvo de maqui en levaduras

6.2.10.1. Ensayo de crecimiento de levaduras en microplacas

El precultivo de cada levadura (*M. guilliermondii*, *Pichia membranifaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*) se realizó en 5 ml de caldo GPY (g/100 ml: 2 glucosa, 0,5 peptona, 0,5 extracto de levadura) a 25°C y con agitación (120 rpm) hasta obtener una concentración de 1×10^8 células/ml (48 hs aproximadamente). El ensayo de actividad antimicrobiana se realizó en microplacas de 96 pocillos conteniendo 0,25 ml de medio YNB (g/100 ml: 0,67 YNB Difco™, 2 glucosa), 5 μ l del inóculo para obtener una concentración de 2×10^6 cel/ml y cantidades crecientes de polvo de maqui a fin de lograr las siguientes concentraciones finales: 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg de polvo en 100 ml de medio. Las microplacas se incubaron a 25 °C durante 86,5 h, realizando el seguimiento del crecimiento a través de la medición de la densidad óptica (DO) a 630 nm utilizando un lector de microplacas (Rayto RT-2100 C, Nanshan, Shenzhen, China).

6.2.10.2. Modelado de la cinética de crecimiento y análisis estadístico

Las cinéticas de crecimiento microbiano se modelaron utilizando los datos de DO a 630 nm ajustados a la función de Gompertz (Ecuación 6.3) (Arroyo-López et al., 2009) en el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

$$Y=A.\exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} \cdot (\lambda-t)+1 \right] \right\} \quad (6.3)$$

donde $Y = \ln (DO_t / DO_0)$, siendo DO_0 la densidad óptica inicial del cultivo y DO_t la densidad óptica medida al tiempo t , $A = \ln (DO_\infty / DO_0)$ es el valor máximo de población alcanzado cuando la densidad óptica se hace asintótica a t infinito (DO_∞), μ_{\max} (expresada en h^{-1}) es la máxima velocidad de crecimiento específica y λ (expresada en h) es la duración de la fase lag o de latencia hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial.

Se realizó el modelado matemático de las curvas de crecimiento utilizando la ecuación de Gompertz obteniéndose los parámetros cinéticos A , μ_{\max} y λ , para cada cepa de levadura a los distintos niveles de concentración de polvo. La bondad del ajuste se analizó a través del coeficiente de determinación (R^2). Se realizó un ANOVA para analizar el efecto de la

concentración de polvo sobre los parámetros cinéticos, utilizando el test de Fisher (*F*-value) para evaluar su significancia, y el test de Tukey para distinguir diferencias entre medias (ambos con $\alpha = 0,05$).

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Polvo de maqui como ingrediente funcional: niveles de compuestos bioactivos y bioaccesibilidad

Como fuera determinado en el Capítulo 4, el polvo de maqui óptimo obtenido presentó niveles de compuestos bioactivos muy elevados: PT = 4365 ± 57 mg GAE / 100 g, ACY = 1573 ± 68 mg cy-3-glu / 100 g, y CA = 2054 ± 41 mg GAE / 100 g. Con el objetivo de evaluar su potencialidad para ser utilizado como un ingrediente funcional, incorporándolo a distintos alimentos (por ejemplo, yogures, postres, mix de cereales, mix de frutas, etc.) simplemente adicionándolo en el momento de consumo, se comparan niveles de bioactivos en distintos productos e ingestas diarias en diversas dietas y la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos del polvo de maqui frente a la bioaccesibilidad de otros productos alimenticios.

En términos de los niveles de PT y ACY, si se compara el polvo con el fruto de maqui correspondiente (ver [sección 2.3.2.1](#)), puede observarse que luego de los procesos de extracción acuosa y secado por atomización se obtuvo un producto marcadamente más concentrado en compuestos fenólicos. En efecto, el polvo presentó contenidos de PT y ACY aproximadamente 3,4 y 1,7 veces mayores que los presentes en el fruto, respectivamente. Por otro lado, en la [Tabla 6.1](#) pueden observarse resultados reportados en la literatura científica correspondientes a distintos productos con alto contenido de compuestos bioactivos, junto con resultados correspondientes a tres productos comerciales de maqui analizados en el marco del presente trabajo. Al realizar la comparación se pudo verificar que el polvo de maqui óptimo se destacó por sobre todos los productos, con la excepción del maqui triturado liofilizado. Si bien el polvo óptimo supera al producto liofilizado en PT, no ocurre lo mismo en cuanto a ACY en algunos productos comerciales. Probablemente la liofilización ha sido en este caso muy efectiva en cuanto a la protección de estos compuestos debido a la baja temperatura del proceso aplicado.

Tabla 6.1. Productos con altos niveles de compuestos bioactivos.

Productos	Bioactivos / Observaciones	Referencia
Maqui secado por optimización (polvo óptimo)	PT = 4365 ± 57 mg GAE / 100 g ACY = 1573 ± 68 mg cy-3-glu / 100 g CA = 2054 ± 41 mg GAE / 100 g	Esta Tesis
Maqui liofilizado triturado	PT en el rango 2904 - 4188 mg GAE/100g. ACY en el rango 1325 - 2446 mg cy-3-glu/100g. Sugieren consumir 2 g/d de producto, siendo de esta manera el aporte de 58,08 – 83,76 mg/d y 26,5 – 48,92 mg/d, de polifenoles y antocianinas respectivamente.	Tres productos comerciales disponibles en el mercado (Chile): “Terra Verde”, “Nanuva Ingredients” y “Native for Life”. Determinación de bioactivos realizada en nuestro laboratorio.
Polvos secados por atomización		
Maqui	ACY en el rango 280-590 mg cy-3-glu/100g.	Fredes et al. (2018)
Cassis	ACY= 63 mg cy-3-glu/100g PT =117 mg GAE/100g.	Archaina et al. (2017)
Sauco	ACY= 250 mg cy-3-glu/100g PT =450 mg GAE/100g.	Gagneten et al. (2019)
Zarzamora	ACY= 70 mg cy-3-glu/100g PT =340 mg GAE/100g.	Franceschinis et al. (2014)
Jugos		
Arándanos	PT en el rango 963 - 1981 mg GAE/l	Granato et al. (2015)
Arándanos rojos	PT en el rango 963 - 1981 mg GAE/l	Granato et al. (2015)
Sauco	PT en el rango 963 - 1981 mg GAE/l	Granato et al. (2015)
Naranja	PT = 755 mg GAE/kg	Sette et al. (2017)
Bebidas alcohólicas		
Cerveza	PT = 310 mg GAE/kg	Sette et al. (2017)
Vino tinto	Un vaso aproximadamente 100 mg de polifenoles Un vaso entre 20 -25 mg de antocianinas.	Scalbert et al. (2005) Wu et al. (2006)
Otros		
Aceite de oliva	Contenido de polifenoles en el orden de 150 mg/kg. Tirosoles (3 %), hidroxitirosoles (7 %), y oleuropeína (42 %).	Marrugat et al. (2004)

En la [Tabla 6.2](#) se presentan niveles de ingesta diaria en poblaciones de países con elevado consumo de polifenoles. Puede observarse por ejemplo que la dieta mediterránea posee una elevada ingesta diaria de polifenoles (820 ± 323 mg/d), cuyo aporte principal lo dan las frutas (44 %), siendo importantes también los porcentajes aportados por los olivos y el aceite de oliva (11 %) y el vino tinto (6 %). Estos porcentajes podrían ser cubiertos aproximadamente con 8 g, 2 g y 1 g de polvo óptimo de maqui, respectivamente. En cuanto a ACY, puede observarse que entre 2 g y 3 g de polvo cubrirían el 100 % de la ingesta diaria promedio de antocianinas de los países de alto consumo en productos ricos en estos compuestos, como España, Italia y Francia.

Tabla 6.2. Ingesta diaria de polifenoles y antocianinas en poblaciones de distintos países.

Dietas / Países	Bioactivos	Referencia
Dieta mediterránea	Polifenoles = 820 ± 323 mg/d. Conformados por: - Frutas (44 %) - Vegetales (13 %) - Olivas y aceite de oliva (11 %) - Café (11 %) - Vino tinto (6 %) - Otros (15 %)	Tresserra-Rimbau et al. (2012)
España	Antocianinas: 19–26 mg/d (M), 36–47 mg/d (V)	Zamora-Ros et al. (2011)
Italia	Antocianinas: 28–44 mg/d (M), 44– 64 mg/d (V)	Zamora-Ros et al. (2011)
Francia	Antocianinas: 32– 41 mg/d (M)	Zamora-Ros et al. (2011)
Holanda	Antocianinas: 23– 25 mg/d (M), 20 mg/d (V)	Zamora-Ros et al. (2011)
Suecia	Antocianinas: 20–22 mg/d (M), 20– 21 mg/d (V)	Zamora-Ros et al. (2011)
Estados Unidos	Antocianinas: 12,5 mg/d	Wu et al. (2006)

Varón (V) y mujer (M)

Por otro lado, se analizó la bioaccesibilidad de los polvos obtenidos. De acuerdo con Minekus et al. (2014), se considera que la fracción soluble obtenida luego del proceso de digestión *in vitro* contiene todos los compuestos que han resistido las etapas oral, gástrica e intestinal, encontrándose bioaccesibles para ser absorbidos por las células intestinales. En el presente trabajo la determinación de la bioaccesibilidad de PT y CA del polvo óptimo dio como resultado: 63 ± 8 % y 71 ± 5 %, respectivamente. En la Tabla 6.3 se comparan los resultados obtenidos por otros autores para distintos productos alimenticios con el obtenido en el polvo de maqui. Se puede observar que los valores alcanzados en el polvo del presente trabajo superan la bioaccesibilidad que presentan otros alimentos, llegando incluso a casi triplicar los valores obtenidos por Lucas-Gonzales et al. (2016) con el fruto de maqui. Por lo tanto, el polvo óptimo obtenido no sólo presenta una concentración particularmente elevada de compuestos bioactivos, sino que además permite una elevada recuperación de los mismos luego del proceso de digestión *in vitro*.

Tabla 6.3. Bioaccesibilidad de compuestos bioactivos presentes en distintos productos alimenticios.

Muestra	Bioaccesibilidad (%)	Observaciones	Referencia
Cereales	39 (PT)	Estudio sobre consumo de polifenoles en dieta española.	Saura-Calixto et al. (2007)
Vegetales	26 (PT)		
Frutos secos	25 (PT)		
Frutas	41 (PT)		
Legumbres	57 (PT)		
Sedimentos de uva “Isabel”	14 (PT) 68-95 (CA)	Estudio sobre sedimentos de jugo de uva <i>V. labrusca</i> L. Variedades “Isabel” y “Bordo”.	da Silva Hass et al. (2019)
Sedimentos de uva “Bordo”	55(PT) 65-84 (CA)		
Manzanas	49 (PT)	Cuatro variedades de manzana (dos variedades rojas y dos verdes). Se informa el promedio de las cuatro variedades.	Bouayed et al. (2012)
Fruto de zarzamora	7 (PT)	Frutos de zarzamora	Van de Velde (2018)
Grosellas	18-20 (PT)	Frutos de <i>Ribes magellanicum</i> y <i>Ribes punctatum</i>	Burgos-Edwards et al. (2017)
Fruto de maqui	22 (PT) 16-26 (CA)	Fruto de maqui liofilizado, molido y tamizado para la separación de las semillas.	Lucas-Gonzalez et al. (2016)
Polvo de maqui óptimo	63 (PT) 71 (CA)	Polvo de maqui secado por atomización	Esta Tesis

6.3.2. Elaboración de un nutracéutico en la forma de comprimido

A partir del polvo de maqui óptimo, sin el agregado de ningún excipiente adicional, se obtuvieron comprimidos de 1000 mg (Figura 6.6). Teniendo en cuenta las concentraciones de PT y ACY del polvo, cada comprimido de 1000 mg tendría aproximadamente 44 mg de polifenoles totales y 16 mg de antocianinas monoméricas. Por lo tanto, el consumo de dos comprimidos diarios (consumo oral típico) de 1000 mg suministraría cantidades relevantes de compuestos bioactivos (ver sección precedente).



Figura 6.6. Comprimidos obtenidos a partir del polvo de maqui.

La Farmacopea de los Estados Unidos establece que el tiempo de desintegración de un comprimido oral debe ser menor a 60 min. Los comprimidos de maqui cumplieron con este requisito mostrando una desintegración rápida en aproximadamente 14 minutos, usando sólo el polvo producido por secado por atomización (es decir, sin emplear ningún otro excipiente para mejorar la desintegración). La desintegración relativamente rápida de los compactos de maqui podría estar relacionada con la alta solubilidad acuosa de los compuestos de maqui.

