

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

**ESTUDIO DE ESTRATEGIAS SOSTENIBLES PARA LA
REVALORIZACIÓN DE SUB-PRODUCTOS
AGROINDUSTRIALES DE FRUTILLA Y MANZANA.
APLICACIÓN DE ESTRÉS ABIOTICO Y ANÁLISIS DE
SU BIOACTIVIDAD.**

por

Mg. Johan Esteban VILLAMIL GALINDO

Directora de Tesis: Mg. Andrea M. PIAGENTINI

Miembros del Jurado:

Dra. Analía CONCELLÓN

Dr. Norberto Francisco GARIGLIO

Dra. Sonia Cecilia SGROPPO

**INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
(FIQ-UNL)**

- 2024 -

‘Donde mis capacidades terminan, ahí comienza mi fe. Una fe fuerte ve lo invisible, cree en lo increíble y recibe lo imposible’

Daisaku Ikeda

A Dios, mis padres y a mi familia.
En memoria de mis abuelos José Galindo y Gerardo Villamil.

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:

Publicaciones:

- Villamil-Galindo, E., & Piagentini, A. M. (2024). KINETIC MODELING OF VALUABLE PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTION FROM STRAWBERRY AND APPLE AGRO-INDUSTRIAL BY-PRODUCTS. Journal of Food Process Engineering, 47(3), e14573. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14573>.
- Villamil-Galindo, Esteban, Piagentini, Andrea. GREEN SOLVENTS FOR THE RECOVERY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM STRAWBERRY AND APPLE AGRO-INDUSTRIAL BIO-WASTES. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo: Vol. 56 Núm. 1 (2024): Enero-Junio. En prensa.
- Villamil-Galindo, E.; Gastélum-Estrada, A.; Chuck-Hernandez, C.; Antunes-Ricardo, M.; Reza-Zaldivar, E.E.; Piagentini, A.; Jacobo-Velázquez, D.A. (2023). KINETIC ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION AS A SUSTAINABLE APPROACH FOR THE RECOVERY OF PHENOLICS ACCUMULATED THROUGH UVA TREATMENT IN STRAWBERRY BY-PRODUCTS. Foods, 12, 2989. <https://doi.org/10.3390/foods12162989>.
- Villamil-Galindo E, Antunes-Ricardo M, Piagentini AM and Jacobo-Velázquez DA (2022) ADDING VALUE TO STRAWBERRY AGRO-INDUSTRIAL BY-PRODUCTS THROUGH ULTRAVIOLET A-INDUCED BIOFORTIFICATION OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PHENOLIC COMPOUNDS. Front. Nutr. 9:1080147. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1080147>
- Villamil-Galindo Esteban, Piagentini Andrea Marcela (2022). 'SEQUENTIAL ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PECTIN AND PHENOLIC COMPOUNDS FOR THE VALORISATION OF 'GRANNY SMITH' APPLE PEEL', Food Bioscience, 2022, 101958, ISSN 2212-4292. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101958>.
- Villamil-Galindo, E., Van de Velde, F. & Piagentini, A.M. (2021). 'STRAWBERRY AGRO-INDUSTRIAL BY-PRODUCTS AS A SOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS: EFFECT OF CULTIVAR ON THE PHENOLIC PROFILE AND THE ANTIOXIDANT CAPACITY'. Bioresour. Bioprocess. 8, 61. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00416-z>

Solicitud de patente

- Patente en trámite en el Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual de Argentina
- Referencia: 2549122
- Título de la patente: PROCESO PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS EN MATERIAL VEGETAL, Y EXTRACTOS RICOS EN AGRIMONIIN
- Tipo de participación: Inventor

Presentaciones a reuniones científicas:

- XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- IX Simposio internacional de nuevas tecnologías-VII Simposio latinoamericano sobre higiene y calidad de alimentos-v Simposio de innovación en industrias alimentarias. Tipo de evento: Congreso Fecha: 04-octubre- 06 octubre-2023. Lugar: Universidad Católica, sede Buenos aires, Argentina. Título de trabajo presentado: IMPACTO DE LA BIOFORTIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO EN EL POTENCIAL BIOACTIVO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE CÁSCARA DE MANZANA 'GRANNY SMITH': ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD. Modalidad: Poster
- XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- IX Simposio internacional de nuevas tecnologías-VII Simposio latinoamericano sobre higiene y calidad de alimentos-v Simposio de innovación en industrias alimentarias. Tipo de evento: Congreso. Fecha: 04-octubre- 06 octubre-2023. Lugar: Universidad Católica, sede Buenos aires, Argentina. Título de trabajo presentado: ESTUDIO CINÉTICO DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EMPLEANDO SOLVENTES VERDES PARA LA REVALORIZACIÓN DEL RESIDUOS AGROINDUSTRIAL DE MANZANA 'GRANNY SMITH'. Modalidad: Poster
- IV Congreso argentino de biología y tecnología poscosecha. Tipo de evento: Congreso. Fecha: 30-agosto- 01 septiembre-2023. Lugar: Universidad Nacional de La plata, Argentina. Título de trabajo presentado: AGREGADO DE VALOR A LOS SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES DE FRUTILLA MEDIANTE LA BIOFORTIFICACIÓN CON COMPUESTOS FENÓLICOS BIOACTIVOS INDUCIDA POR RADIACIÓN UV-A. Modalidad: Trabajo oral
- IV Congreso argentino de biología y tecnología poscosecha. Tipo de evento: Congreso. Fecha: 30-agosto- 01 septiembre-2023. Lugar: Universidad Nacional de La plata, Argentina. Título de trabajo presentado: ESTRÉS ABIÓTICO POR CORTE Y APLICACIÓN DE RADIACIÓN UV-A COMO ESTRATEGIAS EFICIENTES PARA MEJORAR EL POTENCIAL BIOACTIVO DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE MANZANA "GRANNY SMITH". Modalidad: Poster
- VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2022). Tipo de evento: Congreso. Fecha: 4-octubre-6 de octubre 2022. Lugar: Ciudad de Córdoba, Argentina. Título del trabajo presentado: ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE FRUTILLA. Modalidad: Poster
- VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2022) Tipo de evento: Congreso. Fecha: 4-octubre-6 de octubre 2022. Lugar: Ciudad de Córdoba, Argentina. Título del trabajo presentado: USO DE SOLVENTES VERDES PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE FRUTILLA Y MANZANA. Modalidad: Poster
- Quinto congreso internacional de alimentos funcionales y nutraceuticos. Tipo de evento: Congreso. Fecha: 08-junio- 10 junio 2022. Lugar: Tecnológico de Monterrey sede Guadalajara, Zapopan, Jalisco, México. Título de trabajo presentado: REVALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE FRUTILLA Y MANZANA: CINÉTICA Y OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES. Modalidad: Ponencia oral
- III Congreso argentino de biología y tecnología postcosecha (virtual). Tipo de evento: Congreso. Fecha: 26-Julio- 30 Julio-2021. Lugar: Facultad de Ingeniería Química-FIQ-UNL, Argentina. Título de trabajo presentado: APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE CÁSCARA DE MANZANA 'GRANNY SMITH' MEDIANTE LA OBTENCIÓN SECUENCIAL, ASISTIDA POR ULTRASONIDO, DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y PECTINA. Modalidad: Trabajo oral

- III Congreso argentino de biología y tecnología postcosecha (virtual). Tipo de evento: Congreso. Fecha: 26-Julio- 30 Julio-2021: Facultad de Ingeniería Química-FIQ-UNL, Argentina. Título de trabajo presentado: PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE RESIDUOS DEL ACONDICIONAMIENTO AGROINDUSTRIAL DE TRES VARIEDADES DE FRUTILLA. Modalidad: Poster.

Reconocimientos

- Primer lugar en el concurso Proyecta-Bio-UNL para proyectos de base biotecnológica sostenible y sustentable 2022, con el proyecto titulado 'RefruBio (Residuos de frutilla bioactivos)' monto para financiación del proyecto: \$ 75.000 ARS

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Mag. Andrea Piagentini, por su confianza, apoyo y enseñanzas, las cuales fueron esenciales en este proceso de formación doctoral. permitiéndome explorar el mundo de la investigación sin ninguna restricción, con respeto y valentía. guiándome de la mejor forma en este camino de la ciencia. Mil GRACIAS.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Técnicas y Científicas de Argentina (CONICET) quienes me otorgaron la beca interna doctoral para poder llevar a cabo mi doctorado con una dedicación total. Sin este soporte económico nada de esto sería posible

A la educación pública de la República Argentina, que permite que aquellos que queremos superar la barrera del desconocimiento tengamos un acceso garantizado a los distintos programas de formación académica. Asegurando que, desde la ciencia y el conocimiento, todos contribuyamos al progreso la nación. Especialmente a la Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, por abrirme sus aulas y espacios de conocimiento continuo los cuales me permitieron y siguen permitiendo crecer a nivel intelectual, profesional y personal.

Al Instituto de Tecnología de los Alimentos que con sus más de 50 años de trayectoria me permitieron desarrollar mi investigación doctoral y trabajar en sus instalaciones. A todos los grupos de investigación que lo componen, ya que sin la colaboración de ustedes mucho de estos resultados no se hubieran logrado. Fue un honor trabajar con excelentes profesionales. Para el grupo de Conservación de Alimentos del ITA, todos mis agradecimientos y respetos. Quienes me acompañaron con sus enseñanzas y profesionalismo en este proceso, sin sus colaboraciones esto no sería posible.

A la Ing. María del Huerto Sordo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Coronda, por su amable colaboración suministrando los subproductos del acondicionamiento industrial de frutilla, además de abrírnos las puertas de sus campos para conocer los cultivos y problemáticas de este fruto.

A todo el personal no docente de la Facultad de Ingeniería Química-UNL, especialmente al personal de servicios generales y seguridad que, sin su importante labor, sería muy difícil llevar a cabo nuestros trabajos.

A mis compañeros de laboratorio y del ITA, que fueron como mi familia, me apoyaron y ayudaron enormemente en este proceso de formación estando lejos de casas, gracias por cada experiencia compartida, siempre los llevaré conmigo. Al Dr Franco Van de Velde que

durante el tiempo que compartido fue un mentor, compartiendo desinteresadamente su conocimiento y apoyo en cada circunstancia de mi formación. Total, admiración, respeto y agradecimiento Doctor.

Al Tecnológico de Monterrey, Centro de Biotecnología FEMSA, al *Biotech* Guadalajara y al Instituto de Investigación para la Obesidad del TEC. En especial a las Dras. Marilena Antunes, Cristina Chuck Laura Acevedo, quienes me ayudaron y enseñaron temas importantes durante mi estancia de investigación. A todos los mis compañeros en Monterrey y Guadalajara con los que pude intercambiar conocimientos y aprender un poco más sobre su cultura y sus disciplinas académicas. Al Dr. Daniel Alberto Jacobo, quien me brindó la oportunidad, me apoyó, dirigió y formó durante mi estancia en México, Fueron unos anfitriones increíbles. Total, agradecimiento.

A mi amada familia, quienes son todo en mi vida, a mis padres que siempre me inculcaron la educación como herramienta de progreso, basado en el conocimiento, la verdad y la justicia, gracias, por brindarme siempre la oportunidad de lograr mis objetivos con Dios en primer lugar y el con el amor incondicional de un padre, este logro es de ustedes, a mi hermano Cristian, quien es mi bastión, mi guía y referente, por su apoyo incondicional junto a su esposa Andrea y mi sobrina Sofia, quienes me han brindado un amor infinito, necesario para moverme en este camino. A mi hermano Sebastián que a pesar de estar lejos siempre estuvo ahí para acompañarme a la distancia con ese amor fraternal que trasciende kilómetros. A mi abuela Ruby que con su apoyo me ha permitido lograr todo esto, gracias por el apoyo, el amor y el cariño, que nunca se cansa de dar lo mejor por su familia, este logro tiene su nombre. A mis tías y primos que me apoyaron incondicionalmente a la distancia. A mis abuelos José y Gerardo en el cielo que sé que están sonriendo de orgullo, esto es de ustedes. A mis amigos en Colombia que siempre me esperaban con sus brazos abiertos, y que su cariño fue fundamental en los momentos difíciles.

A mi amada novia Dayanny, que, con su inmenso e incondicional amor, siempre me ha apoyado desde el inicio de mis estudios, gracias por su paciencia por los sacrificios, que hoy valen la pena al culminar juntos esta etapa que nos lleva a crecer juntos cada día más. Te amo, infinitas gracias. A toda su familia que siempre estuvo pendiente de mi y siempre me han brindado su cariño y apoyo. Gracias.

A todos y cada uno de los que hicieron parte de este proceso, MIL GRACIAS.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	15
INDICE DE FIGURAS.....	18
ABREVIATURAS	22
RESUMEN	26
ABSTRACT	28
.....	30
1. INTRODUCCIÓN	30
1.1. La agroindustria de las frutas, hortalizas y sus residuos	31
1.2. Economía circular en la agroindustria de frutas y hortalizas	33
1.3. Agroindustria de la frutilla	34
1.4. Agroindustria de la manzana	35
1.5. Factores que afectan el metabolismo secundario de los tejidos vegetales	40
1.5.1. Factores genéticos.....	41
1.5.2. Factores ontogénicos.....	42
1.5.3. Factores morfogénéticos.....	43
1.5.4. Factores Ambientales	43
1.6. Estrés abiótico como herramienta de biofortificación con compuestos fenólicos....	44
1.6.1. Estrés por agua.....	45
El estrés abiótico por agua en las plantas se refiere a situaciones en las que las plantas experimentan condiciones de escasez de agua o exceso de agua que afectan negativamente su crecimiento y desarrollo. Estas condiciones pueden incluir sequías prolongadas, falta de riego adecuado, salinidad del suelo, inundaciones, entre otros factores. El estrés abiótico por agua puede tener un impacto significativo en la fisiología y el metabolismo de las plantas, alterando su capacidad para absorber y transportar nutrientes, regular la transpiración y mantener la homeostasis hídrica (Redondo-Gómez, 2013).....	45
1.6.2. Estrés por temperatura.....	45
1.6.3. Estrés por composición atmosférica.....	46
1.6.4. Estrés lumínico.	46
1.6.5. Estrés por daño mecánico.....	47
1.7. Biofortificación con compuestos fenólicos de las plantas.....	49
1.8. El síndrome metabólico y el efecto de los compuestos fenólicos.	50
1.9. Extracción de compuestos fenólicos.....	52
1.9.1. Extracción por infusión.....	54
1.9.2. Extracción por decocción	54
1.9.3. Maceración	54
1.9.4. Percolación	55