La [Figura 6.7](#) presenta el perfil de liberación de ACY en función del tiempo. Se verificó una rápida liberación de ACY superando el 50 % en los primeros 10 min, mientras que después de 45 minutos se encontró una liberación de alrededor del 83%. Las características del perfil de disolución de los comprimidos dependen de un gran número de factores: tipo y concentración de excipiente agregado (o combinación de ellos), fuerza de compresión para la elaboración del comprimido, tipo de equipamiento utilizado para su manufactura, entre otros ([Mehtani et al., 2018](#)). No obstante, el nivel de liberación máximo obtenido en el presente trabajo mostró correspondencia con los valores máximos de liberación encontrados para otras fitomedicinas. Por ejemplo, [Souza et al. \(2007\)](#) trabajando con polvo de *Phyllanthus niruri* (obtenido mediante secado por atomización utilizando SiO₂ como adyuvante de secado), elaboraron comprimidos por compresión directa y evaluaron sus perfiles de disolución. Utilizaron distintas fuerzas de compresión y diferentes concentraciones del excipiente Eudragit E100, obteniendo niveles de liberación máxima entre 85 y 95 %. Por otro lado, [Gallo et al. \(2013\)](#) analizaron los perfiles de disolución de comprimidos elaborados con polvo de *Rhamnus purshiana* (también obtenido mediante secado por atomización utilizando SiO₂ como adyuvante de secado). Ensayaron cinco formulaciones combinando distintos excipientes convencionales de la industria farmacéutica (desintegrantes, súper

desintegrantes, lubricantes, etc.). Reportaron niveles máximos de liberación en torno a 85-95 %, junto con elevadas velocidades de liberación (entre 30 y 42 % a los 5 minutos, para las formulaciones sin desintegrantes o súper desintegrantes, y en el orden de 86-87 % para los casos que sí poseían dichos excipientes). Por lo tanto, es posible concluir que el comprimido elaborado en el presente trabajo presentó un comportamiento satisfactorio para una formulación de liberación inmediata.

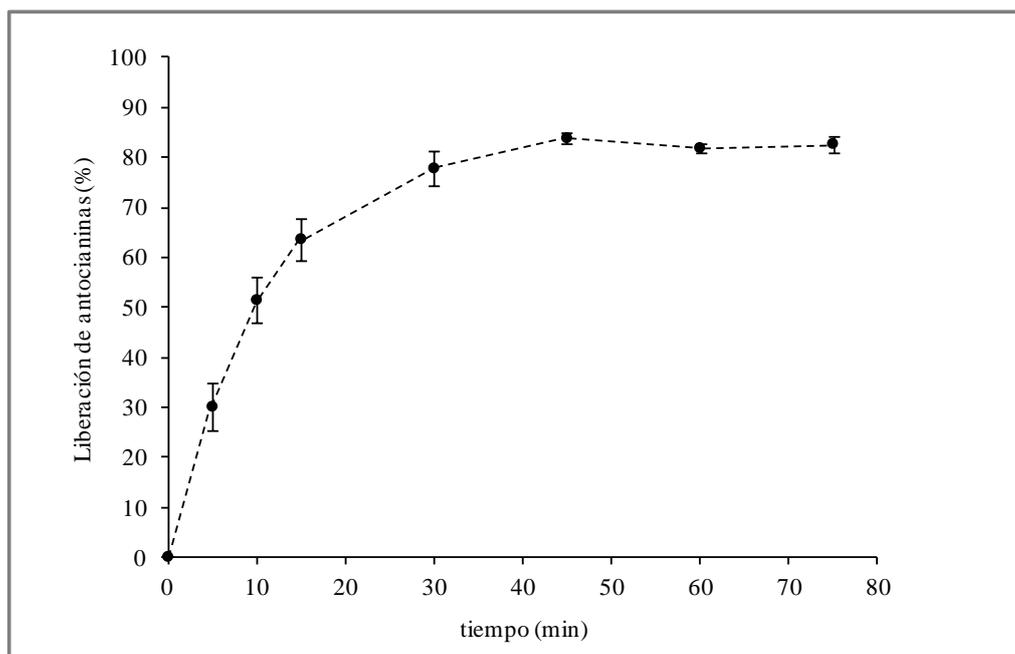


Figura 6.7. Perfil de disolución de ACY a partir de comprimidos de maqui.

6.3.3. Uso como colorante natural y agente antimicrobiano en sidra

6.3.3.1 Análisis de compuestos bioactivos y color

La [Figura 6.8](#) muestra las distintas sidras obtenidas luego del agregado de polvo de maqui en las distintas concentraciones. La [Tabla 6.4](#) resume los resultados obtenidos en la determinación de compuestos bioactivos. Como era de esperar, se observó un aumento en las concentraciones de polifenoles y antocianinas proporcional al incremento de la cantidad de polvo agregada a la sidra. Los resultados variaron desde $273,9 \pm 2,3$ hasta $389,9 \pm 2,0$ mg GAE / 1000 ml para PT, y desde $30,4 \pm 1,6$ hasta $152,1 \pm 1,3$ mg cy-3-glu / 1000 ml para ACY. Esto representó un enriquecimiento en compuestos bioactivos, en especial de antocianinas, dado que la sidra control poseía $241,8 \pm 2,3$ mg GAE / 1000 ml (PT)

y una concentración nula de antocianinas monoméricas. Con respecto a %CP no se observaron variaciones importantes, manteniéndose sin diferencias significativas a partir de una concentración de 600 mg/100 ml (muestra SP₆₀₀). Ello implica que el agregado de polvo no produjo variaciones importantes en el porcentaje de antocianinas polimerizadas y de compuestos pardos.



Figura 6.8. Copas con las muestras de sidra combinada con polvo de maqui: a) SC, b) SP₂₀₀, c) SP₄₀₀, d) SP₆₀₀, e) SP₈₀₀ y f) SP₁₀₀₀.

Tabla 6.4. Resultados de la determinación de compuestos bioactivos y pH.

Muestra	ACY (mg cy-3glu / 1000 ml)	PT (mg GAE / 1000 ml)	% CP (%)	pH
SC	0	241,8 ± 2,3	---	3,55 ± 0,01
SP ₂₀₀	30,4 ± 1,6	273,9 ± 2,3	59,7 ± 0,5	3,54 ± 0,01
SP ₄₀₀	62,3 ± 3,1	300,3 ± 1,6	55,7 ± 1,0	3,56 ± 0,01
SP ₆₀₀	93,4 ± 2,4	331,7 ± 1,9	48,8 ± 2,5	3,54 ± 0,01
SP ₈₀₀	123,2 ± 2,8	358,8 ± 1,8	49,6 ± 0,8	3,55 ± 0,01
SP ₁₀₀₀	152,1 ± 1,3	389,9 ± 2,0	47,6 ± 1,8	3,56 ± 0,01

Cabe señalar que, de acuerdo a la información bibliográfica sobre perfil de polifenoles de sidras, estos compuestos pertenecen a subgrupos diferentes respecto a los compuestos fenólicos presentes en el fruto de maqui. Por ejemplo, [Laaksonen et al., \(2017\)](#) trabajaron con cuatro cultivares de manzana distintos del sur de Estonia, determinando como grupos de polifenoles predominantes los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides (subgrupos flavan-3-ol, proantocianidinas, flavonoles y dihidrochalconas). En dicho trabajo señalan que, en general, cada variedad de manzana posee su propio perfil específico de polifenoles, el cual además puede depender de variables climáticas y de las condiciones de cultivo y almacenamiento. Sin embargo, existe una gran similitud en cuanto a los grupos de polifenoles predominantes, lo que puede verificarse al comparar con los resultados obtenidos por [Zuriarrain et al. \(2015\)](#) y [Ye et al. \(2014\)](#), quienes analizaron sidras elaboradas con cinco variedades de manzanas procedentes del País Vasco (España) y una variedad de China, respectivamente. Como ya se ha comentado en el Capítulo 2 en el maqui los polifenoles predominantes son las antocianinas (principalmente glucósidos de delphinidina y cianidina), mientras que los ácidos hidroxicinámicos y los flavan-3-oles en general no se detectan o se encuentran en muy baja concentración.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el enriquecimiento en compuestos bioactivos respecto a la muestra SC resultó relevante si se compara con otras bebidas con aporte del mismo tipo de compuestos. En particular si se compara con el vino tinto (una bebida reconocida por su aporte en compuestos fenólicos, pero con el doble de concentración alcohólica), los resultados resultan promisorios. Un vaso de vino tinto posee entre 20-25 mg de antocianinas ([Wu et al., 2006](#)) y aproximadamente 100 mg de polifenoles totales ([Scalbert et al., 2005](#)). Por lo tanto, se lograría un aporte similar de ACY a partir del consumo de un vaso de sidra enriquecida SP₆₀₀, y se cubriría un 78 % de PT mediante la sidra enriquecida SP₁₀₀₀.

En cuanto al color de las distintas bebidas obtenidas, la **Figura 6.9** presenta los parámetros cromáticos correspondientes. Inicialmente la sidra control mostró su color amarillo característico ($L^* = 97,64 \pm 0,16$, $C^*_{ab} = 6,52 \pm 0,22$, $h_{ab} = 106,48 \pm 0,34$ °), y luego se observaron tonalidades diferentes en las distintas sidras enriquecidas variando desde un color rosado ($L^* = 80,18 \pm 1,03$, $C^*_{ab} = 10,37 \pm 0,87$, $h_{ab} = 61,44 \pm 0,15$ °), acercándose progresivamente hacia tonalidades propias de los frutos rojos al incrementar la concentración de polvo ($L^* = 36,47 \pm 0,34$, $C^*_{ab} = 26,22 \pm 0,42$, $h_{ab} = 28,34 \pm 0,25$ °).

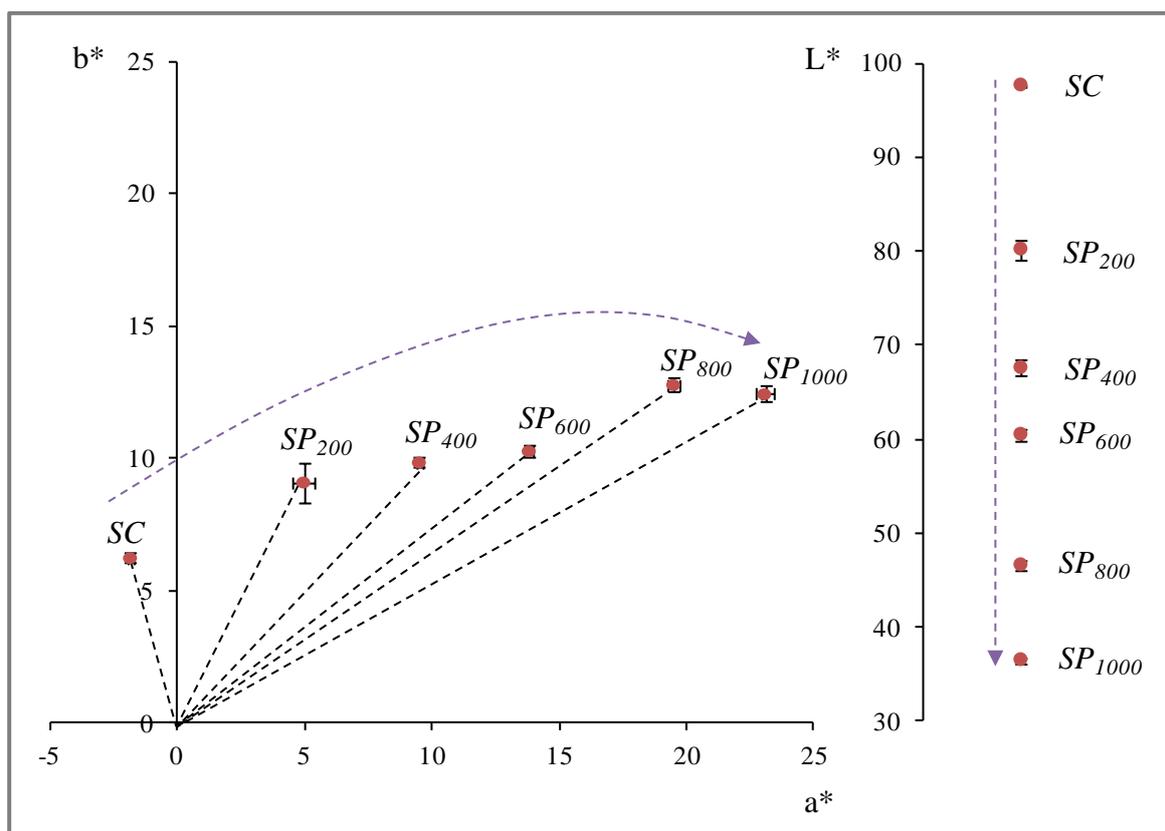


Figura 6.9. Parámetros cromáticos de las muestras de sidra combinada con polvo de maqui.

Las flechas punteadas indican el desplazamiento del ángulo de tono y la luminosidad al incrementar la concentración de polvo de maqui.

Como fuera analizado anteriormente, el incremento en la concentración de polvo aumentó de manera proporcional la variable ACY. A su vez, el pH de las muestras siempre se ubicó en torno a $pH = 3,5$, siendo predominante a este pH la estructura de catión flavilio de las antocianinas monoméricas. Por lo tanto, el incremento de ACY fue acompañado por un desplazamiento del ángulo de tono hacia el rojo, en simultáneo con un incremento en la saturación y una disminución en la luminosidad, generando así los colores observados.