1.9.5. Extracción por reflujo	55
1.9.6. Extracción Soxhlet	56
1.9.7. Elección del método de extracción	56
1.10. Tecnologías alternativas de extracción sólido-líquido.	58
1.11. Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	60
1.11.1. Impacto de la potencia.	62
1.11.2. Impacto de la Frecuencia	62
1.11.3. Impacto de la intensidad	63
1.11.4. Influencia del solvente.....	63
1.11.5. Influencia de la temperatura	64
1.11.6. Influencia de la matriz vegetal	64
1.12. Modelado de la cinética de extracción	66
1.13. Bioactividad y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.	68
1.14. OBJETIVOS	71
1.14.1. Objetivo general	71
1.14.2. Objetivos específicos	71
2. MATERIALES Y MÉTODOS	73
2.1. Material vegetal	74
2.2. Estudio de la extracción secuencial de compuestos fenólicos y pectina a partir de la cáscara de manzana “Granny Smith”.	76
2.2.1. Preparación de las muestras.....	76
2.2.2. Extracción secuencial de compuestos fenólicos en la cáscara de manzana ‘Granny Smith’.	76
2.2.3. Extracción secuencial de pectina	77
2.3. Extracción por Soxhlet.....	79
2.4. Extracción por maceración	80
2.4.1. Modelado de las cinéticas de extracción por maceración de RF y GS	81
2.5. Estudio del proceso de biofortificación de residuos agroindustriales de frutilla y cáscara de manzana.	82
2.5.1. Estudio de la biofortificación del residuo agroindustrial de frutilla (RF) mediante el uso de radiación UVA y diferentes temperaturas de almacenamiento	82
2.5.2. Estudio de la biofortificación de cáscara de manzana “Granny Smith” (GS) mediante la aplicación de estrés abiótico por daño mecánico y almacenamiento.	83
2.5.3. Estudio de la biofortificación de la cáscara de manzana “Granny Smith” (GS) mediante el efecto combinado de la aplicación de estrés abiótico por daño mecánico, radiación UVA y almacenamiento.	84
2.6. Extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos de residuos agroindustriales de frutilla (RF) y cáscara de manzana (GS)	86
2.6.1. Diseño experimental	86

2.6.2. Modelado y optimización de la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos.....	87
2.7. Determinación de la estabilidad de los compuestos fenólicos durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in-vitro</i>	89
2.8. Ensayos de potencial bioactivo en cultivo celular.	90
2.8.1. Ensayo del potencial antiinflamatorio.	92
2.8.2. Actividad antioxidante celular.	92
2.8.3. Actividad anti proliferativa celular	93
2.8.4. Estudio del potencial antiobesogénico.	94
2.9. Ensayo de obtención de microcápsulas de alginato de sodio con los extractos UAE de RF y GS.....	95
2.9.1. Caracterización de las microcápsulas	96
2.9.2. Eficiencia de encapsulación	96
2.10. Determinaciones analíticas.....	96
2.10.1. Contenido de flavonoides totales (TF).....	96
2.10.2. Grado de esterificación y contenido de metoxilo de la pectina.	97
2.10.3. Peso equivalente de la pectina.....	97
2.10.4. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos	97
2.10.5. Perfil de compuestos fenólicos.....	98
2.10.6. Capacidad Antioxidante (CA)	98
2.10.7. Determinación de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) .	99
2.10.8. Determinación de la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO)	99
2.10.9. Determinación de proteínas en los extractos enzimáticos.	100
2.11. Análisis estadístico	100
2.11.1. Análisis estadístico del modelado de la cinética de extracción	100
2.11.2. Análisis estadístico del proceso de biofortificación, validación y ensayos de bioactividad.....	101
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
3.1. Efecto del tipo de solvente, concentración de ácido y número de etapas de en la extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de manzana “Granny Smith” ..	103
3.1.1. Efecto sobre el contenido de fenoles totales de los extractos	103
3.1.2. Efecto sobre la capacidad antioxidante de los extractos	107
3.1.3. Efecto sobre el perfil de compuestos fenólicos de los extractos	108
3.2. Impacto del proceso de extracción sobre la pectina y los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’	114
3.3. Extracción Soxhlet de compuestos fenólicos de sub-productos de frutilla y cáscara de manzana.....	118
3.3.1. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los extractos de RF y GS obtenidos por Soxhlet	119

3.3.2. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos de RF y GS obtenidos por Soxhlet.....	123
3.4. Extracción por maceración de subproductos de frutilla y cáscara de manzana	132
3.4.1. Extracción de compuestos fenólicos por maceración de subproductos de frutilla (RF).....	132
3.4.2. Extracción de compuestos fenólicos por maceración a partir de cáscara de manzana (GS).....	143
3.5. Estrategias de biofortificación con compuestos fenólicos en subproductos de frutilla y cáscara de manzana.	153
3.5.1. Efecto de la dosis de radiación UV-A, el tiempo y la temperatura de almacenamiento en el proceso de biofortificación de subproductos de frutilla... ..	153
3.5.2. Efecto del tipo de corte, la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la cáscara de manzana (GS)	173
3.5.3. Efecto combinado del tipo de corte (Ct), la temperatura de almacenamiento (ST) y la dosis de radiación UVA en la cáscara de manzana (GS)	193
3.6. Extracción asistida por ultrasonido (UAE) de compuestos fenólicos a partir de subproductos de frutilla (RF).....	206
3.6.1. Influencia de las variables de extracción asistida por ultrasonido sobre el contenido de fenoles totales (TPC) y las constantes cinéticas (modelo de Peleg) para RF.....	206
3.6.2. Modelado y optimización de la extracción asistida por ultrasonido para RF.	209
3.6.3. Efecto de la extracción asistida por ultrasonido (UAE) sobre el perfil de compuestos fenólicos de RF.	216
3.6.4. Estabilidad de los compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales de frutilla extraídos por ultrasonido durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in-vitro</i>	219
3.7. Extracción asistida por ultrasonido (UAE) de compuestos fenólicos a partir de cáscara de manzana (GS).....	222
3.7.1. Influencia de las variables de extracción asistida por ultrasonido sobre el contenido de fenoles totales (TPC) y las constantes cinéticas (modelo de Peleg) para GS.	222
3.7.2. Modelado y optimización de la extracción asistida por ultrasonido para GS.	224
3.7.3. Efecto de la extracción asistida por ultrasonido (UAE) sobre el perfil de compuestos fenólicos de GS.....	230
3.7.4. Estabilidad de los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana extraídos por ultrasonido durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in-vitro</i>	233
3.8. Caracterización de los bagazos residuales de la obtención de extractos rico en compuestos fenólicos de RF-E y GS-E por UAE	236
3.9. Ensayos de bioactividad en cultivo celular, de las distintas estrategias de biofortificación y extracción asistida por ultrasonido de RF y GS.	239
3.9.1. Actividad anti proliferativa de la fracción digerida de RF sobre HDFa y células cancerígenas.	239

3.9.2. Actividad antioxidante celular (%CAA) de los residuos agroindustriales de frutilla (RF).	240
3.9.3. Potencial antiinflamatorio de los residuos agroindustriales de frutilla (RF).	242
3.10. Bioactividad en cultivos celulares de los extractos de RF extraídos por UAE	242
3.10.1. Actividad antiproliferativa de fracciones de UAE digeridas de RF	242
3.10.2. Actividad celular antioxidante y antiinflamatoria de las fracciones de UAE digeridas de RF.	245
3.10.3. Actividad antiadipogénica de los compuestos fenólicos de RF.	248
3.11. Estudio de la bioactividad de los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana “Granny Smith”	250
3.11.1. Actividad anti proliferativa de la fracción digerida de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ biofortificada con compuestos fenólicos.	250
3.11.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la cáscara de manzana (GS)	252
3.11.3. Evaluación actividad antioxidante celular (%CAA) de la cáscara de manzana (GS).	253
3.12. Bioactividad en cultivos celulares de los extractos de GS extraídos por ultrasonido	254
3.12.1. Actividad antiproliferativa de fracciones de UAE digeridas de GS.	254
3.12.2. Actividad celular antioxidante y antiinflamatoria de las fracciones de UAE digeridas de GS	256
3.12.3. Actividad antiadipogénica de los compuestos fenólicos de GS	260
3.13. Encapsulación de los extractos ricos en compuestos fenólicos obtenidos	262
3.13.1. Encapsulación del extracto USRF-E	262
3.13.2. Encapsulación del extracto USGS-E.	266
4. CONCLUSIONES.	271
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	277

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Comparación de las características de una burbuja a 20 y 500 kHz con una intensidad de 10 W/cm ²	63
Tabla 2. 1. Diseño factorial para la extracción de compuestos fenólicos a partir de RF y GS por maceración.	80
Tabla 2. 2. Intensidad del ultrasonido (UI) calculada para cada condición de extracción estudiada.	86
Tabla 2. 3. Composiciones de fases gastrointestinales simuladas.	90
Tabla 3. 1. ANOVA para el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TF), y la capacidad antioxidante (DPPH and FRAP) de la cáscara de manzana 'Granny Smith'.	103
Tabla 3. 2. Compuestos fenólicos totales (TPC), contenido total de flavonoides (FT) y capacidad antioxidante mediante DPPH* y FRAP de diferentes extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith'.	105
Tabla 3. 3. ANOVA para el perfil de compuestos fenólicos determinado por HPLC-DAD.	109
Tabla 3. 4. Contenido de los principales compuestos fenólicos de diferentes extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith' (parte 1).....	112
Tabla 3. 5. Caracterización de la pectina de cáscara de manzana obtenida mediante procesos de extracción asistidos por ultrasonidos (US) y convencionales (TR).	118
Tabla 3. 6. ANOVA multifactorial para todas las respuestas estudiadas en extractos de subproductos de frutilla (RF) obtenidos por Soxhlet.	119
Tabla 3. 7. Compuestos fenólicos totales (TPC) y capacidad antioxidante (CA) de los extractos de subproductos de frutilla (RF) y cáscara de manzana 'Granny Smith' (GS).	120
Tabla 3. 8. ANOVA multifactorial para todas las respuestas estudiadas en extractos de cáscara de manzana (GS) 'Granny Smith' obtenidos por Soxhlet. Error! Marcador no definido.	
Tabla 3. 9. Coeficientes de correlaciones para las variables estudiadas de extractos de subproductos de frutilla RF.....	126
Tabla 3. 10. Correlaciones coeficientes para las variables estudiadas de extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith'.	131
Tabla 3. 11. ANOVA multifactorial para el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y la capacidad antioxidante (CA) de los extractos de RF.....	132
Tabla 3. 12. Valores de las constantes de los modelos de Peleg (MI) y del modelo empírico (MII) para la cinética de extracción de TPC a partir de RF.	135
Tabla 3. 13. Valores de las constantes del modelo de Peleg (MI) y del modelo empírico (MII) para la cinética de la CA de los extractos de RF.	140
Tabla 3. 14. ANOVA multifactorial para el contenido de fenoles totales TPC y la capacidad antioxidante de los extractos de GS.	144
Tabla 3. 15. Valores de las constantes del modelo de Peleg (MI) y del modelo empírico (MII) para la cinética de extracción de TPC a partir de GS.	145
Tabla 3. 16. Valores de las constantes del modelo de Peleg (I) y del modelo empírico (II) para la cinética de la CA de los extractos de GS.	150
Tabla 3. 17. ANOVA para la actividad de las enzimas fenilalanina amoníaco liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), el contenido de fenoles totales (TPC), el contenido de fenoles totales por HPLC (TPC _{HPLC}) y el contenido de agrimoniin (AGN).....	153
Tabla 3. 18. Cambios en la concentración de compuestos fenólicos individuales de RF.	163

Tabla 3. 19. Tratamiento óptimo de biofortificación de subproductos de frutilla (RF) y sus valores de respuesta experimentales y predichos.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3. 20. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de los subproductos de frutilla (RF).....	172
Tabla 3. 21. ANOVA para la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), compuestos fenólicos totales (TPC), contenido fenólico total por HPLC (TPC _{HPLC}) para el ensayo de biofortificación de GS	174
Tabla 3. 22. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de GS a 20 °C.	185
Tabla 3. 23. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de GS a 15 °C.	186
Tabla 3. 24. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de GS a 10°C.	187
Tabla 3. 25. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de GS a 5°C.	188
Tabla 3. 26. Coeficientes de correlación para diferentes variables implicadas en el proceso de biofortificación de GS.	191
Tabla 3. 27. ANOVA para la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), contenido de procianidina B2 (PACB2), contenido de fenoles totales (TPC), contenido de fenoles totales por HPLC (TPC _{HPLC}) para el biofortificación de GS.....	194
Tabla 3. 28. Variación porcentual de la actividad de la enzima fenilalanina amoníaco liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), contenido de fenoles totales (TPC y TPC _{HPLC}) en diferentes condiciones de biofortificación de la cáscara de manzana “Granny Smith” (GS).	195
Tabla 3. 29. Porcentaje de variación de los compuestos fenólicos individuales por efecto de la biofortificación con compuestos fenólicos de GS con UVA y corte.....	201
Tabla 3. 30. Análisis de correlación para las diferentes respuestas estudiadas en el proceso de biofortificación de GS con UVA y corte.....	202
Tabla 3. 31. Estabilidad gastrointestinal in-vitro de los compuestos fenólicos del subproducto de manzana “Granny Smith”.	205
Tabla 3. 32. Diseño Box-Behnken utilizando tres variables, junto con los valores observados y previstos para la constante de velocidad de Peleg (K1) y la constante de capacidad de Peleg (K2), derivados del modelo cinético de los compuestos fenólicos totales en RF.	207
Tabla 3. 33. ANOVA para la influencia de la condición del proceso en los parámetros cinéticos de la constante del modelo de Peleg para RF.	208
Tabla 3. 34. Coeficientes del modelo de Peleg para las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos totales de RF y su respectiva extracción control.	212
Tabla 3. 35. Estabilidad a la digestión in-vitro de los compuestos fenólicos del extracto de subproductos de frutilla.	221
Tabla 3. 36. ANOVA para la influencia de la condición del proceso en los parámetros cinéticos de la constante del modelo de Peleg para GS.	224
Tabla 3. 37. Diseño Box-Behnken utilizando tres variables, junto con los valores observados y previstos para la constante de velocidad de Peleg (K1) y la constante de capacidad de Peleg (K2), derivados del modelo cinético de los compuestos fenólicos totales en GS.....	223
Tabla 3. 38. Coeficientes del modelo de Peleg para las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos totales de GS y su respectiva extracción control.	228
Tabla 3. 39. Estabilidad a la digestión in-vitro de los compuestos fenólicos del extracto de subproductos de cáscara de manzana “Granny Smith”.	234

Tabla 3. 40. Rendimiento de los extractos obtenidos por ultrasonido y composición del bagazo derivado del proceso de extracción.	237
Tabla 3. 41. Estabilidad de las capsulas de alginato de sodio del extracto USRF-E durante el proceso de digestión in-vitro.	265
Tabla 3. 42. Estabilidad de las capsulas de alginato de sodio del extracto USGS-E durante el proceso de digestión in-vitro.	269