6.3.3.2. Estudio de aceptabilidad del color de las bebidas formuladas

Respecto al estudio de aceptabilidad del color del producto, en la [Figura 6.10](#) se presenta información genérica sobre la encuesta realizada. La encuesta fue respondida por 123 personas, de las cuales el 73 % fueron mujeres. La franja etaria mayoritaria estuvo comprendida entre los 20-29 años (39%), totalizando los menores de 40 años el 71 % de los encuestados.

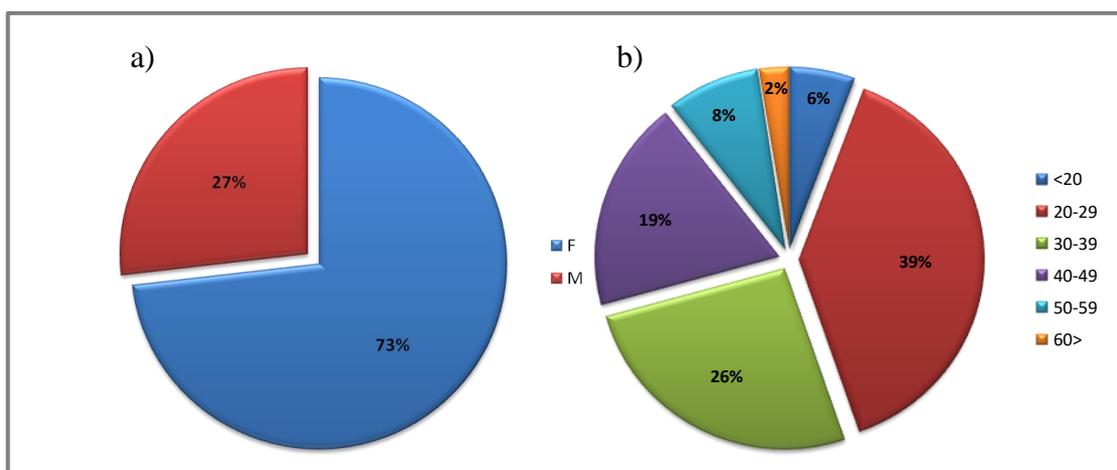


Figura 6.10. Información genérica de la encuesta: a) géneros femenino (F) y masculino (M), b) edades (agrupadas por décadas).

En la [Figura 6.11](#) se presentan los histogramas correspondientes a las distribuciones de frecuencias relativas porcentuales obtenidas al consultar por la preferencia de cada bebida, junto con las respectivas curvas de frecuencia relativa porcentual acumulada. En la [Tabla 6.5](#) se muestra la aceptabilidad del color promedio y la distribución de los puntajes de las diferentes bebidas en cuatro subgrupos de la escala hedónica de 9 puntos correspondientes a “disgusta mucho”, “disgusta”, “gusta” y “gusta mucho”.

Las muestras SP₄₀₀ y SP₆₀₀ fueron las que tuvieron mayor aceptabilidad por parte de los consumidores en cuanto al color. Las medias de sus puntuaciones superaron los 6 puntos, el cual es considerado como límite inferior en una escala hedónica de 9 puntos para que pueda pensarse en un prototipo con lanzamiento al mercado ([Ares, 2011](#)). Además, acumularon en el orden de un 70 % de las puntuaciones en los subgrupos “gusta” + “gusta mucho”. Por el contrario, la muestra SP₂₀₀ mostró el peor desempeño. Su puntuación promedio fue la más baja (4,74), y sumó un 61,8 % de puntuaciones en los subgrupos “disgusta mucho” +

“disgusta”. Para el caso de la muestra SP₁₀₀₀ los resultados fueron regulares. Acumuló un 58 % de aceptación y un 42 % de rechazo, obteniendo una puntuación media de 5,85.

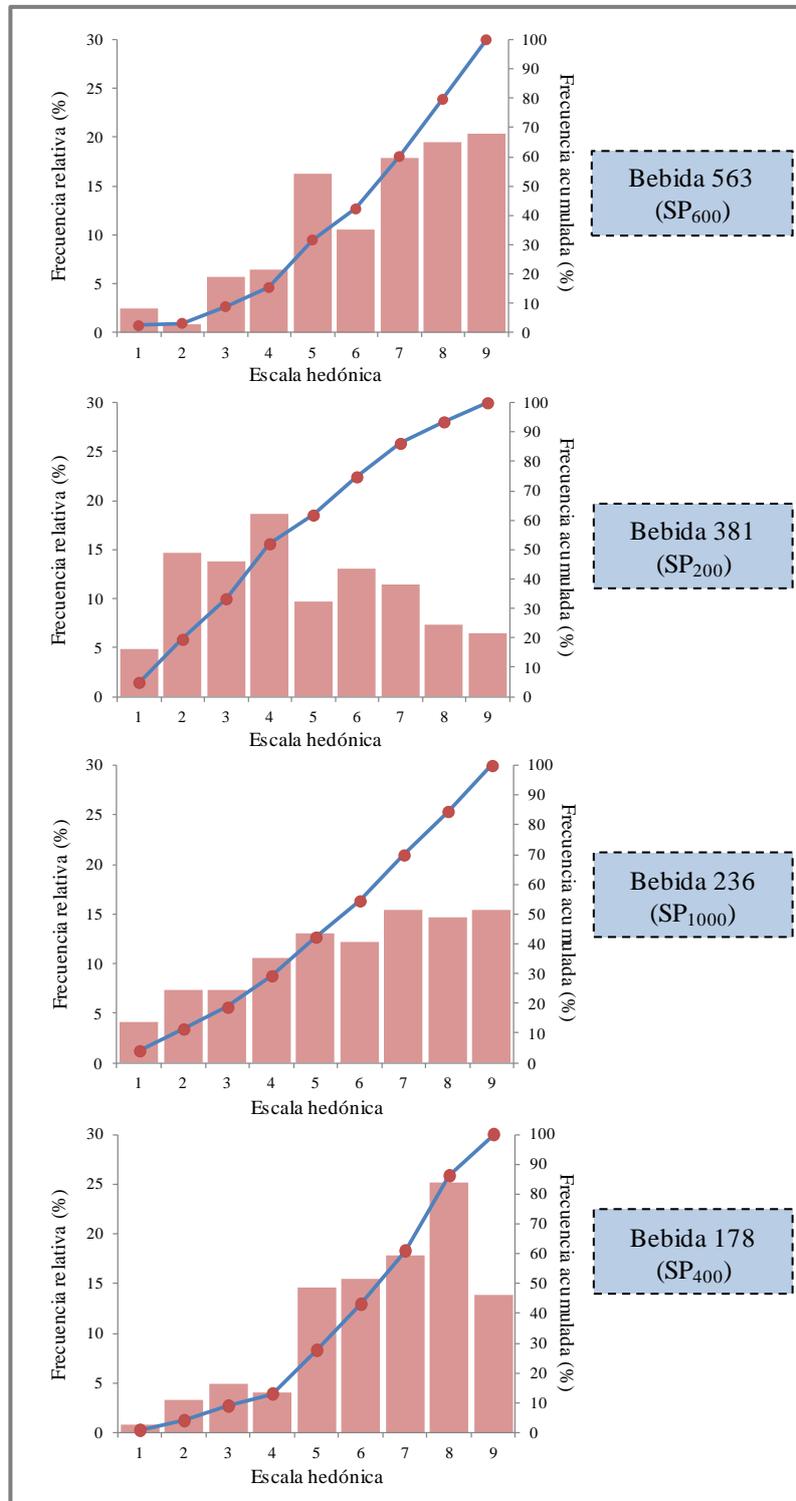


Figura 6.11. Aceptabilidad del color de cada bebida: las barras representan la frecuencia relativa porcentual para cada puntuación (se lee en el eje izquierdo), y la curva con puntos corresponde a la frecuencia relativa porcentual acumulada (se lee en el eje derecho).

Tabla 6.5. Aceptabilidad del color de las bebidas formuladas: puntaje promedio y porcentajes en cada subgrupo de la escala hedónica.

Código	Muestra	% disgusta mucho (1-3)	% disgusta (4-5)	% gusta (6-7)	% gusta mucho (8-9)	puntuación promedio
381	SP ₂₀₀	33	29	24	14	4,74 ^c
178	SP ₄₀₀	9	19	33	39	6,55 ^{ab}
563	SP ₆₀₀	9	23	28	40	6,56 ^a
236	SP ₁₀₀₀	19	23	28	30	5,85 ^b

Promedios con el mismo superíndice no difieren de manera significativa ($p < 0,05$)

En cuanto a las opiniones recogidas, se pudo observar que las puntuaciones anteriores se vincularon con una sensación de color más equilibrada y relacionada a los frutos rojos para las muestras SP₄₀₀ y SP₆₀₀, mientras que los colores de las muestras SP₂₀₀ y SP₁₀₀₀ generaron impresiones más extremas (muy diluida en el primer caso, y demasiado intensa en el segundo).

Al consultar por la preferencia comparativa entre las bebidas, se obtuvieron los siguientes resultados (ver [Figura 6.12](#)):

- La elección previa a la presentación de información adicional sobre el maqui, es decir, basada solamente en la impresión sensorial de las imágenes de las bebidas, dio como resultado una muy alta intención de compra (94%) donde las Bebidas 563 (SP₆₀₀) y 178 (SP₄₀₀) fueron las más elegidas con un 32 % y 31 %, respectivamente.
- Al resaltar la información de los beneficios del maqui y volver a realizar la consulta, el 31 % de los consultados cambió su elección. Se incrementó la preferencia por la Bebida 236 (SP₁₀₀₀) hasta un 38 %, se mantuvo la preferencia de la Bebida 563 (33 %), y disminuyeron los porcentajes correspondientes a las Bebidas 178 (23 %) y 381 (6 %). Esto estaría indicando la existencia entre los consumidores de un posible nicho de mercado más pequeño que estaría dispuesto a comprar la bebida debido a los beneficios del maqui y tal vez pagar precios diferenciales por el producto, lo cual ameritaría estudiar colocar un claim en la etiqueta con los beneficios para la salud.
- El 70 % de los consumidores no cambió su elección al contar con la información sobre los beneficios de la salud del maqui. Por lo tanto, prevaleció el aspecto sensorial en la elección del producto y en la intención de compra.

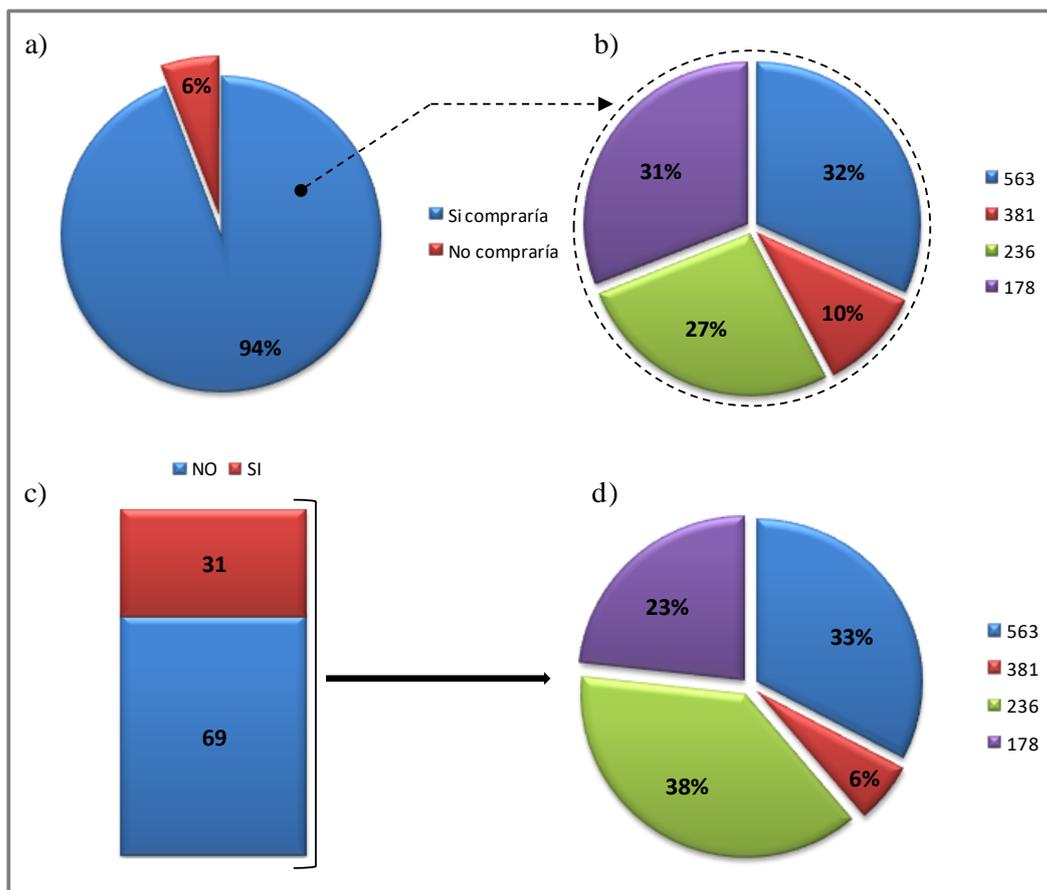


Figura 6.12. Resultados sobre las preferencias de las bebidas: a) consulta sobre la intención de compra del producto, b) consulta sobre la preferencia del color de la bebida, c) consulta respecto al cambio de elección una vez informado beneficios sobre la salud del consumo de maqui, y d) consulta sobre nueva elección de bebida.