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Porcentaje de frutas y hortalizas descartadas en las distintas fases de la cadena agroindustrial para diferentes regiones del mundo. Adaptado de Clementine (2021).	32
Figura 1. 2. Estructura de la pared celular vegetal. Adaptado de Sundarraj & Ranganathan, (2017)	39
Figura 1.3. Factores que influyen en la respuesta de las plantas a los diferentes factores de estrés ambientales. Adaptado de Redondo-Gómez (2013).	44
Figura 1.4. Proceso de desarrollo del síndrome metabólico y el potencial efecto de los compuestos fenólicos.	52
Figura 1. 5. Extracción por percolación (adaptado de Mukherjee, 2019)	55
Figura 1.6. Extracción por reflujo (adaptado de Hidayat et al., 2019)	56
Figura 1.7. Sistemas ultrasónicos de uso común (A: baño de ultrasonido, B: reactor de ultrasonido con agitación, C: sonda de ultrasonido, D: sonicación continua con sonda de ultrasonido) (Adaptado de Chemat et al., 2017)	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1.8. Curva típica de extracción de compuestos fenólicos sólido-líquido por lotes. Adaptado de Chan et al. (2014).	68
Figura 2.1. Proceso agroindustrial donde se generan los residuos de (a) frutilla y (b) manzana “Granny Smith”.	75
Figura 2.2. Diagrama de flujo de los procesos de extracción de compuestos fenólicos y pectina de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’	78
Figura 2.3. Extracción de compuestos fenólicos por Soxhlet	79
Figura 2.4. Extracción por maceración.	81
Figura 2.5. Diagrama de la estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos de los residuos agroindustriales de frutilla (RF).	83
Figura 2.6. Diagrama de la estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos por estrés por corte en cáscara de manzana “Granny Smith” (GS).	83
Figura 2.7. Diagrama de la estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos de GS mediante la aplicación combinada de estrés por corte y radiación UVA.	85
Figura 2.8. Diagrama del proceso de obtención del extracto UAE rico en compuestos fenólicos liofilizado.	89
Figura 2.9. Diagrama del proceso de obtención de las distintas fracciones sometidas a ensayo en cultivo celular para: (a) RF y (b) GS	91
Figura 2.10. Diagrama del proceso de diferenciación celular 3T3-L1 en el ensayo de actividad de actividad antiobesogénica de GS y RF.	95
Figura 2.11. Proceso de encapsulación de extractos ricos en compuestos fenólicos de RF y GS.	96
Figura 3.1. Contenido fenólico total (TPC_{HPLC}) durante los diferentes pasos del proceso de extracción de pectina de la cáscara de la manzana ‘Granny Smith’.	115
Figura 3.2. Concentraciones de compuestos fenólicos para las diferentes etapas de la extracción de pectina de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’	116
Figura 3.3. Obtención de pectina a partir de la cáscara de manzana “Granny Smith”	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3.4. Compuestos fenólicos de subproductos de frutilla (RF) extraídos con a) agua (W) y b) 80% de etanol (EtOH).	124
Figura 3.5. Compuestos fenólicos de la cáscara de manzana (GS) ‘Granny Smith’ extraídos con a) agua (W) y b) 80% de etanol (EtOH).	128

Figura 3.6. Cinética de extracción de compuestos fenólicos (TPC) a partir de RF para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20 °C; (b) a 70 °C.....	136
Figura 3.7. Variación de la capacidad antioxidante (CA) de los extractos obtenidos a partir de RF para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20°C; (b) a 70°C.	139
Figura 3.8. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos de RF. a) obtenidos a 20° C. b) obtenidos a 70° C.....	142
Figura 3.9. Cinética de extracción de compuestos fenólicos a partir de GS para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20°C; (b) a 70°C.	147
Figura 3.10. Variación de la capacidad antioxidante (CA) de los extractos obtenidos a partir de GS para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20°C; (b) a 70°C.	149
Figura 3.11. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos de GS. a) obtenidos a 20°C. b) obtenidos a 70°C.	152
Figura 3.12. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) de subproductos de frutilla tratados con UVA durante su almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C y (c) 15°C.	156
Figura 3.13. Actividad polifenol oxidasa (PPO) de subproductos de frutilla tratados con UVA durante el almacenamiento a (a): 5°C, (b): 10°C, (c): 15°C.....	158
Figura 3.14. Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) de los subproductos de frutilla tratados con UVA durante su almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C, y (c) 15°C.	160
Figura 3.15. Concentración de agrimoniin (AGN) de los subproductos de frutilla tratados con UVA durante el almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 15°C.	166
Figura 3.16. Contenido fenólico total determinado por HPLC (TPCHPLC) de subproductos de frutilla tratados con UVA durante su almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C, y (c) 15°C.	168
Figura 3.17. Diagrama del efecto de la radiación UVA sobre los residuos agroindustriales de frutilla (RF).	169
Figura 3.18. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa a diferentes temperaturas de almacenamiento. a: 20°C. b: 15°C. c: 10°C. d: 5°C.	176
Figura 3.19. Actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de GS durante el almacenamiento a diferentes temperaturas: a) 20°C, b) 15°C, c) 10°C, y d) 5°C.	178
Figura 3.20. Variación del contenido fenólico total (TPC) de GS para distintos tipos de corte durante el almacenamiento a diferentes temperaturas a) 20°C, b) 15°C, c) 10°C, y d) 5°C.	181
Figura 3.21. Concentración de procianidina B2 (PACB2) de GS con diferentes tipos de corte durante el almacenamiento a diferentes temperaturas a) 20°C, b) 15°C, c) 10°C, y d) 5°C.	184
Figura 3.22. Variación del contenido fenólico total determinado por HPLC (TPC _{HPLC}) de GS con diferentes tipos de corte durante el almacenamiento a diferentes temperaturas a) 20°C, b) 15°C, c) 10°C, d) 5°C.	190
Figura 3.23. Concentración de compuestos fenólicos individuales en diferentes tratamientos. a) Radiación UVA3 (86.4 KJ/m ²), y b) Radiación UVA6 (172.8 KJ/m ²). C1: cáscara entera, C2: cáscara cortada 6 mm de ancho, C3: cáscara cortada 1.5 mm de ancho. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina.	199

Figura 3.24. Gráficos de superficie de respuesta de la constante de la velocidad de extracción de TPC (K1) del modelo de Peleg para. a) 20% potencia UAE; B) 60% potencia UAE; c) 100% potencia UAE para RF-N.	210
Figura 3.25. Gráficos de superficie de respuesta de la constante cinética de capacidad (K2) de TPC del modelo cinético de Peleg paraa) 20%US. b) 60%US c) 100%US para RF-N.	211
Figura 3.26. Datos experimentales y predichos por los modelos cinéticos de extracción del contenido de fenoles totales (TPC) durante la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y la extracción por maceración (MAE) de (a) RF-N, tejido residual de frutilla sin biofortificar (RF-N); y (b) RF-E tejido residual de frutilla biofortificado con compuesto fenólicos. ... Error! Marcador no definido.	
Figura 3.27. Perfil de compuestos fenólicos individuales y totales para diferentes procesos de extracción UAE y MAE de RF.....	217
Figura 3.28. Extracto liofilizado obtenido a partir del subproducto agroindustrial de frutilla biofortificado (RF-E) por asistencia de ultrasonido (UAE).	219
Figura 3.29. Gráficos de superficie de respuesta de la constante de la velocidad de extracción de TPC (K1) del modelo cinético de Peleg para a) 20%US. b) 60%US. c) 100%US para GS-N.....	226
Figura 3.30. Gráficos de superficie de respuesta de la constante cinética de capacidad (K2) de TPC del modelo cinético de Peleg para a) 20%US; b) 60%US; y c) 100%US para GS.	227
Figura 3.31. Datos experimentales y predichos por los modelos cinéticos de extracción del contenido de fenoles totales (TPC) durante la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y la extracción por maceración (MAE) de (a)cáscara de manzana sin biofortificar (GS-N); y (b) cáscara de manzana biofortificada con compuesto fenólicos (GS-E).	230
Figura 3.32. Perfil de compuestos fenólicos individuales y totales para diferentes procesos de extracción UAE y MAE de GS.	232
Figura 3.33. Extracto liofilizado obtenido a partir de cáscara de manzana biofortificada (GS-E) por asistencia de ultrasonido (UAE).....	233
Figura 3.34. Transformación circular de la agroindustria de a) Frutilla y b) Manzana “Granny Smith”.....	238
Figura 3.35. Determinación del IC ₅₀ en las líneas celulares HDFa y Cáncer.	239
Figura 3. 36. Efecto de los extractos digeridos de los residuos agroindustriales de frutilla (RF) (A). Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH; (B) Inhibición de la producción celular de óxido nítrico (% NOX).	241
Figura 3. 37. Determinación del IC ₅₀ de USRF en las líneas celulares HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Caco-2: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.	243
Figura 3. 38. Efecto del tratamiento de biofortificación con compuestos fenólicos y extracción asistida por ultrasonido sobre el IC ₅₀ para RF en células HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: Línea celular de adenocarcinoma.....	244
Figura 3. 39. Efecto de los extractos UAE digeridos de los residuos agroindustriales de frutilla (USRF) (a) Inhibición de la producción de células de óxido nítrico (NOX) (%). (b) Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH.	246
Figura 3. 40. Efecto de la biofortificación y la UAE de los extractos digeridos de los residuos agroindustriales de frutilla (RF) sobre a) Porcentaje de actividad antioxidante celular. (%CAA); b) Potencial inhibitorio de NOX (%NOX) de los distintos tratamientos de RF ..	247

Figura 3. 41. Efecto de los compuestos fenólicos de RF en el porcentaje de lípidos medidos en células 3T3-L1.....	249
Figura 3. 42. Fotografías de la línea celular 3T3-L1 bajo el efecto de los distintos tratamientos con RF.....	250
Figura 3. 43. Valores IC ₅₀ de los extractos digeridos de GS-N y GS-E para las líneas celulares HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Caco-2: línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.	251
Figura 3. 44. Efecto de los extractos digeridos de cáscara de manzana (GS) (a) Inhibición de la producción celular de óxido nítrico (NOX). (b) Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH.	253
Figura 3. 45. Valores IC ₅₀ de USGS para las líneas celulares HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Caco-2: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.	255
Figura 3. 46. Efecto del tratamiento de biofortificación con compuestos fenólicos y extracción asistida por ultrasonido sobre el IC ₅₀ para GS.	256
Figura 3. 47. Efecto de los extractos UAE digeridos de la cáscara de manzana (USGS) (a) Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH. (b) Inhibición de la producción celular de óxido nítrico (NOX).....	257
Figura 3. 48. Efecto de la biofortificación y la UAE de los extractos digeridos de cáscara de manzana (GS) sobre a) Porcentaje de actividad antioxidante celular. B) Potencial inhibitorio de NOX de los distintos tratamientos de GS.	259
Figura 3. 49. Efecto de los compuestos fenólicos de GS en el porcentaje de lípidos medidos en células 3T3-L1.....	261
Figura 30.50. Fotografías de la línea celular 3T3-L1 bajo el efecto de los distintos tratamientos con GS.	261
Figura 3.51. Microcápsulas de extracto USRF-E. a) filtradas y lavadas. B) Secadas	263
Figura 3.52. Micrografías a diferentes aumentos de las microcápsulas de alginato con extracto de RF-E.	264
Figura 3.53. Microcápsulas de extracto USGS-E. a) filtradas y lavadas. B) Secadas	267
Figura 3.54. Micrografías a diferentes aumentos de las microcápsulas de alginato con extracto de GS-E.....	268

ABREVIATURAS

%CAA: Porcentaje de actividad antioxidante celular
%EE: Porcentaje de eficiencia de encapsulación
%NOX: Porcentaje de inhibición de óxido nítrico
(-)EPQN: Epicatequina,
(+)CTQN: Catequina
Ac: Acetona 80%
ACL: Ácido clorogénico,
AE: Etapa obtención de pectina posterior a la extracción de compuestos fenólicos
AGE: Ácido galico equivalente
AGN: Agrimoniin
BE: Etapa de obtención de pectina previa a la extracción de compuestos fenólicos
BF: Solución biliar
BHDP: Isómero bis-HHDP-glucosa
bHLH: Bucle hélice-bucle hélice básico
BS: base seca
 C_{∞} : Concentración de compuestos fenólicos totales, a tiempo infinito
CA: Capacidad antioxidante por DPPH*
Cd: Constante de capacidad en la etapa de difusión
CFA: Concentración de ácido fórmico
COP1: Ubiquitina ligasa
Cp: Capacidad calorífica
CRY: Receptores de citocromo
Cw: Constante de capacidad en la etapa de lavado
DAD: Detector de arreglo de diodos
De: Difusividad efectiva
DE: Grado de esterificación
Dex: Dexametasona
DF: Fase duodenal
DP: Cáscara de manzana GS seca
DRT: Tejido residual seco obtenido tras la extracción de compuestos fenólicos
dT/dt: Cambio de la temperatura por unidad de tiempo
EA: Ácido elágico libre
EAP: Ácido elágico pentóxido
EEA: Comisión europea de ambiente
ES: Etapas de extracción

EtOH: Etanol 80%

EW: Peso equivalente de la pectina

FESEM: Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo

FG: Fase gástrica

FI: Fase intestinal

Fib: Fibroblastos dérmicos humanos primarios, adultos

FLN: Floretina

FS: Fase salival

GS: Residuo agroindustrial de cáscara de manzana “Granny Smith”

GS-E: Residuo agroindustrial de cáscara de manzana “Granny Smith” con biofortificación

GS-N: Residuo agroindustrial de cáscara de manzana “Granny Smith” sin biofortificación

H: la velocidad inicial de extracción

HMP: Pectinas de alto metoxilo

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

HSP: Proteínas de choque térmico

HY5: Hipocótilo alargado-5

IBMX: Isobutil-metil-xantina

JA: Ácido jasmonico

K1: Constante de velocidad de extracción

K2: Constante de capacidad

K3G: Kaempferol-3-glucuronido

KCH: kaempferol-cumaroil hexóxido

Kd: Contante de velocidad en la etapa de difusión

Kf: Coeficiente de transferencia de masa

Kw: Constante de velocidad en la etapa de lavado

LEI: Detector de electrones secundarios

LMP: Pectinas de bajo metoxilo

LPS: Lipopolisacáridos.

MAE: Extracción sin ultrasonido

MC: Contenido de metoxilo

MeOH: Metanol 80%

MI: Modelo de Peleg

MIAE: Extracción asistida por microondas

MII: Modelo empírico

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NBCS: Suero de ternero recién nacido

NO: Óxido nítrico

OGA: Oligogalacturónidos

P: Potencia

PACB2: Procianidina B2

P3G: Pelargonidina3-o-glucurónido

PACT: Procianidina tetrámero,

PAL: Enzima fenilalanina amoníaco liasa

PAR1: Proteasa-activada

PAs: Poliaminas

PB: Buffer fosfato

PCH: Procianidina Hexóxido

PHOT: Receptores de fototropina

PLE: Extracción por líquidos presurizados

PNA: polisacáridos no almidón

PPO: Enzima polifenoxidasas

PT: Trímero de procianidina

QP: Quercetina pentóxido

Q3G: Quercetina-3-glucuronido

QE: Quercetina equivalente

QHS: Quercetina hexóxido

R: Relación sólido-líquido

RBE-US: Tejido residual de la extracción de pectina obtenida por US.