Teniendo en cuenta todos los resultados de aceptabilidad del color de todos los prototipos, es posible considerar a la Bebida 563 (SP₆₀₀) como la mejor opción para su lanzamiento al mercado, previa evaluación sensorial del producto para evaluar la aceptabilidad global.

Por otro lado, del análisis de las preguntas abiertas surgen los direccionamientos de por qué les gustó el color de la Bebida 563 (SP₆₀₀). El 53% de las respuestas estuvieron asociadas a características propias del color, siendo las categorías representativas el tono (17%), el rojo intenso (16%) y el color atractivo (10,5%), donde se resaltó el gusto por lo “oscuro” del color (9,5%) como atributo positivo. Otras características asociadas más a la apariencia y no propias del color se incluyeron en la categoría “buen aspecto” (8,6 %). Por otro lado, el 38% de las respuestas podrían agruparse en la dimensión de “asociación de la bebida con otros productos”, siendo la categoría con mayor porcentaje de mención el “vino”

(19%), seguidas por las categorías “frutos rojos” (9,5%) y “bebida rica” (9,5%). Asimismo se pudo observar las características expresadas por los consumidores respecto a por qué no les gustó el color de la Bebida 381 (bebida con peor performance). Las categorías representativas del color fueron “diluido” (18%), que la bebida les recordaba a “otras bebidas que me desagradan” (17%), que se observó “turbio” (15%), “marrón” (11%), con “poco maqui” (10%), que parecía un “vino aguado” (10%), que era “un color que no gusta” (10%). Cabe resaltar que hubo un 15% de respuestas que argumentaron que no había nada que les disguste del color de dicha bebida.

6.3.3.3. Actividad antimicrobiana del polvo de maqui

Durante los últimos años, se han detectado y caracterizado diferentes levaduras contaminantes a partir de bebidas fermentadas en la Norpatagonia, entre las que se encuentran las especies *M. guilliermondii* y *P. membranifaciens* (Sáez et al., 2011; Sangorrín et al., 2013). Las levaduras de la especie *P. membranifaciens* son capaces de crecer en la superficie de las bebidas formando películas y de producir elevadas concentraciones de ácido acético, acetaldehído y/o fenoles volátiles (vinil y etil fenoles), todos compuestos indeseables en estos productos (Stratford, 2006; Sáez et al., 2011). El desarrollo de *M. guilliermondii* en bebidas fermentadas también ha sido asociado a la producción de fenoles volátiles, sobre todo vinilfenoles (Barata et al., 2006; Martorell et al., 2006). Estos compuestos fenólicos otorgan a las bebidas aromas conocidos como “animal”, “sudor de caballo”, “establo” o “medicinal”, por lo que su concentración en las bebidas debe ser controlada (Chatonnet et al., 1992).

Por otra parte, en el caso de *S. cerevisiae* (especie de levadura responsable de la fermentación), se debe lograr su eliminación una vez finalizado el proceso fermentativo ya que puede causar problemas de refermentación en botella (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Es decir, una vez finalizado el proceso fermentativo habiendo obtenido la sidra base (ver Figura 6.2), *S. cerevisiae* es tratada como una cepa contaminante, al igual que las otras dos cepas estudiadas.

En la Figura 6.13 se presentan las curvas de crecimiento correspondientes a las tres levaduras estudiadas y la Figura 6.14 sintetiza los parámetros cinéticos obtenidos (A , μ_{\max} y λ) luego del ajuste del modelo matemático descrito por la Ecuación 6.3.

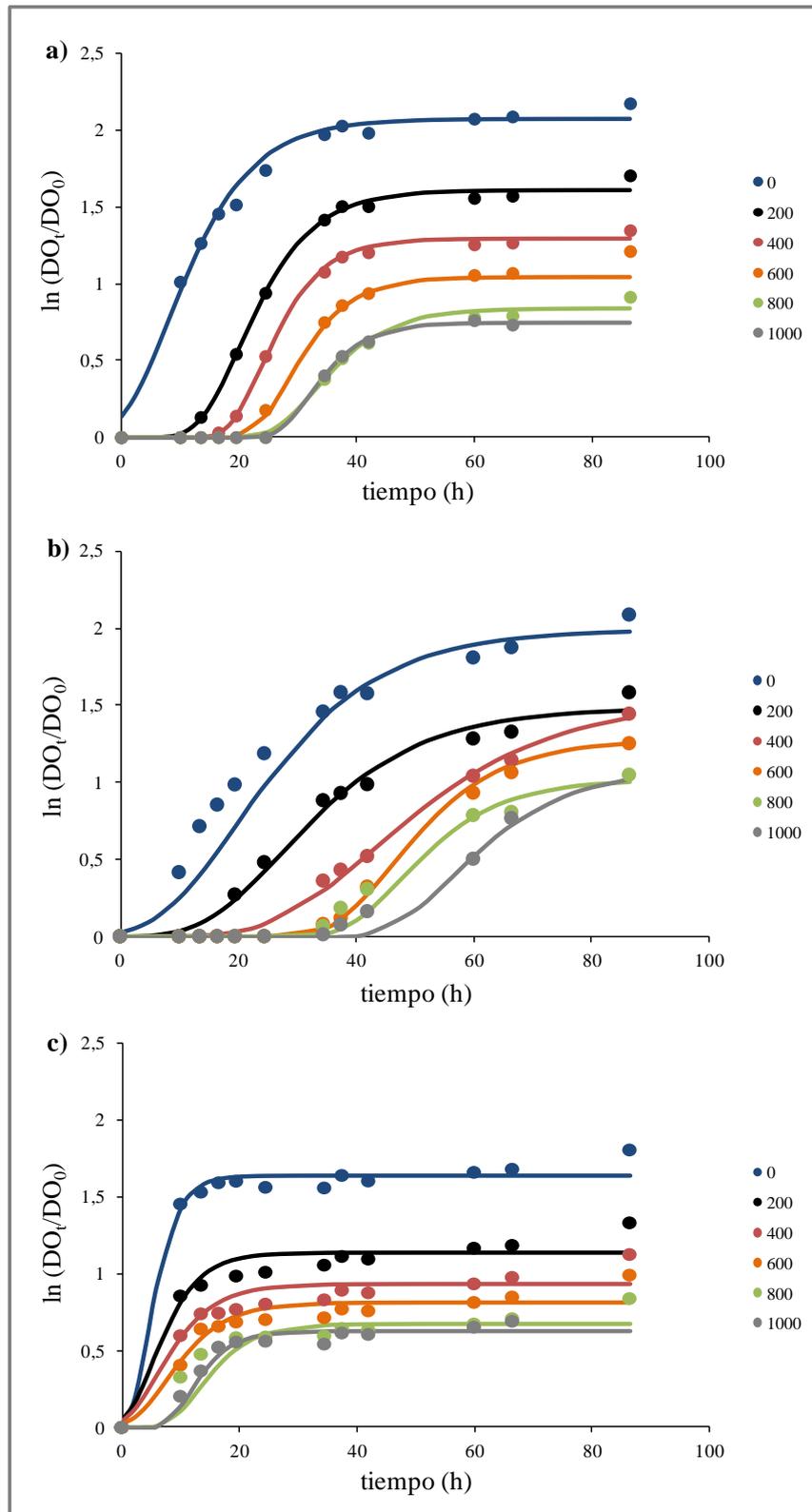


Figura 6.13. Cinética de crecimiento de las levaduras a distintas concentraciones de polvo de maqui: a) *M. guilliermondii*, b) *P. membranifaciens*, y c) *S. cerevisiae*. Las líneas continuas representan los modelados utilizando la ecuación de Gompertz modificada, y los puntos a los resultados experimentales.

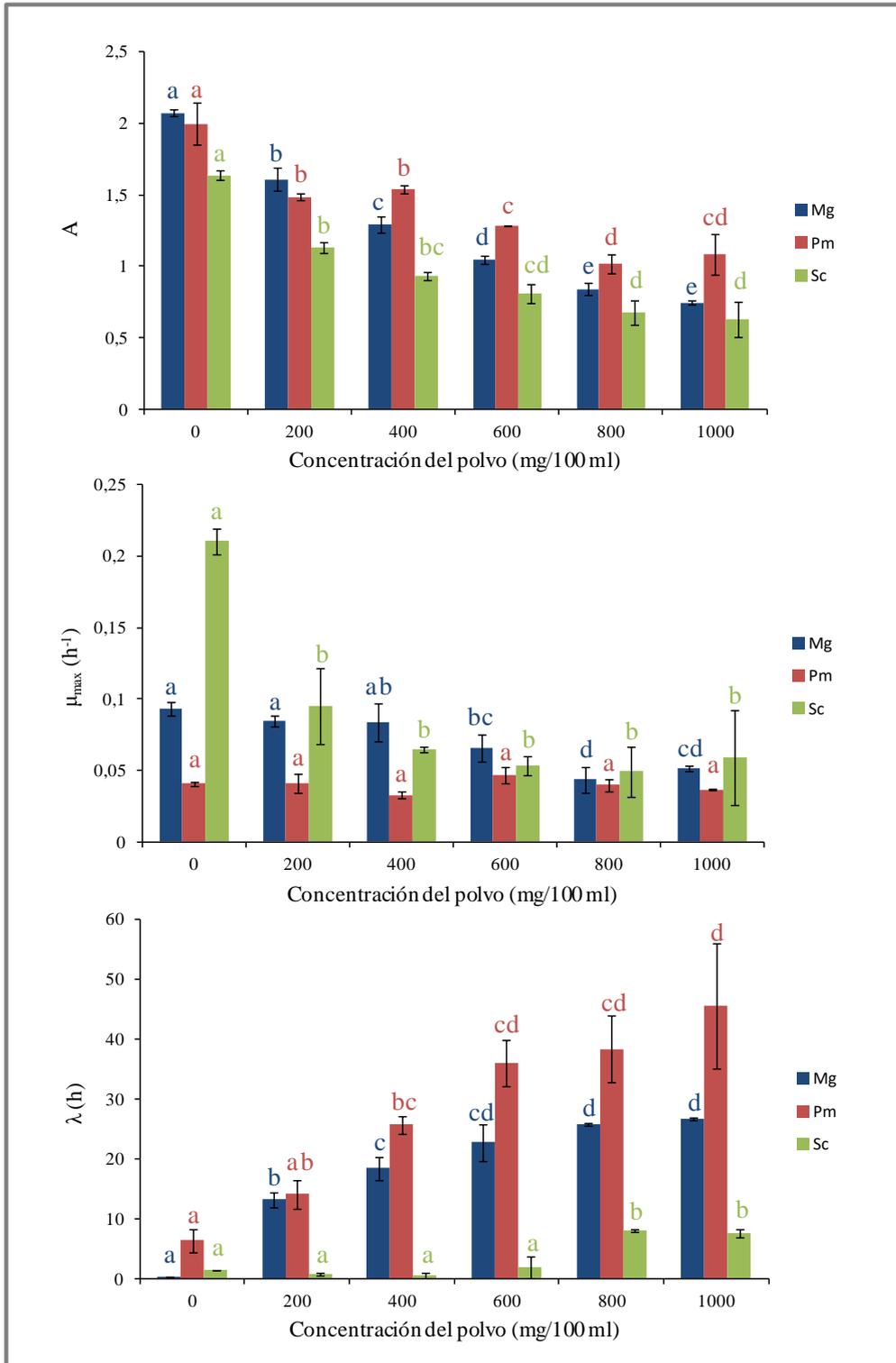


Figura 6.14. Efecto de la concentración del polvo de maqui sobre los parámetros cinéticos de las levaduras: *M. guilliermondii* (Mg), *P. membranifaciens* (Pm) y *S. cerevisiae* (Sc). Para cada levadura, diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

Para las dos levaduras contaminantes *M. guilliermondii* y *P. membranifaciens* el incremento de la concentración de polvo incidió de manera significativa tanto en A (F-value = 194,2 y F-value = 47,1 para cada cepa respectivamente) como en λ (F-value = 113,3 y F-value = 29,1, respectivamente). Adicionalmente, en el caso de *M. guilliermondii*, el agregado de polvo causó un efecto significativo sobre el parámetro μ_{\max} (F-value = 18,5).

En *M. guilliermondii* fue significativo el aumento en la fase lag a bajas concentraciones (se incrementó en dos órdenes de magnitud), manteniéndose luego a un mismo nivel a partir de una concentración de polvo de 600 mg/100 ml. Se observó una disminución importante en el parámetro A al aumentar la concentración en el intervalo 200-600 mg/100 ml, variando luego en menor medida hasta alcanzar un 64 % de reducción a la máxima concentración utilizada (1000 mg/100 ml). En cuanto a la velocidad máxima de crecimiento, el efecto fue significativo a partir de los 600 mg/100 ml, reduciéndose un 44 % cuando la concentración de polvo fue máxima.