RF: Residuo agroindustrial de frutilla

RF-E: Residuo agroindustrial de frutilla biofortificado con compuestos fenólicos

RF-N: Residuo agroindustrial de frutilla sin biofortificación con compuestos fenólicos

ROS: Especies reactivas al oxígeno

RSM: Metodología de superficie de respuesta

RSME: Error cuadrático medio

S: Solvente

SA: Ácido salicílico

SFE: Extracción con fluidos super críticos

SG: Saguinn

ST: Temperatura de almacenamiento

TF: Contenido de flavonoides totales

TGI: Tetragaloil glucosa Isómero

TM: Tiempo de almacenamiento

TNF: Factor de necrosis tumoral

TPC: Contenido total de compuestos fenólicos

TPC_{HPLC}: Compuestos fenólicos individuales determinados por HPLC

TR: Proceso convencional de obtención de pectina

UI: Intensidad ultrasónica

US: Ultrasonido

UAE: Extracción asistida por ultrasonido

UV: Radiación ultravioleta

UVA: Radiación ultravioleta A

UVR8: Locus de resistencia a los rayos UV

W: Agua 100%

ΔA : Delta de absorbancia

RESUMEN

La generación de subproductos de la industria frutihortícola plantea un desafío significativo para países en desarrollo como Argentina, donde la industria de frutas y hortalizas es vital desde el punto de vista económico. La cantidad creciente de residuos, especialmente de la agroindustria de frutillas (RF) y manzanas (GS), representa una grave problemática ambiental, económica y social, ya que actualmente terminan en los rellenos sanitarios. Sin embargo, estos subproductos se pueden revalorizar gracias a que contienen compuestos fenólicos bioactivos de gran interés. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue identificar y cuantificar el contenido de compuestos fenólicos de los subproductos del acondicionamiento y procesamiento industrial de frutillas y manzanas, e incrementar su potencial bioactivo mediante la aplicación de estreses abióticos, modelando y optimizando la extracción de compuestos fenólicos por medio del uso de tecnologías tradicionales y emergentes usando solventes eco-amigables; y finalmente, estudiar su bioaccesibilidad y potencial bioactivo *in-vitro*. Para GS, se estudió la extracción secuencial de compuestos fenólicos totales (TPC) y pectina. Para ambas matrices, se modeló la cinética de extracción por maceración considerando el efecto del tipo de solvente (Agua, W y etanol 80%, EtOH), la relación sólido-líquido (S/L 1:20, 1:30 y 1:40 p/v) y la temperatura (20°C y 70°C), determinando TPC y capacidad antioxidante (AC), analizando el perfil final de compuestos fenólicos (HPLC-DAD). Se utilizó la extracción por Soxhlet como referencia. En la biofortificación de frutillas, se evaluó el efecto de la dosis de radiación UVA, considerando temperaturas y tiempos de almacenamiento. Para GS, se estudió el estrés abiótico por corte, temperatura y tiempo de almacenamiento, así como también una estrategia combinada de corte y radiación UVA. Posteriormente, se optimizaron las condiciones de extracción por ultrasonido (UAE) mediante un diseño de Box-Behnken, y ajustando los resultados al modelo de Peleg, evaluando %EtOH, S/L y porcentaje de potencia del ultrasonido (%US). Posteriormente, se evaluó la bioaccesibilidad *in-vitro* de los extractos ricos en compuestos fenólicos, determinando la actividad anti-proliferativa en líneas celulares de cáncer de colon (HT29 y Caco-2), actividad antiinflamatoria (%NOX), la actividad antioxidante celular (%CAA) y la actividad antidipogénica. El sistema de extracción secuencial de pectina y TPC de GS con acetona 80% mostró el mayor TPC (3.47 g AGE/Kg). La biofortificación de RF con radiación UVA aumentó la actividad de la enzima PAL en un 260% y el contenido fenólico en un 240%. En GS, la estrategia de biofortificación combinando corte y radiación UVA fue la más efectiva, aumentando PAL, PPO, TPC y TPC_{HPLC}. En la extracción de compuestos fenólicos en condiciones óptimas se obtuvieron extractos con 117 g AGE/Kg para frutilla y 28.3 g AGE/Kg para GS. La bioaccesibilidad mejoró con la biofortificación, mostrando incrementos del 9.8% al 25% para la frutilla y del 42% para GS. Los extractos UAE de ambos tejidos biofortificados

(USRF-E y USGS-E) mostraron un potencial anticancerígeno, con IC_{50} de 2.4-12.8 mg/mL para HT29 y de 3.4-3.8 g/mL para Caco-2. Adicionalmente, mostraron la mayor %NOX con 42 y 43% para USRF-E y USGS-E, respectivamente; y capacidad antioxidante celular (%CAA) de 74% para USRF-E y 68% para GS-E. Además, con reducciones del 15-19% en la adipogénesis con USRF-N (sin biofortificar) y USGS-E. La aplicación de radiación UVA, estrés por corte y la UAE demostraron ser estrategias eficientes, aumentando significativamente el contenido y recuperación de fenoles de RF y GS. La bioaccesibilidad mejorada y las propiedades bioactivas mostradas por los extractos, resaltan el potencial nutracéutico de estos subproductos, validando una perspectiva valiosa para la industria frutihortícola a través de nuevas fuentes de compuestos beneficiosos para la salud de los consumidores, fortaleciendo la cadena agroalimentaria y promoviendo prácticas sostenibles y circulares.

ABSTRACT

The production of by-products in the fruit and vegetable industry presents a substantial challenge for developing nations like Argentina, where the fruit and vegetable sector is economically crucial. The increasing volume of waste, particularly from the strawberry (RF) and apple (GS) agro-industries, constitutes a significant environmental, economic, and social issue, as it is mainly disposed of in landfills. Nevertheless, these by-products hold potential for revaluation due to their content in bioactive phenolic compounds, which are of health interest. Consequently, the primary objective of this thesis was to identify and quantify the phenolic compound content in by-products resulting from the industrial processing of strawberries and apples. Additionally, the aim was to enhance their bioactive potential by applying abiotic stresses, modeling, and optimizing the extraction of phenolic compounds through both traditional and emerging technologies and employing eco-friendly solvents. Finally, the thesis researched the extracts' bioaccessibility and in-vitro bioactive potential. For GS, the research involved the determination of the appropriate sequence of extraction of total phenolic compounds (TPC) and pectin. Soxhlet extraction was tested as the reference method. The extraction kinetic by maceration was modeled, considering the effect of the type of solvent (Water, W, and ethanol 80%, EtOH), the solid-liquid ratio (S/L: 1:20, 1:30, and 1:40 w/v), and the temperature (20°C and 70°C), determining TPC and antioxidant capacity (AC), and analyzing the final profile of phenolic compounds (HPLC-DAD). Different UVA radiation doses were assayed with different temperatures and storage times for RF biofortification. The abiotic stress induced by cutting was evaluated for GS during storage time at various temperatures. A combined strategy involving cutting and UVA radiation was also analyzed. The ultrasound-assisted extraction (UAE) of phenolic compounds was optimized through a Box-Behnken design and fitting the results to Peleg's model, assessing %EtOH, S/L, and the percentage of ultrasound power (%US). Subsequently, in-vitro bioaccessibility of the extracts rich in phenolic compounds was evaluated, determining the anti-proliferative activity in colon cancer cell lines (HT29 and Caco-2), anti-inflammatory activity (%NOX), cellular antioxidant activity (%CAA), and anti-adipogenic activity. For GS, the sequential pectin and TPC extraction system, employing 80% acetone, had the highest TPC (3.47 g AGE/kg). RF biofortification with UVA radiation increased PAL enzyme activity (260%) and phenolic content (240%). In GS, the most effective biofortification strategy was the combination of cutting and UVA radiation, increasing PAL, PPO, TPC, and TPC_{HPLC}. The TPC, obtained at optimal extraction conditions, was 117 g AGE/kg for RF and 28.3 g AGE/kg for GS. Bioaccessibility of phenolic compounds improved with biofortification, with increases from 9.8% to 25% for RF and 42% for GS. The UAE extracts from biofortified tissues (USRF-E and USGS-E) demonstrated anticancer potential with IC₅₀ values of 2.4-12.8 mg/mL for HT29 and 3.4-3.8 g/mL for Caco-

2. The highest %NOX obtained was 42% for USRF-E and 43% for USGS-E, respectively, and a cellular antioxidant capacity (%CAA) of 74% for USRF-E and 68% for GS-E. Furthermore, there were 15-19% reductions in adipogenesis with USRF-N (without biofortification) and USGS-E. The UVA radiation, the shear stress, and UAE proved to be efficient strategies, significantly enhancing the phenol content and the recovery of phenolic compounds from RF and GS. The improved bioaccessibility and the bioactive properties shown by the extracts highlight the nutraceutical potential of these by-products, validating a valuable perspective for the fruit and vegetable industry through new sources of compounds beneficial to consumers' health, fortifying the agri-food chain and promoting sustainable and circular practices.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La agroindustria de las frutas, hortalizas y sus residuos

El consumo frecuente de frutas y verduras en la dieta del hombre es fundamental, gracias al aporte de nutrientes esenciales y no esenciales tales como, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y metabolitos secundarios aportando no solo a una adecuada nutrición, sino que también presentan una gran variedad de beneficios a la salud (Babarinde et al., 2015). No obstante, se estima que cerca de una tercera parte de la producción mundial de frutas y hortalizas se pierden o se desperdician luego de su cosecha (FAO, 2021). En la etapa de consumo, los desperdicios generados por los hogares también son significativos, tal como se reporta para la unión europea (UE), en los hogares se pueden llegar a generar cerca de 101 Kg residuos/persona/año (Priefer et al., 2016), siendo un foco importante para tratar para el control de los residuos y desperdicios alimentarios. Sin embargo, se estima que el procesamiento industrial de frutas y hortalizas genera cantidades mayores de residuos, 189 kg residuos/persona/año (De Laurentiis et al., 2018), que corresponden a las partes no comestibles (cáscaras, semillas, tallos, hojas etc.), o productos que están por fuera de los parámetros de calidad. Adicionalmente, gran parte de estos residuos no tienen una adecuada disposición final, generando como consecuencia graves impactos ambientales, sociales y económicos (Glaucus et al., 2019). La creciente demanda de productos frutihortícolas también ha logrado generar un crecimiento del sector agroindustrial, donde dichas actividades han desencadenado un aumento dramático en los subproductos que allí se generan, llegando a ser cerca de 40 millones de toneladas por año (Mendoza Vargas et al., 2017). El 10% provienen de la producción primaria y un 19% en la elaboración de productos procesados, 21% en la distribución y el restante en las etapas de consumo y venta (Stenmarck et al., 2016) variando según cada región, como se observa en la Figura 1.1. Estos residuos son diversos y se generan principalmente en las etapas de selección, clasificación, pelado y corte, por ende, pueden presentar distinta composición y funcionalidad (Abdel-Shafy & Mansour, 2018). La disposición final de estos tejidos vegetales de descarte se ha convertido en una problemática cada vez más difícil de manejar, ya que actualmente, se disponen en los rellenos sanitarios de las ciudades especialmente en países en vías de desarrollo donde los controles y procesos de producción carecen de estandarización (Abdel-Shafy & Mansour, 2018). Generalmente, dentro de la composición de los residuos agroindustriales, podemos encontrar fuentes de celulosa, lignina, fibra, gomas, vitaminas, metabolitos secundarios como los carotenos, terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos (Mourtzinou & Goula, 2019; Sánchez et al., 2010).

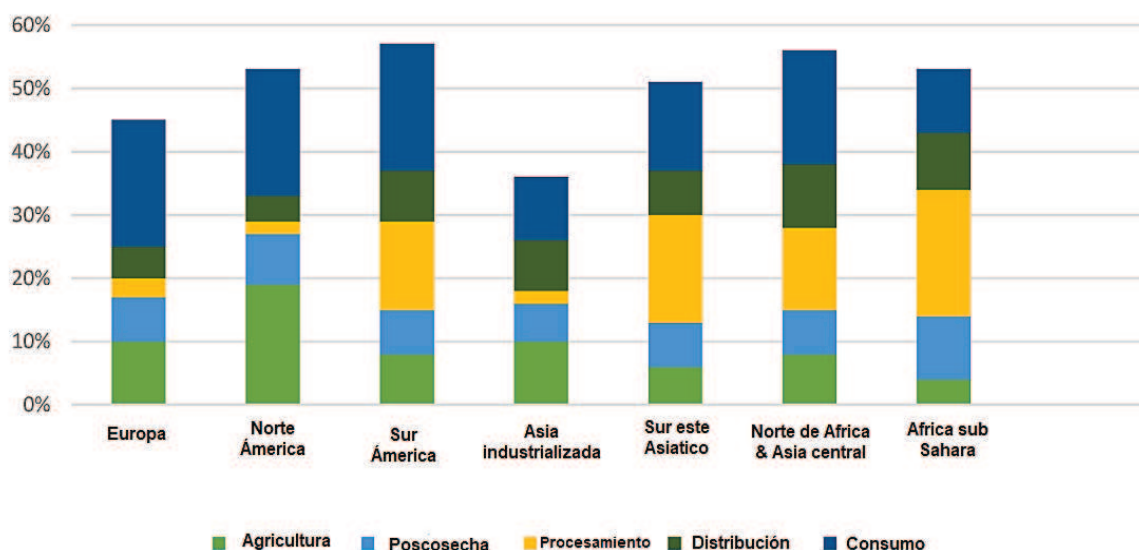


Figura 1.1. Porcentaje de frutas y hortalizas descartadas en las distintas fases de la cadena agroindustrial para diferentes regiones del mundo. Adaptado de Clementine (2021).

Actualmente, los residuos agroindustriales son un gran desafío para la sostenibilidad de nuestro planeta, pero también una gran oportunidad para la economía circular. Numerosas investigaciones están explorando la posibilidad de revalorizar estos residuos con el fin de obtener nuevos compuestos de alto valor agregado como es el caso del café. Esquivel & Jiménez (2012) estudiaron la funcionalidad de los residuos del procesamiento del café encontrando un 12% de polifenoles, siendo el ácido clorogénico el compuesto mayoritario. Para la cáscara de mango cv 'Ataulfo', Mercado-Mercado et al. (2018) reportaron 3.6 mg/g de β -carotenos. Para los residuos del proceso de la pimienta se extrajo la alcalamida, un alcaloide con efectividad como analgésico (Rios & Olivo, 2014). Por otro lado, Buřičová et al. (2011) reportaron que las infusiones de pedúnculos de la frutilla presentaron un 20% de mayor actividad antioxidante en comparación con las hojas de té verde. Todo esto resalta que las partes no comestibles o procesables de frutas y hortalizas en ocasiones pueden presentar mejor composición y bioactividad en comparación con las fuentes tradicionales de compuestos bioactivos. En particular, se está orientando las investigaciones y desarrollos a los compuestos fenólicos, que se encuentran en muchos residuos agroindustriales y que tienen un gran potencial en campos como la alimentación, la cosmética o la farmacología (Güzel & Akpınar, 2019; K. Kumar et al., 2021). Las distintas estrategias de revalorización de los residuos agroindustriales pueden contribuir a reducir la huella medioambiental del sector y generar nuevas oportunidades de negocio a través de una bioeconomía circular de las cadenas agroalimentarias.