La levadura *P. membranifaciens* presentó un comportamiento diferente; se produjo un mayor incremento de λ a altas concentraciones de polvo en comparación con *M. guilliermondii* y una reducción menos marcada en el parámetro A en todo el intervalo de concentraciones, alcanzando aproximadamente un 50 % a las concentraciones más altas de polvo (800-1000 mg/100 ml). Para esta levadura el agregado de polvo no causó variaciones en el parámetro μ_{\max} .

Respecto a la cepa *S. cerevisiae* el efecto del polvo de maqui sobre los parámetros cinéticos A, μ_{\max} y λ fue significativo (F-value = 54,9, F-value = 22,9 y F-value = 54,6, respectivamente). El parámetro A fue afectado en mayor medida por los primeros agregados de polvo, presentando una reducción de un 43% a una concentración de polvo de 400 mg/100 ml. Luego, al incrementar la concentración de polvo continuó disminuyendo pero de forma menos pronunciada, alcanzando un 62 % de reducción total. En cuanto a la velocidad máxima de crecimiento, se produjo un marcado descenso (55%) al pasar de cero a 200 mg/100 ml de concentración de polvo. Sin embargo, los valores medios de μ_{\max} no presentaron diferencias significativas con los posteriores incrementos de la concentración de polvo. Por último, la fase lag se vio afectada de manera significativa recién a partir de la concentración de polvo = 800 mg/100 ml, incrementando en el orden de 5 veces su valor.

De esta manera, se verificó un efecto significativo del agregado de polvo de maqui sobre los parámetros cinéticos de las tres levaduras y aunque dicho efecto no incidió de la misma manera en todos los casos, se observó en general que el incremento en la

concentración de polvo generó condiciones más adversas para el crecimiento de las levaduras y que este efecto antimicrobiano se reflejó en una fase de latencia más prolongada (fase en la cual las células tienen un metabolismo activo pero aún no se manifiesta crecimiento), en una menor densidad celular final y una disminución en la velocidad máxima correspondiente a la fase de crecimiento exponencial.

Como ya se ha comentado previamente la mayoría de los reportes de actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos han sido realizados a partir de ensayos con bacterias. Por ejemplo Côte et al. (2011) trabajando con jugos y extractos de arándanos rojos y Shen et al. (2014) con extractos de arándanos, reportaron la existencia de actividad antimicrobiana sobre bacterias patógenas relacionadas con enfermedades de transmisión alimenticia (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, entre otras). Por otro lado, Genskowsky et al. (2015 y 2016) estudiaron frutos de maqui molido y liofilizado, analizando el efecto antimicrobiano, tanto de un extracto como de un film comestible de quitosano desarrollado a partir del producto molido. En todos los casos, los ensayos fueron realizados sobre bacterias patógenas relacionadas con alimentos refrigerados, verificando actividad antimicrobiana. Dicha actividad fue atribuida a la elevada concentración de polifenoles y en particular de antocianinas, mencionando que podría deberse a la interacción de estos compuestos sobre las membranas celulares de las bacterias. Esta interacción desestabilizaría la membrana lipopolisacárida volviéndola más permeable, posibilitando así la pérdida de componentes esenciales para la célula bacteriana (por ejemplo incrementando el eflujo de ATP desde el citoplasma). En otros trabajos se ha evaluado el efecto antimicrobiano de polifenoles extraídos de arándanos sobre levaduras contaminantes de jugo de frutilla como *Hanseniaspora osmophila* y *Starmerella bacillaris*, y se determinó que los ácidos elálgico, clorogénico y p-cumárico, y los flavonoides quercetina y kaempferol, tuvieron actividad antimicrobiana sobre las levaduras (Vallejo et al., 2018). De acuerdo a lo expuesto, en el presente trabajo el efecto antimicrobiano observado sobre *P. membranifaciens*, *M. guilliermondii* y *S. cerevisiae* podría deberse a la actividad antimicrobiana de los polifenoles del maqui, cuya concentración aumenta marcadamente al aumentar el contenido de polvo en la sidra.

Finalmente, es posible concluir que los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron el efecto antimicrobiano del polvo de maqui sobre tres levaduras vinculadas al proceso de elaboración de la sidra. Este efecto permitiría analizar la posibilidad de reducir las cantidades de SO₂ a utilizar en el proceso de elaboración de este tipo de productos,

reemplazándolo en la etapa de acondicionamiento posterior a la fermentación alcohólica por polvo de maqui como antimicrobiano para las levaduras. Por lo tanto, el uso del polvo de maqui en el caldo base durante el momento de corrección del mismo (endulzado, acidificado y gasificado, posterior al proceso fermentativo), podría contribuir a otorgar estabilidad biológica al producto final (sidra), además de los aspectos ya discutidos en secciones precedentes en cuanto a las posibles variaciones de color y aporte de valor nutricional.

6.4. Conclusiones

Luego del proceso de digestión gastrointestinal del polvo reconstituido de maqui se logró una elevada recuperación de polifenoles y de capacidad antioxidante, mayor que la observada para otros productos del mercado lo que denota el gran potencial del polvo obtenido para ser utilizado como ingrediente funcional en distintos productos.

La elaboración de un nutraceutico en la forma de comprimidos obtenidos por compresión directa fue satisfactoria. El consumo de dos comprimidos diarios significaría un aporte elevado de compuestos bioactivos teniendo en cuenta la ingesta diaria en poblaciones de elevado consumo de alimentos ricos en antioxidantes. Por otro lado la desintegración y el perfil de disolución de los comprimidos fueron adecuados para una formulación de liberación inmediata. Estos resultados muestran que sería viable la elaboración de un nutraceutico a partir del polvo de maqui obtenido mediante secado por atomización, para su administración oral en forma de comprimido.

En cuanto a la aplicación en sidra, los resultados obtenidos mostraron una confluencia de tres aspectos importantes: enriquecimiento en compuestos bioactivos de la bebida obtenida, una gama de colores atractiva para distintos grupos de consumidores, y la comprobación del efecto antimicrobiano sobre levaduras indeseables en el producto, lo que permitiría evaluar la posibilidad de reducir el agregado de SO₂ como agente antimicrobiano. El estudio realizado de aceptabilidad del color y percepción del consumidor de las sidras con polvo de maqui agregado mostró un 94 % de intención de compra del producto y que las sidras con el agregado de 400 y 600 mg de polvo cada 100 ml fueron la de mejor performance con puntaje suficiente para ser consideradas un posible prototipo a lanzar al mercado. El estudio de la percepción del consumidor podría complementarse en un futuro con métodos como el análisis conjunto que integren también características no sensoriales con el objeto de

evaluar mejor envase de presentación, diseño de etiqueta, utilización o no de claim nombrando los beneficios para la salud, entre otras de interés.

Capítulo 7

Conclusiones finales

Desarrollo del ingrediente en polvo

- La caracterización del fruto de maqui permitió comprobar que se trata de una materia prima con una muy elevada concentración de compuestos bioactivos, destacándose frente a otras berries. Esto lo convierte en un fruto con gran potencial para el desarrollo de ingredientes funcionales.
- El método de extracción utilizando agua como solvente, permitió obtener extractos de maqui muy ricos en compuestos bioactivos con aplicación directa en el desarrollo de ingredientes alimenticios. De este modo el método de extracción optimizado evita el uso de solventes orgánicos y resuelve la problemática asociada a la disposición de los mismos.
- Mediante la optimización del proceso de secado por atomización se logró obtener un polvo de elevada capacidad antioxidante (muy superior a lo reportado para otros polvos de berries), y con muy buenas propiedades físicas en términos de fluidez, higroscopicidad y temperatura de transición vítrea. Además, el polvo presentó un elevado poder tintóreo.
- El estudio de vida útil acelerado realizado conjuntamente con el análisis de la isoterma de sorción y la temperatura de transición vítrea, permitió obtener información valiosa respecto a la estabilidad del polvo de maqui, posibilitando así la recomendación de pautas de almacenamiento. Se trata de un polvo muy estable tanto físicamente como desde el punto de vista de sus compuestos bioactivos, lo cual hace factible su posible

comercialización en la forma de un ingrediente deshidratado para distintas aplicaciones industriales.

- El estudio de digestión *in vitro* mostró una elevada bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos del polvo, muy superior a la reportada en bibliografía para otros alimentos ricos en compuestos antioxidantes. En síntesis, el polvo de maqui óptimo ofrece una serie de atributos que lo hacen atractivo para su uso en diferentes aplicaciones, incluyendo su uso directo como ingrediente funcional en polvo.

Desarrollo de comprimidos

- El polvo obtenido presentó buenas propiedades de flujo y una concentración de bioactivos suficientemente elevada para la producción de un nutracéutico en la forma de comprimido. El polvo de maqui demostró poseer buenas propiedades de compactabilidad sin la necesidad de agregar otros excipientes. Por otra parte, la desintegración y el perfil de disolución de los comprimidos fueron adecuados para una formulación de liberación inmediata.
- El consumo de dos comprimidos diarios suministraría cantidades relevantes de compuestos bioactivos. Permitiría cubrir entre un 70 % y un 100 % de antocianinas y un 11 % de polifenoles si se considera la ingesta diaria en países con dietas de elevado consumo de dichos bioactivos (e.g. dieta mediterránea).

Coloración, enriquecimiento y actividad antimicrobiana en sidras

- Se obtuvieron sidras con distintos grados de enriquecimiento de compuestos bioactivos y pigmentos, lográndose una amplia gama de colores asociados a frutos rojos.
- Se comprobó el efecto antimicrobiano del polvo sobre tres levaduras indeseables propias del proceso de elaboración de la sidra, lo que permitiría la reducción del agregado de SO₂ como agente antimicrobiano.

- El estudio de aceptabilidad del color y percepción del consumidor de las sidras con agregado de polvo de maqui, permitió identificar grupos de consumidores con diferentes patrones de preferencia, observándose una alta intención de compra de las bebidas formuladas. Cabe destacar que la buena performance sensorial y el nivel de bioactivos de la sidra con agregado de 600 mg de polvo cada 100 ml, la convierte en un posible prototipo a lanzar al mercado.

Conclusión final

Teniendo en cuenta el objetivo general de la presente Tesis, esto es, “agregar valor a un berry silvestre (el maqui), aprovechando sus propiedades para la elaboración de nuevos productos con aplicación en el campo de los nutraceuticos y de los alimentos funcionales”, se puede concluir que dicho objetivo fue alcanzado. En efecto, partiendo de la forma de comercialización más básica del maqui (fruto congelado) se pudo elaborar un producto intermedio/final (polvo de maqui) mediante la aplicación de distintos procesos tecnológicos. El polvo de maqui obtenido fue a su vez lo suficientemente versátil como para ser utilizado en distintas aplicaciones en el campo de los nutraceuticos y de los alimentos funcionales.

Perspectivas y desafíos futuros

A lo largo del desarrollo de la presente Tesis surgieron distintas temáticas vinculadas con el trabajo realizado que podrían constituir líneas de investigación futuras, entre ellas:

- Estudiar el escalado del proceso de secado por atomización. Esto es de suma importancia si se pretende incrementar los volúmenes de producción de polvo, pasando desde la escala de laboratorio a una escala piloto. En efecto, el cambio de escala no resulta “lineal”. Aun cuando se disponga de un método de producción optimizado a escala laboratorio, el mismo requerirá ajustes para la producción a mayor escala.
- Aprovechar el residuo del fruto de maqui generado en el proceso de extracción, revalorizándolo como un subproducto. Este residuo aún posee una concentración remanente de antioxidantes y otros componentes bioactivos (por ejemplo fibra

dietaria). Por lo tanto, es posible plantear un enfoque integral que convierta al residuo en un subproducto valioso para otras aplicaciones, y al mismo tiempo mejore la ecuación económica general del proceso.

- Complementar el estudio de la percepción del consumidor realizando una caracterización sensorial del producto dando a probar el prototipo seleccionado para conocer la aceptabilidad global y otras características sensoriales como: aroma, dulzor, acidez, cuerpo, etc. Además podrían utilizarse métodos como el análisis conjunto que integren también características no sensoriales con el objeto de evaluar el envase de presentación, el diseño de etiqueta, la utilización o no de claim nombrando los beneficios para la salud, entre otras de interés.

En cuanto a las aplicaciones, se podrían abordar los siguientes estudios:

- Utilización de los pigmentos antociánicos como indicadores naturales, sensores de descomposición de alimentos, o agente antimicrobiano en el área de empaquetamiento inteligente y/o activo.
- Uso del polvo desarrollado como posible ingrediente natural con propiedades antimicrobianas en otros alimentos.
- Estudio de la bioactividad de los compuestos antioxidantes de los productos digeridos (por ejemplo, polvo, comprimidos, sidras, etc.) mediante el uso de líneas celulares.

Bibliografía

- Alonso, J. (2007). *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*. Rosario, Argentina: Editorial Corpus.
- Alonso, J. (2012). Maqui (*Aristotelia chilensis*): un nutraceutico chileno de relevancia medicinal. *Revista de Farmacología de Chile*, 5, 95-100.
- Akhatou, I., & Fernández Recamales, Á. (2014). Influence of cultivar and culture system on nutritional and organoleptic quality of strawberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 866–875.
- Anttonen, M.J., & Karjalainen, R.O. (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 759–769.
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 15th ed. Virginia, USA, MD: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Archaina, D., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2018). Physical and functional properties of spray-dried powders from blackcurrant juice and extracts obtained from the waste of juice processing. *Food Science Technology International*, 24(1):78-86.
- Ares, G., Deliza, R. (2010). Studying the influence of package shape and colour on consumer expectations of milk desserts using word association and conjoint analysis. *Food Quality and Preference*, 21, 930–937.
- Ares, G., Giménez, A., Barreiro, C., Gámbaro, A. (2010). Use of an open-ended question to identify drivers of liking of milk desserts. Comparison with preference mapping techniques. *Food Quality and Preference*, 21, 286–294.
- Ares, G. (2011). *Estudio de aceptabilidad de manzanas*. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Arribillaga, D., & Zegers, M.T. (1998). Explotación Industrial del Calafate. *Revista Tierra Adentro*, 21, 18-19.
- Arroyo-López, F. N., Orlic, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 120–127.

- ASTM Standard E308-01 (2001). Standard Practices for Computing the Colors of Objects by Using the CIE System. ASTM International, West Cohnshohocken, PA.
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los Alimentos. Cuarta edición. Ed. Pearson Educación. México.
- Bakowska-Barczak, A.M., & Kolodziejczyk, P.P. (2011). Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34, 1301-1309.
- Banker, G. S., & Rhodes, C. T. (2002). Modern Pharmaceutics. Fourth edition. Ed. Marcel Dekker. New York, USA.
- Barata, A., Nobre, A., Correia, P., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2006). Growth and 4-Ethylphenol Production by the Yeast *Pichia guilliermondii* in Grape Juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57,133-138.
- Basu A, Rhone M, Lyons TJ. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*, 68(3):168-177.
- Bauer, R., Nieuwoudt, H., Bauer, F. F., Kossman, J., Koch, K. R., & Esbensen, K. H. (2008). FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical Chemistry*, 80(5), 1371–1379.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., & Escalera, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
- Bhusari, S.N., Muzaffar, K., & Kumar, P. (2014). Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technology*, 266, 354-364.
- Borowska, J., & Szajdek, A. (2003). Antioxidant activity of berry fruits and beverages. *Polish Journal of Natural Sciences*, 14, 521–528
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466–1472.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wines: a critical review. *American journal of viticulture and enology*, 52(2): 67 – 87.
- Brauch, J. E., Kroner, M., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2015). Studies into the Stability of 3-O-Glycosylated and 3,5-O-Diglycosylated Anthocyanins in Differently Purified Liquid and Dried Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) Preparations during

- Storage and Thermal Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(39), 8705–8714.
- Brauch, J. E., Buchweitz, M., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2016). Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice. *Food Chemistry*, 190, 308–316.
- Brauch, J. E., Reuter, L., Conrad, J., Vogel, H., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2017). Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ and NMR-spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 16–22.
- Brouillard, R. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. Anthocyanins As Food Colors. Academic Press, Inc. London, UK.
- Brouillard, R., & Dangle, O. (1994). Anthocyanins molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*, 51(4): 365 – 371.
- Brunauer, S.; Demming, L.; Demming, W.; Teller, E. (1940). On a theory of the Van der Waals adsorption of gases. *J. Am. Chem. Soc.*, 62: 1723-1732.
- Bureau, S., Cozzolino, D., & Clark, C. J. (2019). Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 1–14.
- Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073–1082.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389.
- Caliskan, G., & Dirim, S. N. (2016). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, 287, 208-314.
- Cardenas, C. (1998). Aspectos de la morfología floral, producción de néctar y fructificación en *Berberis darwinii* Hook., *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, y *Ungi molinae* Turcz. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Casati, C. B., Sánchez, V., Baeza, R., Magnani, N., Evelson, P., & Zamora, M. C. (2012). Relationships between colour parameters, phenolic content and sensory changes of

- processed blueberry, elderberry and blackcurrant commercial juices. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(8), 1728–1736.
- Casati, C. B., Baeza, R., & Sánchez, V. (2017). Comparison of the kinetics of monomeric anthocyanins loss and color changes in thermally treated Blackcurrant, Maqui Berry and Blueberry pulps from Argentina. *Journal of Berry Research*, 7, 85-96.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Castrejón A., Eichholz I., Rohn S., Kroh L., Huyskens-Keil S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109, 564-572.
- Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2017). Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, 237, 1139–1148.
- Castro-Puyana, M., Marina, M. L., & Plaza, M. (2017). Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 5: 31-36.
- Céspedes, C. L., El-Hafidi, M., Pavon, N., & Alarcon, J. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*, 107(2), 820–829.
- Céspedes C, Alarcón J, Ávila J, El-Hafidi M. (2010a). Anti-inflammatory, Antioedema and Gastroprotective Activities of *Aristotelia chilensis* Extracts. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9, 432-439.
- Céspedes C, Alarcón J, Ávila J, Nieto A. (2010b). Anti-inflammatory activity of *Aristotelia chilensis* Mol. (Stuntz) (Elaeocarpaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2, 127-135.
- Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., Pons M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal Science of Food Agricultural*, 60, 165-178.
- Chen, X. D. (2005). Air drying of food and biological materials - Modified Biot and Lewis number analysis. *Drying Technology*, 23(9–11), 2239–2248.
- Código Alimentario Argentino (CAA), Capítulo XIII (2018). <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>.

- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional beverages: the emerging side of functional foods. Commercial trends, research, and health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 1192-1206.
- Coria Cayupán, Y., Ochoa, M., & Nazareno, M. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126, 514-519.
- Cotabarren, I.M., Bertín, D., Razuc, M., Ramírez-Rigo, M.V., Piña, J. (2018). Modelling of the spray drying process for particle design. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 1091-1104.
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Dussault, D., Sylvain, J. F., & Lacroix, M. (2011). Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control*, 22(8), 1413–1418
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 194, 135–142.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181.
- Dai, S., Xu, B., Zhang, Z., Yu, J., Wang, F., Shi, X., & Qiao, Y. (2019). A compression behavior classification system of pharmaceutical powders for accelerating direct compression tablet formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*, 572 (11), 118742.
- Dangle, O. (1993) Quantitative description of pelargonidin chromophore-cinnamic acid residues interactions within the Phorbis anthocyanin family. In “The first international symposium on natural colorants for food, nutraceutical, beverages and confectionery. (F.J. Francis, Ed.), Amherst, Massachusetts.
- Da Silva, F.A. (2007). Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de productos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. - Aquifoliaceae (erva-mate). Porto Alegre. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
- da Silva Haas, I. C., Toaldo, I. M., Gomes, T. M., Luna, A. S., de Gois, J. S., & Bordignon-Luiz, M. T. (2019). Polyphenolic profile, macro- and microelements in bioaccessible fractions of grape juice sediment using in vitro gastrointestinal simulation. *Food Bioscience*, 27, 66–74.

- Das, Q., Islam, M. R., Marcone, M. F., Warriner, K., & Diarra, M. S. (2017). Potential of berry extracts to control foodborne pathogens. *Food Control*, 73, 650–662.
- Daza, L. D., Fujita, A., Fávoro-Trindade, C. S., Rodrigues-Ract, J. N., Granato, D., & Genovese, M. I. (2016). Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. *Food and Bioproducts Processing*, 97, 20-29.
- Degussa AG (2001). Aerosil and Silanes. Aerosil® Fumed Silica. <https://www.aerosil.com/product/aerosil/en/>, 1 octubre 2018.
- Delgado-Vargas, F.; Jimenez, A. R.; Paredes-López, D. (2000). Natural Pigments: Carotenoides, Anthocyanins and Betalains—Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3), 173–289.
- Di Battista, C. A., Constenla, D., Ramírez-Rigo, M. V., & Piña, J. (2015). The use of Arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 286, 193–201.
- Doll U., Vogel H., Ibarra G., Jeldres P., Razmilic I., San Martín J., Vizcarra G., Muñoz M., Sáenz M., Donoso M. (1999). Estudio de domesticación de especies nativas ornamentales de potencial uso industrial. p. 5-25. En: Seminario domesticación de diferentes especies nativas ornamentales y medicinales. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Talca, Chile.
- Donoso C. (2006). Las especies de los bosques templados de Chile y Argentina, Autoecología. Ed. Marisa Cuneo ediciones.
- Downey M., Harvey J., Robinson S. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 55-73.
- Ephrem, E., Najjar, A., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2018). Encapsulation of natural active compounds, enzymes, and probiotics for fruit juice fortification, preservation, and processing: An overview. *Journal of Functional Foods*, 48, 65–84.
- Escribano-Bailón, M. T., Alcalde-Eon, C., Muñoz, O., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2006). Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochemical Analysis*, 17(1), 8–14.
- Estevinho, B. N., Carlan, I., Blaga, A., & Rocha, F. (2016). Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. *Powder Technology*, 289, 71–78.

- Evonik (2019). Technical Overview AEROSIL® - Fumed silica. <https://www.aerosil.com/product/aerosil/en/>, 1 diciembre 2019.
- Fairweather-Tait, S. J. (1993). Bioavailability of nutrients. In R. Macrae, R. K. Robinson, & M. J. Sadler (Eds.), *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition* (pp. 384-388). London: Academic Press.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, *129*(3), 1139–1147.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. Elsevier Masson SAS.
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A. K., & Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, *90*, 667-675.
- Fellows, P. J. (2017). Extraction and separation of food components. *Food Processing Technology*. Fourth Edition. Woodhead Publishing. Cambridge, UK.
- Fennema, (2001). *Química de los Alimentos*. Segunda edición. Acribia Ed., Zaragoza, España.
- Ferrari, C. C., Marconi Germer, S. P., Alvim, I. D., & de Aguirre, J. M. (2013). Storage Stability of Spray-Dried Blackberry Powder Produced with Maltodextrin or Gum Arabic. *Drying Technology*, *31*(4), 470–478.
- Ferrero, C., & Jiménez-Castellanos, M. R. (2014). In vitro release testing of matrices based on starch–methyl methacrylate copolymers: Effect of tablet crushing force, dissolution medium pH and stirring rate. *International Journal of Pharmaceutics*, *461*, 270-279.
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2013). Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 1800–1809.
- Franceschinis, L, Salvatori, D., Sosa, N., & Schebor, C. (2014). Physical and functional properties of blackberry freeze- and spray-dried powders. *Drying Technology*, *32*, 197-207.
- Fredes, C. (2009). Antioxidantes en berries nativos chilenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *8*(6): 469-478.
- Fredes, C., Yousef, G., Robert, P., Grace, M., Lila, M. A., Gómez, M., Gebauer, M., & Montenegro, G. (2014 a). Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia*

- chilensis* (Mol.) Stuntz) from different geographical regions in Chile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2639-2648.
- Fredes, C., Montenegro, G., Zoffoli, J. P., Santander, F., & Robert, P. (2014 b). Comparison of the total phenolic content, total anthocyanin content and antioxidant activity of polyphenol-rich fruits grown in Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 41(1), 49-60.
- Fredes, C.; Osorio, M. J.; Parada, J.; Robert, P. (2018). Stability and bioaccessibility of anthocyanins from maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz) juice microparticles. *LWT-Food Science and Technology*, 91, 549-556.
- Gagneten, M., Corfield, R., Mattson, M. G., Sozzi, A., Leiva, G., Salvatori, D., & Schebor, C. (2019). Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. *Powder Technology*, 342, 1008–1015.
- Gallo, L., Llabot, J. M., Allemandi, D., Bucalá, V., & Piña, J. (2011). Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technology*, 208, 205-214.
- Gallo, L. (2013). Desarrollo de nuevos procesos tecnológicos para la obtención de extractos vegetales secos con propiedades biofarmacéuticas mejoradas. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba y Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Gallo, L., Ramírez-Rigo, M. V., Wilson, E., Piña, J., Allemandi, D., Bucalá, V. (2013). Spray-dried cascara sagrada extract for direct compression: tablet formulation and a simple HPLC method for tablet performance evaluation. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4, 1360-1370.
- Gallo, L., Ramírez-Rigo, M.V., Piña, J., & Bucalá, V. (2015). A comparative study of spray-dried medicinal plant aqueous extracts. Drying performance and product quality. *Chemical Engineering Research and Design*, 104, 681- 694.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A.J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P.J., & Moreno-Arribas, M.V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19, 835-841.
- Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) a Chilean Blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4235-4242.