1.2. Economía circular en la agroindustria de frutas y hortalizas

El crecimiento de los residuos y desperdicios generados en las agroindustrias y sus impactos negativos ambientales, han generado que se establezcan directrices para mitigar esta huella ambiental negativa (Maina et al., 2017). La comisión europea de ambiente (EEA) ha establecido el objetivo de promover la eficiencia en el uso de los recursos y la menor huella de carbono en todas las actividades realizadas. En este marco, se ha introducido el concepto y la metodología de la economía circular y la bioeconomía como modelos de sistema para superar el modelo dominante de desarrollo económico "tomar, hacer y desechar" y administrar la sostenibilidad ambiental (Campos et al., 2020). La bioeconomía circular se sustenta en una serie de principios interconectados que convergen en la creación de un sistema económico y ambientalmente sostenible. Desde la utilización responsable de los recursos biológicos y el diseño de productos y procesos sostenibles hasta la reutilización y reciclaje de materiales, estos principios buscan optimizar la cadena de valor de la biomasa. Además, mediante la adopción de un enfoque en cascada y la promoción de modelos circulares de producción y consumo, se aspira a minimizar la generación de residuos y maximizar la eficiencia en la utilización de los recursos (Birner, 2017). La colaboración entre diversos actores y la innovación tecnológica son pilares fundamentales en la implementación exitosa de la bioeconomía circular, a la vez que se considera la disponibilidad local de biomasa y los desafíos logísticos para garantizar un enfoque verdaderamente sostenible que tenga en cuenta tanto la viabilidad económica como los impactos ambientales. La investigación y la innovación son fundamentales para identificar nuevas formas de utilizar y transformar los recursos biológicos de manera más eficiente y sostenible (Maina et al., 2017).

Para 2018, la base de datos *ScienceDirect* albergaba 3342 archivos de investigaciones relativas a la economía circular. En cuanto a la economía circular y los subproductos del sector agroindustrial, se encontraron 437 publicaciones, de las cuales 73 se publicaron en 2018 (25 revisiones, 33 artículos de investigación, 7 capítulos de libros, etc.). Las palabras clave más utilizadas en este campo fueron biorrefinería, bioeconomía y desarrollo sostenible (Campos et al., 2020). La economía circular ha recibido una atención considerable en el ámbito científico, como pioneros en el desarrollo de estrategias novedosas hacia la aplicación de la economía circular en el debate político sobre gestión de residuos y recursos en los últimos años.

La bioeconomía circular se fundamenta en el principio de cerrar el ciclo de vida de los productos, maximizando el valor de los recursos y minimizando la generación de residuos. En el contexto de la industria de las frutas y hortalizas, esto implica la adopción de enfoques innovadores para reducir, reutilizar, reciclar y valorizar los residuos generados

durante la producción, procesamiento y distribución de estos alimentos (Uthpala et al., 2021). Esto implica la reparación, el reacondicionamiento y la actualización de productos para extender su vida útil.

La implementación de la economía circular se puede dar a nivel micro, donde en una empresa o compañía se adoptan los principios de la economía circular. Por otro lado, se puede dar a nivel meso donde se crean parques eco-industriales con una simbiosis entre los procesos de cada empresa presente. También se puede dar a nivel macro cuando, ciudades o provincias completas adoptan medidas para implementar en todo su territorio medidas a nivel micro y meso (Campos et al., 2020).

Los residuos agroindustriales están constituidos por diversos compuestos con potencial funcional y nutracéutico, que pueden ser recuperados y aplicarse en las diferentes industrias; en su mayoría están compuestos por lignocelulosa, fuente importante de fibra (Ravindran et al., 2018) y también son fuentes de otros numerosos compuestos bioactivos (Giroto et al., 2015; Mordi et al., 2016). En 2022, según el ministerio de economía de Argentina, el país produjo cerca de 7 millones de toneladas de frutas, de las cuales 420.000 fueron manzanas y unas 45-50 mil toneladas fueron de frutillas (Ministerio de economía, 2023) ambas frutas son de consumo masivo, tanto en fresco como en productos procesados, por sus propiedades organolépticas y nutricionales; (Chordi, 2014; Montero et al., 2013). Su procesamiento industrial genera un gran porcentaje de los residuos agroindustriales que actualmente terminan en su mayoría en los rellenos sanitarios de las provincias productoras.

1.3. Agroindustria de la frutilla

La cadena agroindustrial de la frutilla es una de las más importantes a nivel local y mundial. La frutilla pertenece a la familia *Rosaceae* del género *Fragaria*, donde encontramos predominantemente la *Fragaria × ananassa* Duch a nivel comercial. La producción mundial de frutilla es de aproximadamente 8.000.000 toneladas por año. En Sudamérica, Brasil, Argentina y Chile son los principales productores con 320.000 toneladas por año con un crecimiento dinámico. Argentina ocupa el puesto 34 en la producción mundial, produciendo 50.000 toneladas, y ocupa el lugar 17 en las exportaciones, estas últimas han aumentado exponencialmente. Los aumentos se deben principalmente a mejoras en las estrategias de producción de cultivos, donde los sistemas multivarietales y el uso de los macro y micro túneles han mejorado los rendimientos y la calidad del fruto (Axel, 2016; Sordo et al., 2017)

En Argentina, para garantizar una amplia cobertura del mercado durante el año se producen diferentes tipos de variedades de frutilla de producción temprana, intermedia o

tardía, tales como ‘Camarosa’ el cual es uno de los cultivares tradicionalmente producidos localmente. Entre los cultivares de día corto para las temporadas de otoño-invierno-primavera, se pueden nombrar a ‘Sabrosa’, ‘Ventana’, ‘Camino Real’, ‘Festival’, ‘Fortuna’ y ‘Splendor’. Por otro lado, existen cultivares de día neutro para las temporadas de otoño-primavera, como ‘Aromas’, ‘Albion’ y ‘San Andreas’ (Axel, 2016). La amplia disponibilidad de esta fruta hace que su procesamiento industrial sea cada vez más rentable, a través de la producción de frutilla congelada IQF, mermeladas, pulpas y jugos, entre otros. Al mismo tiempo, la cantidad de residuos generados por esta actividad aumenta, representando hasta el 20% de la producción total (Villamil-Galindo et al., 2020). Estos tejidos de descarte de la planta y fruto consisten principalmente en los sépalos, los tallos, hojas y parte de la fruta restante. No obstante, estos residuos agroindustriales pueden proponerse como una fuente de compuestos bioactivos y funcionales, ya que su composición incluye metabolitos de gran interés, como los compuestos fenólicos. Según (Gündüz, 2015), las diferentes partes de la planta de frutilla pueden mostrar un perfil de compuestos fenólicos diferente caracterizado por la presencia de elagitaninos, flavonoides y ácidos fenólicos. Por ejemplo, el ácido elágico fue el compuesto principal en la raíz y la flor de la planta de frutilla, seguido de quercetina-3-O-glucósido (Zhu et al., 2015). La distribución de estos metabolitos es diversa y característica de cada cultivar de frutilla (Buendía et al., 2010; Van de Velde et al., 2019). En este sentido, las frutillas de la variedad ‘Camarosa’ presentaron un contenido más alto de antocianinas que las frutillas variedad ‘Selva’, mientras que estas últimas mostraron un contenido más alto de ácido elágico (Van De Velde et al., 2013). Sin embargo, no se tiene pleno conocimiento de la variación en el perfil de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en los tejidos vegetales que componen los subproductos agroindustriales de frutilla según el cultivar del que provienen. Estos tejidos vegetales de descarte no aprovechados de la planta pueden tener diferentes cantidades y contenidos de compuestos fenólicos con un gran potencial bioactivo.

1.4. Agroindustria de la manzana

La manzana es una fruta pomácea, producida por el árbol conocido como manzano (*Malus domestica* Borkh) de la familia de las *Rosaceae*. El género *Malus* tiene más de 25 especies, sin embargo, la especie más comercializada a nivel global es *Malus Domestica* cuyo consumo humano data de hace miles de años, por ello, su producción es de gran importancia a nivel mundial (Watkins et al., 1989). Según datos de FAOSTAT (2021) la producción mundial de manzana fue de 93.14 millones de toneladas, de las cuales el 66% se produce en Asia, el 19.7% en Europa y el 9.8% en América. Destacándose como países productores China (46M T), Estados Unidos (4.5M T) y Turquía (4.5M T). Argentina participó con 514 mil T de manzanas en el 2021, donde la mayor producción se concentra

en las provincias de Río Negro, Neuquén y Mendoza, exportando más de 100 mil toneladas de fruta fresca, principalmente a Brasil, Estados Unidos y Rusia.

La manzana pertenece a las frutas climatéricas, su pico de respiración correlaciona con el de producción de etileno, desencadenando diversas reacciones que en función del tiempo van modificando sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales (Faicán et al., 2018). Dentro de las variedades más importantes a nivel agroindustrial encontramos las manzanas cv. 'Granny Smith'. Esta variedad fue descubierta en Australia en 1868, no obstante, fue hasta la década de los 70's que se comercializó a nivel mundial, gracias a su color característico verde y su practicidad en distintas preparaciones (Spengler, 2019). Las manzanas presentan una composición balanceada que varía entre variedades, en términos generales este fruto presenta un contenido de agua del 84% donde se encuentran disueltos diversos minerales de gran importancia biológica, tales como, Mg, K, Zn, elementos traza como, Cu Fe, F; además de una gran abundancia del complejo de vitaminas B (Feliciano et al., 2010). Por otra parte, entre un 13 a un 16% hace parte los carbohidratos, donde el contenido de fibra (aproximadamente 3%) es correspondiente a compuestos pecticos, celulosa, hemicelulosa y lignina, posicionando a la manzana como una de las frutas frescas con mayor aporte de fibra (Vasile et al., 2021). Las proteínas (0.5%) y los lípidos (0.3%) tienen un bajo aporte nutricional y energético en esta fruta (Agnolet et al., 2017).

El consumo frecuente de manzana se ha asociado con diferentes beneficios para la salud, tales como el control del peso corporal, enfermedades cardiovasculares, disfunciones respiratorias y cáncer de hígado, pulmón, próstata, entre otros (Kalinowska et al., 2014; Wolfe et al., 2003). Diversas investigaciones han sugerido que las propiedades bioactivas de las manzanas se deben a su amplio contenido de fibra, tanto soluble como insoluble las cuales presentan diferentes comportamientos en el metabolismo humano. Por otro lado, también el alto contenido de metabolitos secundarios con propiedades bioactivas, especialmente al alto contenido en compuestos fenólicos, ya que estos compuestos son producto de metabolismo secundario de las plantas, con diversas funciones de protección y reparación en las plantas, cuyo consumo habitual por el ser humano ha mostrado altas actividades biológicas benignas, gracias a sus diversas estructuras que le confiere la capacidad de neutralizar radicales libres por la donación de electrones de su grupo hidroxilo, así como de la activación de los mecanismos naturales de neutralización presentes en el cuerpo humano (de Souza et al., 2021; Paško et al., 2019). No obstante, las propiedades nutricionales y nutraceuticas de las manzanas varían significativamente de acuerdo con cada variedad, estado de madurez, tipo y lugar de producción, condiciones medio ambientales, manejo postcosecha, etc. En el mercado se encuentra una amplia gama de manzanas con distintas coloraciones que van desde las rojas, las que presentan

bitono y las verdes, esta pigmentación varía de acuerdo con el componente principal en las células de la epidermis ya que las antocianinas predominan en las manzanas rojas, los carotenoides en las manzanas bitonos con coloraciones verde-amarillo, y la clorofila en las manzanas verdes (Delgado-Pelayo et al., 2014).

Dentro de los grupos de compuestos fenólicos más recurrentes en las distintas variedades de manzanas se destacan, los ácidos fenólicos, como el ácido hidroxicinámico y el ácido clorogénico, los flavan-3-ols como las procianidinas y las antocianinas, los flavonoles como la quercetina y el kaempferol, y las dihidrochalconas como la floretina (Feliciano et al., 2010). No obstante, el perfil de compuestos fenólicos varía en función del genotipo, las distintas partes de la manzana y las condiciones agroecológicas de producción. En variedades como la 'Red Delicious' el contenido de ácido clorogénico varía de 113-157 mg Kg⁻¹ en la cáscara, a 63-106 mg Kg⁻¹ en la pulpa. Para la variedad 'Golden Delicious' el contenido de ácido clorogénico varía entre 17-37 mg Kg⁻¹ en la cáscara a 29-57 mg Kg⁻¹ en la pulpa (Kalinowska et al., 2014).

Los factores externos modulan la respuesta del sistema metabólico secundario de los frutos, que sintetiza los compuestos fenólicos, con una variación significativa según las condiciones externas de manejo de esta fruta. Viendo así, que la manzana es un fruto que representa una fuente variada e importante de compuestos antioxidantes como lo son los compuestos fenólicos. Por ello, se han desarrollado varias investigaciones con el fin de caracterizar la influencia del genotipo y diferentes condiciones de cultivo sobre el perfil de compuestos fenólicos, de esta forma orientar a los productores mundiales no solo con variedades de alta productividad si no también con un alto potencial bioactivo que pueda satisfacer las nuevas tendencias de consumo con productos con grandes aportes a la salud de los consumidores de manera natural (Van der Sluis et al., 2001). Dhyani et al. (2018) caracterizaron el perfil de compuestos fenólicos de las variedades 'Red Delicious', 'Royal Delicious' y 'Golden Delicious' encontrando diferencias altamente significativas, además de evidenciar la correlación de la floridzina (una chalcona) y la epicatequina con la actividad antioxidante determinada por la metodología de ABTS.

El amplio consumo de manzana ha permitido que su agroindustria crezca con una diversidad de productos como lo son las bebidas refrescantes, bebidas alcohólicas, pulpas, snacks, y fruta mínimamente procesada, entre otros. Sin embargo, de esta cadena agroindustrial se derivan una cantidad sustancial de residuos no evitables como la cáscara, las semillas y el corazón, que representan entre el 16 y el 36% (Garcia-Amezquita et al., 2018; Piagentini & Pirovani, 2017). Generalmente, se ha reportado que la composición de los subproductos agroindustriales de frutas contiene 30-80% de carbohidratos, 10-60% de

fibra dietética, 1-6% de proteínas, 2-6% de cenizas, 2% de lípidos y 6-10% de otros compuestos (Moreno-González & Ottens, 2021; Perussello et al., 2017). Los subproductos agroindustriales de manzana contienen diversos compuestos de alto valor, como pectina, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, monosacáridos y carotenoides (Henríquez et al., 2014; Kalinowska et al., 2014; Massini et al., 2016). Los carbohidratos son los componentes principales de estos residuos, los cuales, dependiendo de su funcionalidad se pueden clasificar en dos grupos: carbohidratos de almacenamiento (almidón) y los carbohidratos de la pared celular. Sin embargo, en los frutos los carbohidratos derivados del almidón son los mayoritarios, los remanentes se consideran como 'polisacáridos no almidón' (PNA) (BeMiller, 1986). Dentro de los PNA encontramos diversas estructuras de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos formando estructuras como la celulosa, hemicelulosa y pectina (Dranca & Oroian, 2018), como se ilustra en la Figura 1.2.