- Georgetti, S. R., Casagrande, R., Souza, C. R. F., Oliveira, W. P., & Fonseca, M. J. V. (2008). Spray drying of the soybean extract: effects on Chemical properties and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1521-1527.
- Gertenbach, D. D. (2001). Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. In J. Shi, G. Mazza, & M. Le Maguer (Eds.), *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 279-286.
- Giusti, M., y Wrolstad, R. (2001). Anthocyanins: characterization and measurement with UV visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R. E., Ed.; John Wiley & Sons, Inc: New York, 1-13.
- Gómez Riera, P., Bruzone, I., Kirschbaum, D. (2013). Visión prospectiva de la cadena de frutas finas al 2030. Serie documentos de trabajo N° 23. Proyecto MINCYT-BIRF: Estudio del sector agroindustrial. Buenos Aires, Argentina.
- González, B., Vogel, H., Razmilic, I., & Wolfram, E. (2015). Polyphenol, anthocyanin and antioxidant content in different parts of maqui fruits (*Aristotelia chilensis*) during ripening and conservation treatments after harvest. *Industrial Crops and Products*, 76, 158-165.
- González, F., García-Martínez, E., Camacho, M. del M., & Martínez-Navarrete, N. (2019). Stability of the physical properties, bioactive compounds and antioxidant capacity of spray-dried grapefruit powder. *Food Bioscience*, 28, 74-82.
- Gonzalez Flores, M. (2019). *Saccharomyces uvarum* de ambientes naturales y bebidas fermentadas de la Norpatagonia. Caracterización y potencial para elaborar sidras a bajas temperaturas. Tesis Doctoral, Universidad del Comahue, Argentina.
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2005). Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 479-487.
- Granato, D., Karnopp, A. R., & van Ruth, S. M. (2015). Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1997-2006.

- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 13–22.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), 2023–2044.
- Hoffmann A. 1997. Flora silvestre de Chile, zona araucana. Ed. Fundación Claudio Gay.
- Information Bulletin best@buchi (2008). Scale-up from the Büchi Mini Spray Dryer B-290 to the Niro MOBILE MINOR, (52), 1–8
https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/B-290_Scale-up_B290_Niro_MOBILE_MINOR_en_01.pdf, 9 de mayo, 2019.
- Jiang, H., & Zhang, M. (2013). Handbook of Food Powders, Processes and Properties. Fruit and Vegetable Powders. Ed. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK.
- Jimenez-Garcia, S. N., Guevara-Gonzalez, R. G., Miranda-Lopez, R., Feregrino-Perez, A. A., Torres-Pacheco, I., & Vazquez-Cruz, M. A. (2013). Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International*, 54(1), 1195–1207.
- Kalaycıoğlu, Z., & Erim, F. B. (2017). Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chemistry*, 221, 496–507.
- Kemp, I., Hartwig, T., Hamilton, P., Wadley, R., & Bisten, A. (2016). Production of fine lactose particles from organic solvent in laboratory and commercial-scale spray dryers. *Drying Technology*, 34, 830-842.
- Kemp, I. (2017). Drying of pharmaceuticals in theory and practice. *Drying Technology*, 35, 918-924.
- Keservani, R. K., Kesharwani, R. K., Sharma, A. K., Gautam, S. P., & Verma, S. K. (2017). Nutraceutical Formulations and Challenges. Developing New Functional Food and Nutraceutical Products. Elsevier Inc.
- 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.
- Kondo, A. (1979). Microcapsule Processing and Technology. Marcel Dekker. New York.

- Kuehl, R. O. 2001 Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. Segunda Edición. USA: Thomson Learning, Inc.
- Laaksonen, O., Kuldjäär, R., Paalme, T., Virkki, M., & Yang, B. (2017). Impact of apple cultivar, ripening stage, fermentation type and yeast strain on phenolic composition of apple ciders. *Food Chemistry*, 233, 29–37.
- Labuza, T.P., & Schmidl, M.K. (1985). Accelerated Shelf Life Testing of Foods. *Food Technology*, 9 (2), 57-62.
- Langrish, T. A. G.; Premarajah, R. (2013). Antioxidant capacity of spray-dried plant extracts: experiments and simulations. *Advanced Powder Technology*, 24, 771-779.
- Lao, F., & Giusti, M. (2017). The effect of pigment matrix, temperature and amount of carrier on the yield and final color properties of spray dried purple corn (*Zea mays* L.) cob anthocyanin powders. *Food Chem.* 227: 376-382.
- Leal, M., Guagliano, M.L., Sanchez Rico, A.P. (2016). Estudio panorámico de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva: alimentos funcionales. Primera edición. Buenos Aires, Argentina. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Li, Z., Zhao, L. J., Lin, X., Shen, L., & Feng, Y. (2017). Direct compaction: An update of materials, trouble-shooting, and application. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), 543–556.
- Lim, K., Ma, M., & Dolan, K.D. (2011). Effects of spray drying on antioxidant capacity and anthocyanidin content of blueberry by-products. *Journal of Food Science*, 76 (7): 156-164.
- Lisanti, M.T., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio L. (2019). Alternative methods to SO₂ for microbiological stabilization of wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 455-479.
- Lopes, C.A., Rodríguez, M.E., Sangorrín, M.P., Querol, A., & Caballero, A.C. (2007). Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 539-546.
- López P., Baeza C., Peñailillo P., Stuessy T., Greimler J., Ruiz E., Novoa P., & Gatica A. (2013). Introduced plant species in the biosphere reserve Alejandro Selkirk Island, Robinson Crusoe Archipelago, Chile, and their threat to the native and endemic vegetation. *Memoirs New York Botanical Garden*, 108, 211-231.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23-50.

- Lucas-Gonzalez, R., Navarro-Coves, S., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, 94, 774–782.
- Mahdavi, S. A., Jafari, M. S., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*, 32, 509-518.
- Marrugat, J., Covas, M. I., Fitó, M., Schröder, H., Miró-Casas, E., Gimeno, E., ... Farré, M. (2004). Effects of differing phenolic content in dietary olive oil on lipids and LDL oxidation: A randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 43(3), 140–147.
- Martí, N., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2002). Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(2), 217–221.
- Martín Villena, M.J., Morales Hernández, M.E., Gallardo Lara, V., & Ruiz Martínez, M.A. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 50(1): 43-50.
- Martínez-Navarrete, N., del Mar Camacho Vidal, M., & José Martínez Lahuerta, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 12(2), 64–68.
- Martorell P, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Fernández-Espinar M T, Loureiro V & Querol A (2006) Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 79-84.
- Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., & Cesa, S. (2016). Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry*, 202, 59–69.
- Masters, K. (1979). *Spray Drying Handbook*. Third Edition. London: George Godwin Limited.

- Mateus N., Machado J., & de Freitas V. (2002). Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1689-1695.
- Matthei, O. (1995). Manual de las malezas que crecen en Chile. Ed. Alfabetá Impresores.
- Mazza, G., & Broiuillard, R. (1990). The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solution. *Phytochemistry*, 29, 1097 – 1102.
- Mazza, G.; Miniati, E. (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains; CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Mehtani, D., Seth, A., Sharma, P., Maheshwari, R., Abed, S. N., Deb, P. K., ... Tekade, R. K. (2018). *Dissolution Profile Consideration in Pharmaceutical Product Development. Dosage Form Design Considerations*. Elsevier Inc.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124.
- Ministerio de agricultura ganadería y pesca (2016). Informe cadena de Valor. https://www.economia.gov.ar/peconomica/docs/Complejo_fruta_pepita.pdf.
- Misle, E., Garrido, E., Contardo, H., & González, W. (2011). Maqui [*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz]-the Amazing Chilean Tree: A Review. *Journal of Agricultural Science & Technology B*, 1(4b), 473–482.
- Mizrahi, S. (2011). Accelerated shelf life testing of foods. Food and Beverage Stability and Shelf Life. Woodhead Publishing Limited.
- Mujumdar, A.S. (2006). Handbook of Industrial Drying. Third Edition. Singapore: CRC Press.
- Nandiyanto, A. B. D., & Okuyama, K. (2011). Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology*, 22 (1), 1–19.
- Nguyen, T. H, Morton, D. A. V., & Hapgood, K. P. (2013). Application of the unified compaction curve to link wet granulation and tablet compaction behavior. *Powder Technology*, 240, 103–115.
- Nile S.H. & Park S.W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30, 134–144.
- Ojovan, M. I. (2004). Glass formation in amorphous SiO₂ as a percolation phase transition in a system of network defects. *JETP Letters*, 79(12), 632–634.

- Oliveira, O. W., & Petrovick, P. R. (2010). Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: Bases e aplicações. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(4), 641–650.
- Oyanadel R. (2002). Propagación por esquejes de tres especies medicinales *Buddleja globosa* Hopw., *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz y *Aloysia triphylla* L'Her, mediante el uso de ácido indolbutírico. *Tesis de grado Licenciado en Agronomía*. Escuela de Agronomía. Facultad de Ciencias agrarias. Universidad Austral de Chile.
- Palma M. (2001). Propagación vegetativa de plantas femeninas de Maqui, *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. *Memoria de título Ingeniero Agrónomo*. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción, Chile.
- Patel, K. C., & Chen, X. D. (2005). Prediction of spray-dried product quality using two simple drying kinetics models. *Journal of Food Process Engineering*, 28(6), 567–594.
- Pina, F., Melo, M. J., Laia, C. A. T., Parola, A. J., & Lima, J. C. (2012). Chemistry and applications of flavylum compounds: A handful of colours. *Chemical Society Reviews*, 41(2), 869–908.
- Pina, F. (2014). Chemical Applications of Anthocyanins and Related Compounds. A Source of Bioinspiration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6885–6897.
- Pinelo, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2006). Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77(1), 57–63.
- Poblete P. (1997). Propagación vegetativa en maqui (*Aristotelia chilensis*). *Memoria de título Ingeniero Agrónomo*. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción, Chile.
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 483–508.
- Poozesh, S., & Bilgili, E. (2019). Scale-up of pharmaceutical spray drying using scale-up rules: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 562, 271-292.
- Quek, S. Y., Chok, N. K., & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 386–392.
- Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A., & Campos-Requena, V.H. (2017). Antioxidant compound extraction from maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz) berries: optimization by response surface methodology. *Antioxidants*, 6 (10), 1-11.
- Ramírez C. (1975). Desarrollo de malezas leñosas sobre suelos de origen volcánico en cultivos puros y mistos con gramíneas. *Agro Sur*, 3 (1): 32-47.

- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76-83.
- Ré, M.I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 1195–1236.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Ré, M.I. (2006). Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Drying Technology*, 24, 433-446.
- Rein, M. J. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (dissertation). EKT series 1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology.
- Rhim, J.W. (2002). Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *Food Science and Biotechnology*, 11, 361–364.
- Riedemann M., & Aldunate G. (2003). Flora nativa de valor ornamental, Chile zona Centro, Identificación y propagación. Segunda edición. Ed. Proyecto Jardín Botánico Chagual.
- Riveros H., Humaña A., & Lanfranco D. (1991). Actividad de los polinizadores en el Parque Nacional Puyehue, X Región, Chile. *Medio Ambiente (Chile)*, 11, 5-12.
- Rocha-Parra, D. F., Lanari, M. C., Zamora, M. C., & Chirife, J. (2016). Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT - Food Science and Technology*, 70, 162–170.
- Rodríguez-Amaya D.B. (2018). Natural Food Pigments and Colorants. En: Mérillon J., Ramawat K. (eds) *Bioactive Molecules in Food*. Springer, Cham.
- Rodríguez R., Matthei O., & Quezada M. (1983). Flora arbórea de Chile. Ed. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Rodríguez, K., Ah-Hen, K. S., Vega-Gálvez, A., Vásquez, V., Quispe-Fuentes, I., Rojas, P., & Lemus-Mondaca, R. (2016). Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz, berries during drying. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 537-542.
- Rojo, L., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M., Lila, M. A., & Raskin, I. (2012). In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*, 131, 387-396.
- Roos, Y. H. (1995). Characterization of food polymers using state diagrams. *Journal of Food Engineering*, 24, 339-360.