La pectina es uno de los carbohidratos con mayor interés en la industria de los alimentos gracias a sus propiedades funcionales y bioactivas. El mercado global de la pectina tiene un valor cercano al billón de dólares con crecimiento constante año tras año, y las principales fuentes de pectina son los residuos del procesamiento de cítricos, el orujo del procesamiento de manzanas y remolacha (Bush, 2014). La pectina corresponde a un diverso grupo de polisacáridos que se encuentran ampliamente distribuidos en las paredes celulares primarias y en las láminas medias de la pared celular de las plantas (Luo et al., 2017). Está constituida por homogalacturonanos, los cuales son comprendidos por cadenas lineales de ácido D-galacturónico α -(1-4), adicionalmente, contiene grupos funcionales sustituyentes como el metanol, ácido acético y grupos amidas (Sundarraaj & Ranganathan, 2017). Las pectinas se clasifican de acuerdo con el porcentaje de grupos carbonilos esterificados con metanol; si más del 50% de los grupos carboxilos está esterificado se denomina de alto metoxilo, por el contrario, si es menor al 50% se denomina de bajo metoxilo (Doesburg, 1966). Las propiedades estructurales y funcionales de la pectina van a depender del grado de metoxilación de sus galacturonanos, el contenido de ácido galacturónico, composición de azúcares y su peso molecular (Yoo et al., 2012). En la industria alimentaria, la pectina comúnmente se usa como gelificante, agente espesante, texturizante, emulsificante y estabilizante, siendo mayormente empleada la pectina de alto grado de metoxilación, ya que las pectinas de alto metoxilo forman geles estables cuando la concentración de sólidos es superior al 55% especialmente con sacarosa. Las de bajo metoxilo pueden formar geles en presencia de cationes como el calcio, empleando una estructura conocida como 'caja de huevos' gracias al arreglo intermolecular de los homogalacturonanos (Dranca & Oroian, 2018). En la industria médica también se viene empleando como agente promotor de la salud ya que tiene la capacidad de inhibir la

actividad de la enzima lipasa (Edashige et al., 2008), reducir el crecimiento de células cancerígenas humanas promoviendo la apoptosis celular (Jackson et al., 2007). Por otro lado, en la formación de geles en soluciones acuosas de pectina con ácidos y azúcar, el grado de esterificación es vital para determinar los tiempos y estabilidad de los geles, dicho grado va a depender directamente de la fuente y metodología de obtención de la pectina. Güzel & Akpınar (2019) estudiaron los rendimientos y características de la pectina obtenida de distintas cáscaras de fruta como, kiwi (8%), melón (6,5%), granada (6,1%), manzana (13%) y naranja (11.4%) viendo también diferencias significativas entre los porcentajes de esterificación de las distintas pectinas obtenidas.

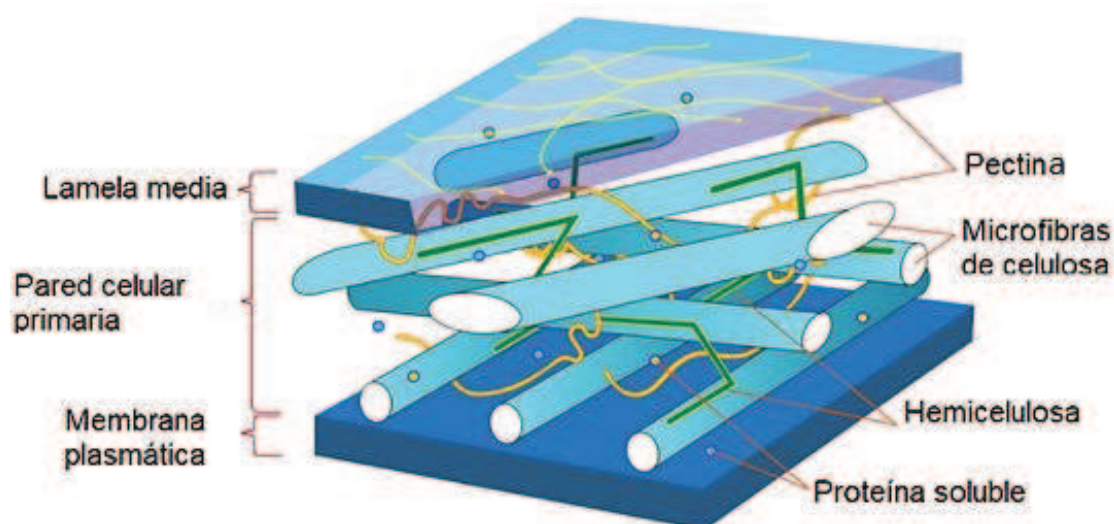


Figura 1. 2. Estructura de la pared celular vegetal. Adaptado de Sundarraj & Ranganathan (2017)

Actualmente existe una fuerte tendencia a encontrar nuevas fuentes y metodologías de obtención de la pectina con mejores rendimientos y optimizando recursos, que puedan competir con las pectinas comerciales, tales como el caso de las pectinas obtenidas a partir de cáscara de banana (Oliveira et al., 2016), de cáscara de cacao (Sarah et al., 2018) y de cáscara de mango (Guandalini et al., 2019). Convencionalmente, la pectina se obtiene por medio de una extracción sólido-líquido empleando solventes acidificados con ácido nítrico, fosfórico, sulfúrico o clorhídrico (Maran et al., 2017). Sin embargo, este proceso requiere largos tiempos de extracción, altas temperaturas y generan residuos acuosos que pueden ser nocivos para el ambiente. Por lo tanto, se han venido estudiando otras técnicas más eficientes y amigables con el ambiente, tales como: la extracción asistida por ultrasonido (Maran et al., 2017), la extracción con fluidos supercríticos (Liu et al., 2006), y la extracción asistida por microondas (Sarah et al., 2018).

Por otro lado, los residuos agroindustriales de la manzana son una fuente importante de compuestos bioactivos específicamente compuestos fenólicos, tales como las catequina, ácido clorogénico, quercetina y las proantocianidina (Kalinowska et al., 2014; Mourtzinou & Goula, 2019), donde la cáscara de manzana puede llegar a contener de 2-5 veces más compuestos fenólicos en comparación con la pulpa (Piagentini & Pirovani, 2017). Estos metabolitos secundarios han sido ampliamente estudiados en sus actividades biológicas como antiinflamatorios (de Souza et al., 2021), anticancerígenos (Eroglu & Girgin, 2021), antimicrobianos (Kalinowska et al., 2014; Szabo et al., 2019). Además, a nivel industrial se pueden aplicar como sustituyentes de compuestos antioxidantes sintéticos (Rafiee et al., 2017).

Actualmente, las técnicas empleadas para la obtención de compuestos fenólicos involucran grandes cantidades de solventes y altas temperaturas, lo cual incrementa los costos y puede deteriorar algunos metabolitos de interés (Ruiz-Montañez et al., 2014). Por otro lado, se han desarrollado tecnologías alternativas como la extracción asistida por ultrasonido, la cual surge como una tecnología alternativa que mejora los coeficientes de transferencia de masa gracias a la aplicación de energía acústica que se transforma en energía mecánica en un medio de propagación, con lo cual, se mejoran los rendimientos de extracción, así como una reducción en los costos de extracción (Chemat et al., 2017; Zhang et al., 2018). Debido a la baja actividad de la enzima polifenol oxidasa y a las cualidades bioactivas de la manzana cultivar 'Granny Smith,' diversos autores se han dedicado a estudiar el perfil y la extracción de compuestos fenólicos a partir de la manzana 'Granny Smith' (Escarpa & González, 1998; Montero et al., 2013; Rodríguez-Arzuaga & Piagentini, 2018), además de la extracción de pectina (Bhatia et al., 2016; Constenla et al., 2002; Güzel & Akpınar, 2019), sin embargo, no se conocen reportes específicos acerca del efecto de la extracción de pectina sobre el contenido de compuestos fenólicos en la cáscara de manzana 'Granny Smith'.

1.5. Factores que afectan el metabolismo secundario de los tejidos vegetales

Los tejidos vegetales dentro de sus procesos metabólicos producen diversos metabolitos de bajo peso molecular y compuestos orgánicos, los cuales a partir de su función biológica se pueden clasificar dentro del metabolismo primario o secundario. El metabolismo primario en las plantas se refiere a las vías metabólicas esenciales para el crecimiento y desarrollo básico de la planta. Estas vías metabólicas están involucradas en la síntesis de compuestos esenciales para la viabilidad del tejido vegetal, como los carbohidratos, las proteínas y los lípidos (Erb & Kliebenstein, 2020). Además de la fotosíntesis, el metabolismo primario también incluye la respiración celular, un proceso en el cual las plantas descomponen los carbohidratos para obtener energía y producir dióxido

de carbono como subproducto. La respiración celular es esencial para el crecimiento, la reproducción y otras funciones vitales de las plantas. Las hormonas también juegan un rol fundamental como compuestos reguladores de los diferentes procesos metabólicos de las plantas, donde interactúan con diferentes receptores de tipo proteicos de la planta para modular la producción de diferentes metabolitos (Rai et al., 2021)

Por otro lado, el metabolismo secundario se refiere a las vías metabólicas que producen compuestos no esenciales para el crecimiento y desarrollo básico de la planta, pero que desempeñan roles importantes en la interacción de la planta con su entorno. Estos compuestos secundarios pueden ser productos químicos especializados, como alcaloides, terpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos, entre otros. Estas moléculas cumplen diversas funciones en las plantas, como la defensa contra herbívoros y patógenos, la atracción de polinizadores, la protección contra la radiación ultravioleta y la regulación del crecimiento y desarrollo (Erb & Kliebenstein, 2020). La producción de metabolitos secundarios por las plantas se considera una capacidad adaptativa para hacer frente a las limitaciones estresantes durante un entorno desafiante y cambiantes de crecimiento que pueden involucrar la producción de tipos complejos químicos e interacciones en la estabilización estructural y funcional a través de procesos de señalización y activación metabólica (Edreva et al., 2007). Actualmente, se han registrado más de 100.000 metabolitos secundarios de las plantas, limitados a ciertos grupos taxonómicos. Según la ruta metabólica, los metabolitos secundarios se clasifican en tres grupos principales: los terpenos, los compuestos fenólicos (derivados de los fenilpropanoides y flavonoides) y los compuestos con nitrógeno (alcaloides, glucosinolatos y cianogénicos glicósidos) (Xin et al., 2011). El transporte y almacenamiento en el lugar final de los metabolitos secundarios de las plantas, que se producen a través de una vía biosintética, están influidos por factores bioquímicos y celulares. La iniciación y diferenciación de estructuras celulares específicas para la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios de las plantas también están influenciadas por factores de desarrollo, como afirma Verma & Shukla (2015).

En general, se ha observado que los metabolitos secundarios no permanecen estabilizados como otros rasgos cualitativos y cuantitativos en las plantas. Así pues, los factores responsables de la fluctuación de los metabolitos secundarios pueden dividirse en cuatro grupos principales, genéticos, ontogenéticos, morfogenéticos y factores ambientales.

1.5.1. Factores genéticos

Las rutas metabólicas de los distintos metabolitos secundarios en las plantas son motivo de estudio constante debido a que falta mucho por dilucidar. No obstante, varios reportes indican que la producción de metabolitos secundarios se modula bajo el control

genético (Verma & Shukla, 2015). Sin embargo, a pesar de que en el genoma de las plantas se encuentran miles de genes, solo entre el 15-25% de ellos contribuye en el metabolismo secundario de las plantas (Broun et al., 2006). Estos genes son regulados por diferentes factores de transcripción los cuales influyen en la ruta metabólica en la cual se expresa los distintos genes de acuerdo con las necesidades de la planta (Verma & Shukla, 2015). Sin embargo, a lo largo de la evolución de la planta, las reacciones enzimáticas se distorsionan en función del sustrato disponible, lo que da lugar a enzimas alteradas. Las enzimas alteradas realizan cambios en unos pocos aminoácidos, lo que altera la expresión de genes relacionados de una especie vegetal específica (Broun et al., 2006). Sin embargo, en el metabolismo secundario de las plantas se ha investigado que las enzimas son específicas del sustrato y producen un único producto a partir de un sustrato. Una enzima puede alterarse a sí misma mediante la sustitución de uno o más aminoácidos por la exposición de un nuevo sustrato que se asemeje al anterior. Si la enzima alterada produce un producto beneficioso para la planta, se adoptan estos cambios genéticos que favorecen el aumento de su síntesis dando lugar a cambios en la expresión del gen responsable (Amiri et al., 2023). La inducción de los mecanismos de defensa en las plantas, activan diferentes familias de genes tales como los factores de respuesta al etileno (ERF), factores de transcripción básica de leucina (bZIP), factor de transcripción de proteínas MYB (MYB), factor de hélice básica-bucle-hélice (bHLH) y factor de transcripción “*worky*” (WRKY) desempeñando funciones específicas en la respuesta inmunológica de las plantas. Dentro de la familia bHLH, el factor de transcripción MYC2 emerge como un componente clave. Además de su participación en la respuesta a patógenos, el MYC2 también desempeña un papel crucial en otros procesos biológicos, como la tolerancia a la sequía, la percepción de la señal lumínica, el desarrollo de las raíces, entre otros. Este amplio espectro de funciones señala la versatilidad y la importancia multifacética de MYC2 en el contexto de la biología vegetal (Wang et al., 2017).

Por otro lado, el factor de transcripción WRKY, integrante de otra familia genética, desempeña un papel fundamental en la regulación del metabolismo secundario de las plantas. Este mecanismo es esencial para la producción y acumulación de compuestos bioquímicos que juegan un papel crucial en la defensa contra patógenos y en la adaptación a diversos estreses ambientales (Verma & Shukla, 2015).

1.5.2. Factores ontogénicos

Los factores ontogénicos se refieren al estudio de la historia de desarrollo de un organismo durante toda su vida, desde la fertilización de la semilla, las distintas etapas del desarrollo hasta la senescencia. Estas diferentes etapas afectan significativamente la concentración de los metabolitos primarios y secundarios (Elger et al., 2009). Los

metabolitos secundarios de las plantas no tienen una concentración constante durante toda su vida, sino que cambian en diferentes condiciones ambientales según sus necesidades.

1.5.3. Factores morfogénéticos

Los factores morfogénéticos se refieren a los diferentes procesos y mecanismos que dirigen el desarrollo de la forma y estructura en las plantas. Estos factores también pueden influir en la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas, ya que afectan a la distribución de los recursos a diferentes partes de la planta, incluyendo las células especializadas en la producción de metabolitos secundarios (Juhaimi, 2014). La mayoría de las sustancias químicas naturales son generadas por los tejidos secretores de las plantas vasculares. Los tejidos secretores varían en estructura, localización y material secretado. Estos tejidos se clasifican en función del material que producen: laticíferos, nectarios, conductos (goma y resinas), glándulas salinas, hidátodos, células secretoras de mucílago, células secretoras de enzimas, células oleaginosas, tricomas secretores de aceite, tejidos secretores de flavonoides, etc. (Verma & Shukla, 2015).