- Roos, Y. H. (2010). Glass Transition Temperature and Its Relevance in Food Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 469–496.
- Rothwell J., Urpi-Sarda M., Boto-Ordoñez M., Llorach R., Farran-Codina A., Barupal D., & Scalbert A. (2016). Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60, 203–211.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71(8), 504–5012.
- Sae-Eaw, A., Chompreeda, P., Prinyawiwatkul, W. et al. (2007). Acceptance and purchase intent of US consumers for nonwheat rice butter cakes. *Journal of Food Science*, 72, 92–97.
- Sáez JS, Lopes CA, Kirs VE, Sangorrín M (2011) Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 503–509.
- Salinas J. (2012). Información Tecnológica de Productos Forestales no Madereros del Bosque Nativo en Chile. Monografía de Maqui *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. p. 21- 24.
- Sanchez, V., Baeza, R., & Chirife, J. (2015). Comparison of monomeric anthocyanins and colour stability of fresh, concentrate and freeze-dried encapsulated cherry juice stored at 38°C. *Journal of Berry Research*, 5(4), 243–251.
- Sangorrín, M.P., García, V., Lopes, C.A., Sáez, J.S., Martínez, C., & Ganga, M.A. (2013) Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1066–1074.
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). A practical guide for designing effective nutraceutical combinations in the form of foods, beverages, and dietary supplements against chronic degenerative diseases. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 179–193.
- Santos-Buelga, C. (2001). Sustancias polifenólicas y el color del vino tinto. En: Ed. A. Mas. Facultat d'Enologia avui. Tarragona.
- Santos-Buelga, C., García-Viguera, C., & Tomás-Barberán, F.A. (2003). On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. In *Methods in Polyphenol Analysis*. Santos-Buelga C and Williamson G (eds). The Royal Society of Chemistry: Cambridge.
- Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D., & Supratman, U. (2012). Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a

- beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*, 132(4), 1908–1914.
- Sarraguça, M. C., Cruz, A. V., Soares, S. O., Amaral, H. R., Costa, P. C., & Lopes, J. A. (2010). Determination of flow properties of pharmaceutical powders by near infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(4), 484–492.
- Sarrate, R., Ticó, J. R., Miñarro, M., Carrillo, C., Fábregas, A., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., & Suñé-Negre, J. M. (2015). Modification of the morphology and particle size of pharmaceutical excipients by spray drying technique. *Powder Technology*, 270, 244–255.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Révész, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- Scheffeldt, P., & Hrazdina, G. (1978). Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *Journal of Food Science*, 43, 517-520.
- Schmitz-Schug, I., Kulozik, U., & Foerst, P. (2016). Modeling spray drying of dairy products – Impact of drying kinetics, reaction kinetics and spray drying conditions on lysine loss. *Chemical Engineering Science*, 141, 315-329.
- Seeram N. (2008). Berry fruits: compositional elements biochemical activities, and impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 627-629.
- Sellappan, S., Akoh, C.C., & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432–2438.
- Sette, P. A., Franceschinis, L. E., Schebor, C., & Salvatori, D. (2015). Osmotic Dehydrated Raspberries: Changes in Physical Aspects and Bioactive Compounds. *Drying Technology*, 33(6), 659–670.
- Sette, P., Franceschinis, L., Schebor, C., & Salvatori, D. (2017). Fruit snacks from raspberries: influence of drying parameters on colour degradation and bioactive potential. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 313-328.

- Shen, X., Sun, X., Xie, Q., Liu, H., Zhao, Y., Pan, Y., ... Wu, V. C. H. (2014). Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control*, 35(1), 159–165.
- Shishir, M. R. I., & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science and Technology*, 65, 49–67.
- Shofinita, D., & Langrish, T. A. G. (2016). The redox (pro-oxidant/antioxidant) balance in the spray drying of orange peel extracts. *Drying Technology*, 34, 1719-1725.
- Silva, S. D., Feliciano, R. P., Boas, L. V., & Bronze, M. R. (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 150, 489–493.
- Singh, J. P., Kaur, A., Shevkani, K., & Singh, N. (2016). Composition, bioactive compounds and antioxidant activity of common Indian fruits and vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 53(11), 4056–4066.
- Singh, A., & Van den Mooter, G. (2016). Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 100, 27-50.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sistema de Información de Biodiversidad. Administración de Parques Nacionales. Argentina. <https://sib.gob.ar/?#!/buscar/aristotelia%20chilensis>, 1 octubre 2019.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2001). Principios de análisis instrumental. Quinta edición. McGraw Hill/Interamericana de España. Madrid. España.
- Skrede, G., Wrolstad, R.E., & Durst, R.W. (2000). Changes in Anthocyanins and Polyphenolics during Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65(2): 357 – 364.
- Skupień K, Oszmiański J (2004) Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology*, 219, 66–70.
- Sosnik, A., & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40–54.
- Souza, T. P., Martínez-Pacheco, R., Gómez-Amoza, J. L., & Petrovick, P. R. (2007). Eudragit E as excipient for production of granules and tablets from *Phyllanthus niruri* L. spray dried extract. *AAPS PharmSciTech*, 8, E54-E60.

- Spayd S., Tarara J., Mee D., & Ferguson J. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 3: 171-182.
- Speiski, H., López Alarcón, C., Gómez, M., Fuentes, J., & Sandoval Acuña, C. (2012). First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south Andes region of South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36): 8851-9.
- Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeast. In: *Yeasts in food and beverages*. Ed: Querol, A. & Feet, G ; Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sun-Waterhouse, D. (2011). The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 899-920.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147–156.
- Tan, S.P., Kha, T.C., Parks, S.E., Stathopoulos, C.E., & Roach, P.D. (2015). Effects of the spray-drying temperatures on the physiochemical properties of an encapsulated bitter melon aqueous extract powder. *Powder Technology*, 281, 65-75.
- Tarantilis, P. A., Troianou, V. E., Pappas, C. S., Kotseridis, Y. S., & Polissiou, M. G. (2008). Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 111, 192–196.
- Tepsongkroh, B., Jangchud, K., Jangchud, A., Chonpracha, P., Ardoin, R. and Prinyawiwatkul, W. (2020), Consumer perception of extruded snacks containing brown rice and dried mushroom. *International Journal of Food Science and Technology*, 55, 46-54.
- Timberlake, C.F., Bridle, P. (1977). Anthocyanins: color augmentation with catechin and acetaldehyde. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 539-544.
- Timberlake, C.F.; Henry, B.S. (1986). Plant pigments as natural food colours. *Endeavour NS*, 10, 31-36.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88, 411-418.
- Tonon, R. V., Baroni, A. F., Brabet, C., Gibert, O., Pallet, D., & Hubinger, M. D. (2009). Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (*Euterpe oleraceae*

- Mart.) juice. *Journal of Food Engineering*, 94(3–4), 215–221.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907–914.
- Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 91-102.
- Training Papers Spray Drying (2002). BÜCHI Labortechnik AG.
- Tresserra-Rimbau, A.; Medina-Remón, A.; Pérez-Jiménez, J.; Martínez-González, M. A.; Covas, M. I.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Gómez-García, E.; Lapetra, J.; Arós, F.; et al., (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 23, 953–959.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937–4982.
- United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 30-NF 25, The United States Pharmacopeial (2007). Convention Inc., Mack Printing, Rockville, USA.
- Valdebenito G., Aguilera M. (2013). Información Tecnológica de Productos Forestales no Madereros del Bosque Nativo en Chile. Antecedentes Silvícolas *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz.
- Valdebenito G., Alvarez A. (2017). Uso y valor de los Productos Forestales no Madereros (PFNM) en Chile. Instituto Forestal-Ministerio de Agricultura de Chile.
- Vallejo, C. V., Delgado, O. D., Rollán, G. C., & Rodríguez-Vaquero, M. J. (2018). Control of *Hanseniaspora osmophila* and *Starmerella bacillaris* in strawberry juice using blueberry polyphenols. *LWT - Food Science and Technology*, 92, 312–317.
- Vally, H., Misso, N. L., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*, 39, 1643–1651.
- Van de Velde, F., Pirovani, M. E., & Drago, S. R. (2018). Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 22–31.
- Vázquez-Espinosa, M., Espada-Bellido, E., De Peredo, A. V. G., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., ... Barbero, G. F. (2018). Optimization of microwave-assisted

- extraction for the recovery of bioactive compounds from the Chilean superfruit (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Agronomy*, 8(11), 1–15.
- Vázquez-Espinosa, M., González de Peredo, A. V., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barbero, G. F., & Espada-Bellido, E. (2019). Assessment of ultrasound assisted extraction as an alternative method for the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from maqui berries (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Agronomy*, 9(3), 1–17.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 31-40.
- Vicente, J., Pinto, J., Menezes, J., & Gaspar, F. (2013). Fundamental analysis of particle formation in spray drying. *Powder Technology*, 247, 1–7.
- Vidal J, L., Avello L, M., Loyola C, C., Campos P, J., Aqueveque M, P., R. Dungan, S., ... Guarda M, A. (2013). Microencapsulation of maqui (*Aristotelia chilensis* Molina Stuntz) leaf extracts to preserve and control antioxidant properties. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(1), 17–23.
- Vogel H., Razmilic I., San Martin J., Doll U., & González B. (2005). Plantas medicinales Chilena. Experiencias de domesticación y cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui. Editorial Universitaria de Talca.
- Vogel, H., Peñailillo, P., Doll, U., Contreras, G., Catenacci, G., & González, B. (2014). Maqui (*Aristotelia chilensis*): morpho-phenological characterization to design high-yielding cultivation techniques. *Journal of Applied Research on Medicinal and aromatic Plants*, 1, 123-133.
- Wang, S.Y., & Lin, H.S. (2000). Antioxidant Activity in Fruit and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry is Affected by Cultivar and Maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48,140-146
- Wrolstad, R.E.; Wightman, J.D.; Durst, R.W. (1994). Glycosidase activity of enzyme preparations used in fruit juice processing. *Food Technology*, 48 (90), 92-98.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), 423–428.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and

- estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4069–4075.
- Yang B. & Kortessniemi M. (2015). Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Current Opinion in Food Science*, 2, 36-42
- Ye, M., Yue, T., & Yuan, Y. (2014). Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(14), 2951–2957.
- Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M., Kobarfard, F., & Zbicinski, I. (2014). Retention rate enhancement of antioxidant and cyaniding 3-o-glucoside components of the reconstituted product from spray-dried Black Raspberry juice by optimizing process parameters. *Drying Technology*, 32, 1683-1691.
- Zamora, F. (2003). El color del vino tinto. En: AMV Ediciones and Mundi-Prensa. *Elaboración y crianza del vino: Aspectos científicos y prácticos*. Madrid, España.
- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Luján-Barroso, L., Slimani, N., Romieu, I., Touillaud, M., & González, C. (2011). Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *British Journal of Nutrition*, 106 (7), 1090-1099.
- Zevallos P., Matthei O. (1992). Caracterización dendrológica de las especies leñosas del Fundo Escuadrón Concepción, Chile. *Ciencia e Investigación Forestal (Chile)*, 6, 195-257.
- Zheng, Y., Wang, S.Y., Wang, C.Y., & Zheng, W. (2007). Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 49–57.
- Zhou, Y. C., Xu, B. H., Yu, A., & Zulli, P. (2001). Numerical investigation of the angle of repose of mono sized spheres. *Physical review E: Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 64, 021301-1-021301-8.
- Zuriarrain, A., Zuriarrain, J., Puertas, A. I., Dueñas, M. T., Ostra, M., & Berregi, I. (2015). Polyphenolic profile in cider and antioxidant power. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2931–2943.

Anexo

Encuesta utilizada para el análisis de aceptabilidad y percepción del consumidor de las bebidas formuladas con sidra y polvo de maqui.

Encuesta sobre un nuevo producto

*Obligatorio

Se desea introducir en el mercado una nueva bebida para adultos a base de sidra de manzana (4-6% de alcohol) con agregado de un polvo de maqui. El maqui es una fruta fina silvestre de la Patagonia argentino-chilena.

Manzana 

Maqui 



Sidra con agregado de polvo de maqui

Por favor observe a continuación las imágenes de sidra con agregado de maqui en diferentes cantidades, e indique cuánto piensa ud. que le gustaría cada una de esas bebidas

Bebida 563



Continúa

Marque en la siguiente escala cuánto le gusta el color de la bebida 563 *

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Me disgusta mucho Me gusta mucho

Lo que me gusta del color de la bebida 563 es...

Tu respuesta _____

Lo que no me gusta del color de la bebida 563 es...

Tu respuesta _____

Bebida 381



Marque en la siguiente escala cuánto le gusta el color de la bebida 381 *

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Me disgusta mucho Me gusta mucho

Lo que me gusta del color de la bebida 381 es...

Tu respuesta _____

Lo que no me gusta del color de la bebida 381 es...

Tu respuesta _____

Bebida 236



Marque en la siguiente escala cuánto le gusta el color de la bebida 236 *

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Me disgusta mucho Me gusta mucho

Lo que me gusta del color de la bebida 236 es...

Tu respuesta _____

Lo que no me gusta del color de la bebida 236 es...

Tu respuesta _____

Bebida 178



Marque en la siguiente escala cuánto le gusta el color de la bebida 178 *

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Me disgusta mucho Me gusta mucho

Lo que me gusta del color de la bebida 178 es...

Tu respuesta _____

Lo que no me gusta del color de la bebida 178 es...

Tu respuesta _____

Continúa

Teniendo en cuenta el color de las 4 bebidas presentadas

Cuál es la que usted prefiere? *

- Bebida 563
- Bebida 381
- Bebida 236
- Bebida 178

Compraría el producto? *

- Si
- No

Justifique su respuesta

Tu respuesta _____

¿Sabía que el maqui se considera un superalimento por aportar numerosos beneficios a la salud (poder antioxidante, efectos antiinflamatorio e hipoglucemiante)? Considerando que a mayores concentraciones de polvo de maqui añadido a la bebida se obtiene una mayor coloración, por favor indique:

Cambiaría Ud. la elección de la bebida? *

- Si
- No

Qué bebida elegiría? *

- Bebida 563
- Bebida 381
- Bebida 236
- Bebida 178

Por último, por favor complete:

Edad *

Tu respuesta _____

Genero *

Tu respuesta _____