1.5.4. Factores Ambientales

Las plantas interactúan con su ambiente para su supervivencia, cuyos factores bióticos y abióticos influyen en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios (Isah, 2019). Los factores abióticos y bióticos provocan estrés abiótico y biótico respectivamente en las plantas como consecuencia de las condiciones desfavorables debidas a estos factores. El mecanismo molecular que subyace a la respuesta de las plantas ante el estrés biótico y abiótico es de naturaleza multinivel y multiprocesos. Esto implica la detección, transducción de señales, transcripción, procesamiento, traducción y modificación de proteínas. Se caracteriza por ser un mecanismo de respuesta complejo que involucra la interacción de múltiples genes, vías de señalización y procesos metabólicos. (Zhang et al., 2023).

El estrés biótico aparece cuando la planta sufre un ataque físico por parte de algún agente biológico como hongo, virus, bacterias, nematodos, etc. La defensa contra este tipo de ataques incluye barreras morfológicas, estructurales, químicas, enzimáticas y proteicas, dependiendo de cada planta. Estas respuestas confieren a la planta cierta tolerancia o resistencia para el factor biótico de estrés ya sea generando compuestos de protección o desarrollando una estructura más rígida (Verma & Shukla, 2015). La respuesta química modula la síntesis de compuestos como el ácido β -aminobutírico (BABA) o el benzothiadiazol. Por otro lado, las hormonas también juegan un rol fundamental en la respuesta de la planta ante el estrés biótico. El ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y el etileno, cumplen la función de ser moléculas señales para expresar los genes precursores de las rutas metabólicas para la síntesis de compuestos de defensa (Madani

et al., 2018). De manera similar, el estrés abiótico (hídrico, por temperatura, por composición atmosférica, lumínico, por daño mecánico, por salinidad y otros minerales, entre otros) desencadena cambios en la expresión génica, el metabolismo y la producción de metabolitos secundarios en el tejido vegetal (Figura 1.3). Adicionalmente, la planta puede generar tolerancia a los estreses se genera a través de una serie de adaptaciones fisiológicas, bioquímicas, morfológicas y moleculares que les permiten sobrevivir y mantener un crecimiento óptimo bajo condiciones adversas. Estas adaptaciones pueden variar según el tipo de estrés al que estén expuestas las plantas (Zhang et al., 2023)

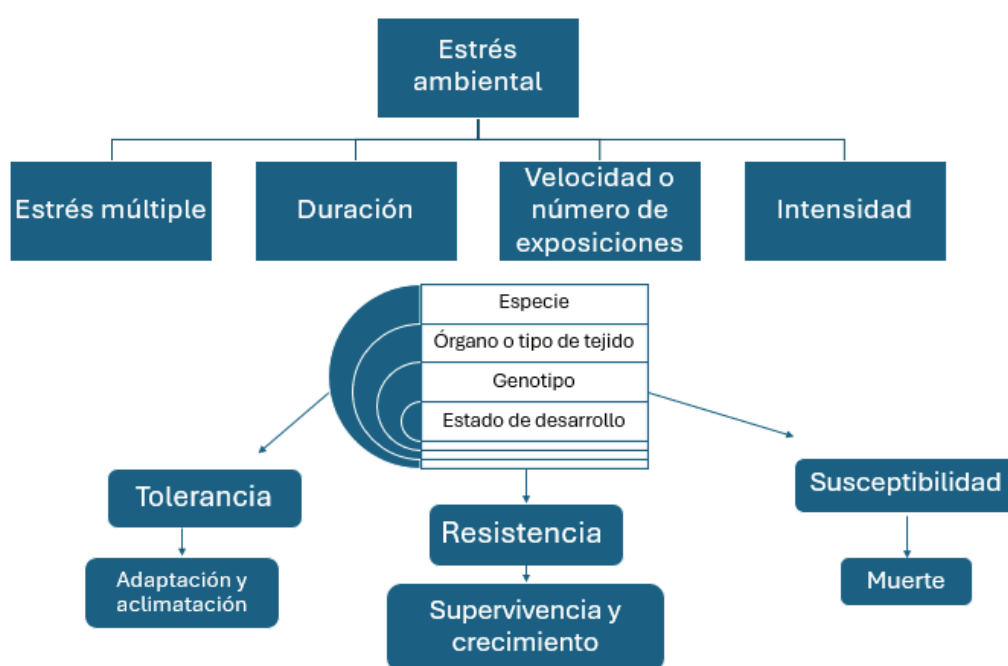


Figura 1.3. Factores que influyen en la respuesta de las plantas a los diferentes factores de estrés ambientales. Adaptado de Redondo-Gómez (2013)

1.6. Estrés abiótico como herramienta de biofortificación con compuestos fenólicos.

Las plantas han desarrollado mecanismos para compensar las condiciones ambientales adversas mediante el ajuste de sus procesos fisiológicos y de desarrollo. Las respuestas al estrés dependen de diversos factores como la intensidad, la duración del estrés, etapa de desarrollo de la planta, tipo de tejido e interacciones entre diferentes tipos de estrés. El estrés desencadena cambios en la expresión génica, el metabolismo y la producción de metabolitos secundarios. Las plantas son sistemas complejos que incluyen miles de genes, proteínas, moléculas reguladoras, agentes de señalización y compuestos químicos interconectados en vías y redes (Redondo-Gómez, 2013). En condiciones normales de crecimiento, estas vías y redes bioquímicas deben funcionar de manera coordinada para equilibrar los estímulos ambientales con los requisitos genéticos de

crecimiento y reproducción de la planta. Sin embargo, cuando se exponen a condiciones desfavorables, este sistema complejo se ajusta para minimizar los impactos negativos del estrés y mantener el equilibrio metabólico (Madani et al., 2018).

1.6.1. Estrés por agua.

El estrés abiótico por agua en las plantas se refiere a situaciones en las que las plantas experimentan condiciones de escasez de agua o exceso de agua que afectan negativamente su crecimiento y desarrollo. Estas condiciones pueden incluir sequías prolongadas, falta de riego adecuado, salinidad del suelo, inundaciones, entre otros factores. El estrés abiótico por agua puede tener un impacto significativo en la fisiología y el metabolismo de las plantas, alterando su capacidad para absorber y transportar nutrientes, regular la transpiración y mantener la homeostasis hídrica (Redondo-Gómez, 2013).

1.6.2. Estrés por temperatura.

Las plantas tienen temperaturas ideales para su adecuado crecimiento. Las temperaturas altas y bajas tienen un efecto adverso en las plantas y sus frutos, que sufren estrés por calor y frío respectivamente (Lin et al., 2010). A bajas temperaturas se puede dar el daño por frío, cuando una planta tropical o subtropical es expuesta a temperaturas bajas cercanas al punto de congelación, se genera un desarrollo anómalo de los frutos, superficies escaldadas, disminución de la firmeza de los frutos y una acelerada senescencia. Ya que la estructura de la célula vegetal es alterada incrementándose la actividad de enzimas como la fosfolipasa y la lipoxigenasa las cuales reducen la integridad de la célula vegetal (Madani et al., 2018). Se ha reportado que, en algunas plantas, la actividad de la enzima fenilalanina amoníaco liasa (PAL) es el factor limitante del pardeamiento inducido por bajas temperaturas, por ejemplo, en el plátano. Algunos tratamientos que podrían aliviar el estrés por bajas temperaturas incluyen reguladores del crecimiento vegetal como el ácido salicílico (SA), poliaminas (PAs) y óxido nítrico (NO) (Manasa S et al., 2022).

Otro tipo de estrés por temperatura en las plantas está dado por el calentamiento, ya que temperaturas elevadas generan desestabilización de varias proteínas y de la estructura celular, influyendo en la eficiencia de las reacciones enzimáticas en la célula vegetal (Lurie & Pedreschi, 2014). Se ha encontrado que al usar tiempos cortos de exposición a altas temperaturas sobre las plantas en desarrollo se induce estrés, el cual dentro de la modulación de los mecanismos de defensa se logra una acumulación de proteínas de defensa, incluidas las proteínas de choque térmico, las proteínas resistentes a patógenos, las enzimas antioxidantes y los compuestos fenólicos (Madani et al., 2018).

1.6.3. Estrés por composición atmosférica.

Dentro de los procesos de conservación de frutas y hortalizas, las atmósferas modificadas y atmósferas controladas son una herramienta útil que permite prolongar la vida útil de las frutas y hortalizas frescas enteras o frescas cortadas (Van de Velde et al., 2019a). Sin embargo, la exposición de tejidos vegetales a diferentes atmósferas induce un estrés abiótico el cual modula una respuesta en el tejido. Esto va a depender de la concentración y composición de los gases en atmósfera de contacto del producto, temperatura, tiempo de exposición y tipo de empaque o recinto donde se dé el contacto (Madani et al., 2018).

Para el caso de bajas concentraciones de oxígeno, las vías de fermentación se inducen y como consecuencia se reduce el ATP en las células. Durante este proceso, el acetaldehído se convierte en etanol utilizando nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), generando etanol y lactato en estas condiciones. Las enzimas involucradas también pueden activar una respuesta en la ruta de los fenilpropanoides permitiendo la acumulación de compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos (Francini et al., 2019).

Para el caso de atmósferas con altas concentraciones de dióxido de carbono CO₂, este gas por encima del 12% provoca daños en la integridad fisiológica del tejido vegetal. Las frutas almacenadas con alto contenido en CO₂ presentan una mayor actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO) en comparación con las frutas almacenadas en condiciones atmosféricas normales, y la actividad de la PPO se correlacionó positivamente con el pardeamiento de la fruta (Madani et al., 2018). Esto genera una alta tasa de utilización de compuestos fenólicos, y el fruto busca equilibrar esa sobre tasa en la oxidación de compuestos fenólicos, activando la ruta metabólica de los fenilpropanoides para la síntesis de nuevos compuestos fenólicos (Araji et al., 2014). No obstante, si los daños causados por el CO₂ son severos el proceso de senescencia se acelera a niveles irreversibles.

1.6.4. Estrés lumínico.

La intensidad lumínica a la que se someten las distintas frutas y hortalizas en la precosecha y en la postcosecha afecta directamente la calidad final del producto. Bajas intensidades lumínicas en algunos vegetales inducen una reducción en la concentración de clorofila. No obstante, para los productos frescos cortados las bajas intensidades lumínicas pueden favorecer su vida útil (Madani et al., 2018).

Dentro de las distintas longitudes de onda que pueden afectar la integridad de un tejido vegetal, la luz ultravioleta (UV) es capaz de modular estrés y diferentes mecanismos de defensa en las plantas (Darré et al., 2022). La UV representa entre el 7-9% de la radiación solar a la cual están expuestas las plantas durante su desarrollo. A su vez la UV

está dividida de acuerdo con sus distintas longitudes de onda: la radiación UV-A (320-400 nm) la cual representa cerca del 95% de la radiación solar; la radiación UV-B (280-320 nm), casi el 1.5 % de la solar, pero esta pequeña fracción genera graves daños en la integridad de las plantas; y la radiación UV-C (100-280 nm), que es la forma más dañina de toda la gama de rayos ultravioleta. La exposición directa a esta radiación puede causar daños letales en organismos y tejidos vegetales (Loconsole & Santamaria, 2021). Durante los últimos años se ha establecido que la radiación UV genera diferentes respuestas en las plantas; algunas de ellas son de carácter negativos, incluyendo daños en proteínas claves en el metabolismo de la planta y su ADN, promueve la generación y acumulación de ROS, dando inicio a las respuestas de estrés celular, además, puede generar cambios en la fisiología celular, así como cambios en el crecimiento, morfología y desarrollo de la planta (Jacobo-Velázquez et al., 2022). Por lo tanto, las plantas desarrollan diferentes mecanismos para contrarrestar el factor adverso y su reparación frente a la radiación UV. Estos mecanismos incluyen la biosíntesis de nutraceuticos como compuestos fenólicos, glucosinolatos, carotenoides, clorofilas, ácido ascórbico y betalaínas (Darré et al., 2022). Los compuestos fenólicos y los carotenoides tienen una alta capacidad de protección solar al absorber la radiación UV especialmente la radiación UV-B la cual penetra en los tejidos foliares (Vanhaelewyn et al., 2020). Las respuestas de las plantas a la radiación UV involucran a los fotorreceptores UV específicos de las plantas. Seguido de diferentes procesos de transducción de señales que conducen a la regulación de la transcripción génica en función de la intensidad y tipo de radiación que esté recibiendo la planta (Jacobo-Velázquez et al., 2022). No obstante, pequeñas dosis de radiación UV-C también han sido estudiadas como elicitores para promover la acumulación de compuestos antioxidantes, específicamente compuestos fenólicos (Delorme et al., 2020; Formica-Oliveira et al., 2017), comparándose con la radiación UV-B y UV-A. Nguyen et al. (2014) estudiaron el efecto de las radiaciones UV-A; UV-B y UV-C (6 kJm^{-2}) en frutos de arándano poscosecha, reportando que las radiaciones UV-B y UV-C permitieron un incremento significativo en la concentración de antocianinas y en la vida útil al evitar el desarrollo de microorganismos alterantes. Por otro lado, Mariz-Ponte et al. (2019) reportó que irradiar durante una hora plantas de tomate con UV-A incrementó su calidad poscosecha e incrementó la cantidad de di-fenoles.

1.6.5. Estrés por daño mecánico

Las plantas están permanentemente expuestas a daños mecánicos, ya sea en sus etapas de pre y poscosecha. No obstante, pueden responder mediante sus distintas rutas metabólicas que se activan inmediatamente para sintetizar proteínas y metabolitos secundarios que evita la invasión de organismos patógenos mediante el sitio de corte o

daño. Posteriormente, la planta busca reparar el sitio del corte y generar una resistencia en toda su integridad para futuros daños (Jacobo-Velázquez et al., 2015). Esta respuesta al estrés producido por un daño mecánico en la integridad del tejido vegetal parece ser el resultado de la activación del metabolismo fenilpropanoide junto con las vías metabólicas implicadas en la suplementación de los esqueletos de carbono necesarios para la biosíntesis de los fenoles, como la glucólisis, la vía de la pentosa fosfato oxidativa y la vía del shikimato (Santana-Gálvez et al., 2019). Adicionalmente, la aceleración en la tasa de respiración de la planta genera un incremento en las ROS y otras moléculas señales como el ácido salicílico, el etileno y ácido jasmónico (Guan, Hu, Xu, Sarengaowa, et al., 2021; Jacobo-Velázquez et al., 2015).

La respuesta de las plantas al estrés abiótico generado por daños mecánicos se puede dividir en respuesta local y respuesta sistémica involucrando la expresión de diferentes genes para resistir el factor adverso y prepararse para próximos eventos de estrés (Guan et al., 2021a). En la respuesta local involucra mecanismos disponibles en los sitios cercanos al lugar donde se generó el daño mecánico. Debido a que el daño mecánico favorece el posible ingreso de patógenos a la planta, la respuesta inmediata se orienta a la regeneración del tejido, a la producción de moléculas antimicrobianos y anti-herbívoros (taninos), además de moléculas para evitar la pérdida de agua (Edyta & Iwona, 2012). En la respuesta local a un daño en la pared celular, se producen proteínas y azúcares complejos. Los oligogalacturónidos (OGA), que son moléculas con movilidad limitada, desempeñan un papel importante como señales en esta respuesta. Los OGA modifican la expresión de genes, especialmente el gen de la poligalacturonasa (Santana-Gálvez et al., 2019). Además, las paredes celulares se vuelven más gruesas debido a la deposición de lignina y calosa. Se ha observado también una mayor síntesis de compuestos fenólicos en respuesta al daño. Otros cambios incluyen la despolarización de la membrana, que eleva los niveles de calcio dentro de la célula, y la fosforilación de proteínas (Edyta & Iwona, 2012).

La respuesta sistémica a los daños mecánicos ocurre en los tejidos de la planta que no fueron afectados directamente por el daño mecánico. Para fortalecer la resistencia de la planta, se activan diferentes vías de señalización en respuesta a los cortes o daños mecánicos. Esta respuesta incluye cambios metabólicos y regulación de la expresión génica. Estudios recientes utilizando microarreglos de ADN, han demostrado que el ácido jasmónico desempeña un papel clave en la coordinación de los cambios en la expresión de genes en todo el genoma. Dos horas después de un daño mecánico, se induce la producción de inhibidores de proteinasas a través del ácido jasmónico (Schilmiller & Howe, 2005). Estos inhibidores bloquean las proteinasas digestivas en el intestino de los insectos

herbívoros. Los OGA y la sistemina son las señales que activan los genes de los inhibidores de proteinasas. La sistemina es una señal móvil que activa genes de defensa en la respuesta sistémica a las heridas, o daños mecánicos, incluso en concentraciones muy bajas. Sin embargo, se ha observado que la producción de sistemina está limitada a plantas solanáceas (Edyta & Iwona, 2012; Guan, et al., 2021b).

1.7. Biofortificación con compuestos fenólicos de las plantas.

La biofortificación en general se define como un proceso que va más allá de la simple adición de nutrientes a los alimentos. Consiste en aumentar el contenido de nutrientes o mejorar su biodisponibilidad en todas las fuentes de alimentos posibles para mejorar su valor nutricional. Según la Comisión del CODEX *Alimentarius*, esta definición se centra en la mejora del contenido de vitaminas y minerales en los cultivos (Bouis & Saltzman, 2017). La biofortificación se enfoca principalmente en aumentar el contenido de micronutrientes en los cultivos básicos consumidos en poblaciones de países pobres y en desarrollo, donde la dieta se basa principalmente en estos cultivos. El objetivo principal de la biofortificación es combatir la malnutrición. Para lograr la biofortificación de cultivos hortícolas con vitaminas y minerales, se utilizan enfoques agronómicos, mejoramiento genético y biotecnología (Jacobo-Velázquez, 2022).

La aplicación de distintas metodologías de biofortificación en minerales y vitaminas en cultivos de consumo masivo en países en vías de desarrollo ha mostrado un impacto positivo en la salud pública y una buena rentabilidad (Bouis & Saltzman, 2017). No obstante, a través de los años se ha demostrado que además de las vitaminas y los minerales, existen otros compuestos secundarios en los cultivos hortícolas que pueden tener efectos farmacológicos en los seres humanos, contribuyendo a la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas (Ambroselli et al., 2023). Estos compuestos, conocidos como nutraceuticos, incluyen compuestos fenólicos, glucosinolatos, carotenoides y fitoesteroides. Como se mencionó anteriormente, las plantas responden a su entorno, por ello, se han propuesto diversas tecnologías de estrés abiótico aplicadas antes y después de la cosecha, como la radiación ultravioleta (UV), el estrés por daños mecánicos, las fitohormonas y las atmósferas modificadas, tanto de forma individual como combinada, como métodos efectivos para estimular la biosíntesis de nutrientes y otros compuestos secundarios beneficiosos para la salud en las plantas (Jacobo-Velázquez, 2022). De esta manera se muestra que la "biofortificación" podría ampliarse para abarcar estas tecnologías aplicadas tanto antes como después de la cosecha, con el objetivo de aumentar el contenido de nutrientes y nutraceuticos en frutas y verduras.

Tecnologías como la radiación UV puede desencadenar el metabolismo de los fenilpropanoides en los tejidos vegetales. Para evaluar la respuesta al estrés, se puede

medir la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, C.E. 4.3.1.5) en la vía fenilpropanoides (Francini et al., 2019). Asimismo, la oxidación de los compuestos fenólicos debido a la ruptura de la membrana celular puede interactuar con la polifenol oxidasa (PPO, EC 1.14.181), lo que resulta en la degradación tanto de fenoles monoméricos como poliméricos (Kang & Saltveit, 2002). Estas mediciones enzimáticas son utilizadas para determinar la respuesta frente al estrés. Por ejemplo, se han reportado incrementos de hasta un 500% en el contenido total de fenoles en zanahorias (Surjadinata et al., 2017), y un aumento del 700% de quercetina en chumberas rojas (Ortega-Hernández et al., 2019). Sin embargo, no existen condiciones específicas de radiación UV para inducir la acumulación de fenólicos ya que cada tejido vegetal responde de forma diferente a los estreses abióticos (Jacobo-Velázquez et al., 2022; Reyes & Cisneros-Zevallos, 2003). Además, Becerra-Moreno et al. (2015) informaron de que la aplicación de estrés por daño mecánico en combinación con estrés hídrico aumentó el contenido total de compuestos fenólicos entre un 500 y un 1300%. Santana-Gálvez et al (2019) aplicaron estrés por corte y almacenamiento a 15°C durante 48 horas a zanahoria, dando como resultado un incremento del 522% en ácido clorogénico y del 23% en fibra dietética. Además, la intensidad de la radiación UVA, así como el control de la intensidad del daño mecánico, y el tiempo de almacenamiento, pueden afectar a la acumulación de compuestos fenólicos específicos en los tejidos vegetales (Surjadinata et al., 2017). Los residuos agroindustriales son tejidos vegetales que continúan respondiendo a su entorno con lo cual pueden ser biofortificados con compuestos fenólicos a través de la aplicación de estrés abiótico, tal como se ha reportado para residuos agroindustriales de zanahoria y ananá (Sánchez-Rangel et al., 2021; Santos et al., 2021).

1.8. El síndrome metabólico y el efecto de los compuestos fenólicos.

El síndrome metabólico se caracteriza por una serie de anomalías metabólicas que incluyen hipertensión, obesidad central, resistencia a la insulina y dislipidemia. Tanto factores genéticos como adquiridos intervienen en la patogénesis del síndrome metabólico, desempeñando un papel importante en la vía final de la inflamación. Para el diagnóstico temprano, es fundamental realizar cambios en el estilo de vida y modificar los factores de riesgo, como el sedentarismo, dietas altas en carbohidratos y lípidos. El tratamiento farmacológico se enfoca en tratar los componentes individuales del síndrome metabólico. Además, algunos nutraceuticos han demostrado ser beneficiosos en el tratamiento del síndrome (Ambroselli et al., 2023). El síndrome metabólico representa un grave problema de salud pública en la actualidad y tanto la comunidad médica como científica coinciden en la necesidad de definir estrategias para frenar esta pandemia emergente (Mozaffarian, 2022). Sin embargo, aún existen algunas controversias relacionadas con la definición y los

criterios de diagnósticos del síndrome metabólico, así como cierta falta de claridad en la identificación de los pacientes. En 1999, el Grupo de Diabetes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió el síndrome por la presencia de resistencia a la insulina, descrita como ATG o niveles plasmáticos elevados de insulina o DMT2. Para hacer un diagnóstico positivo es necesario que en los pacientes afectados por la obesidad estén presentes otros dos factores de riesgo, como la relación cintura-cadera (>0.9 o 0.85 para hombres y mujeres, respectivamente) y/o índice de masa corporal (IMC) > 30 ; hipertensión (presión sistólica > 140 mmHg y presión diastólica > 90 mmHg); dislipidemia (TG ≥ 1.7 mM y/o HDL < 0.9 mM o < 1.0 mM para hombres y mujeres, respectivamente); y microalbuminuria, calculada como tasa de excreción urinaria de albúmina ≥ 20 μ g/min o relación albúmina: creatinina ≥ 20 mg/g (Kaur, 2014).

Los mecanismos patogénicos del síndrome metabólico son complejos y aún no se han dilucidado por completo, pero la inflamación sistémica, también conocida como inflamación crónica de bajo grado, se ha reconocido como un importante factor común. Este proceso comienza con la disbiosis, la cual se trata de una serie de alteraciones en la composición y función del microbioma intestinal, estas alteraciones están actualmente vinculadas a la patogénesis de enfermedades comunes y representan un reto para el campo del microbioma. Se necesita descifrar los mecanismos implicados en la generación de nuevos y persistentes configuraciones microbioma disbiótico, y diferenciar las asociaciones causales entre el microbioma y los cambios microbianos secundarios que acompañan el curso de la enfermedad (Levy et al., 2017). Varios estudios han descrito biomarcadores proteicos asociados al síndrome metabólico, de los cuales una gran proporción está directamente relacionada con la inflamación, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6) (Harlid et al., 2017). El tejido adiposo visceral parece desempeñar un papel fundamental en el desarrollo del estado inflamatorio, ya que segrega proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), que inducen la infiltración de macrófagos en el tejido (Kaur, 2014). Simultáneamente, se incrementan la acumulación de lípidos y, producto de la disbiosis, se incrementan los exopolisacáridos de las bacterias de la microbiota intestinal alterada (Figura 1.4). Este proceso entra en un bucle repetitivo que se traduce en una inflamación crónica resultante de la adiposidad visceral y puede ser uno de los principales mecanismos que subyacen a la asociación establecida entre el síndrome metabólico y las enfermedades crónico degenerativas (Esposito et al., 2013). Sin embargo, se ha demostrado que los cambios en los hábitos alimenticios y una dieta rica en fitoquímicos, grasas insaturadas y fibra, complementado con actividad física, pueden revertir el estado de proceso de inflamación leve o estado de

pre-enfermedad, debido a que poseen la capacidad de reducir el estrés oxidativo, modular los mecanismos de inflamación y mejorar los procesos de homeostasis metabólica (Forni et al., 2019). La mayoría de las pruebas provienen de modelos *in-vitro* y no está claro si estos mecanismos son válidos en humanos a pesar de contar con diversos estudios *in-vivo*, faltan estudios que validen la seguridad y eficacia de los compuestos fenólicos como tratamiento farmacológico (Cory et al., 2018). Otros autores han dilucidado el efecto de la farmacocinética de absorción sobre la eficacia de los polifenoles como antioxidantes y otros mecanismos potencialmente beneficiosos para la salud; estas propiedades fisicoquímicas de las moléculas pueden explicar los efectos variables observados en modelos humanos y animales, así como los datos contradictorios de la bibliografía (Yahfoufi et al., 2018).

El uso de materias primas secundarias como los residuos agroindustriales de frutas y hortalizas, para la obtención de compuestos bioactivos representa una opción sustentable para el estudio de nuevos tratamientos preventivos en el desarrollo del síndrome metabólico y sus enfermedades asociadas, así como, el potencial para lograr ser un tratamiento farmacológico revirtiendo un estado de enfermedad crónica a un estado saludable.

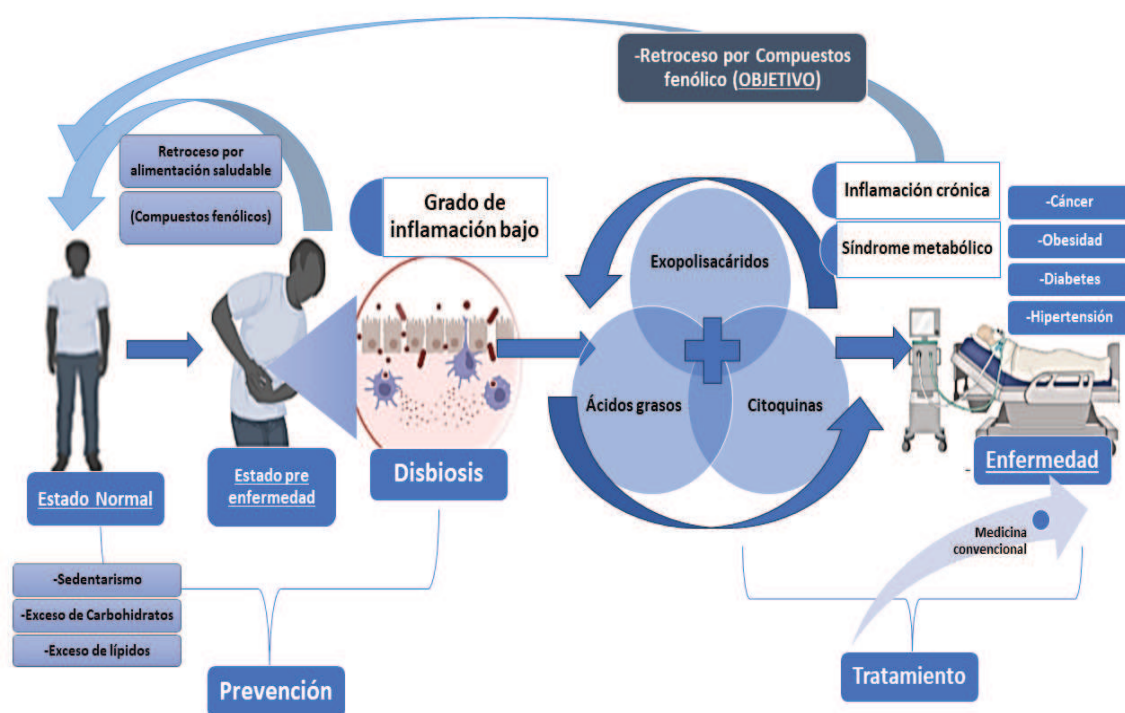


Figura 1.4. Proceso de desarrollo del síndrome metabólico y el potencial efecto de los compuestos fenólicos.

1.9. Extracción de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, al ser los metabolitos secundarios de mayor concentración en las plantas, con diversas estructuras, presentan una amplia gama de

propiedades biológicas, además de mostrar la mayor capacidad antioxidante hasta ahora reportada, por lo cual han sido objeto de diversos estudios para su adecuada obtención (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Las técnicas de extracción de compuestos fenólicos a partir de las distintas matrices vegetales juegan un rol fundamental en el tipo de compuestos que se van a obtener y sus diferentes propiedades, por eso es fundamental elegir la metodología adecuada teniendo en cuenta el tipo de muestra, los compuestos específicos a extraer, la estructura, el objetivo de la extracción y la tecnología usada (Alara et al., 2021).

La obtención de compuestos nutraceuticos a partir de matrices vegetales de descarte agroindustrial sigue los principios de la química analítica y se puede enmarcar en 5 grandes pasos: i) pretratamiento de la matriz vegetal, ii) separación de la molécula, iii) extracción de la molécula, iv) purificación y v) obtención de producto final (Galanakis, 2012), siendo el proceso de extracción de la molécula uno de los factores fundamentales en los resultados finales. Numerosas tecnologías se han aplicado en la obtención de metabolitos de interés a partir de matrices vegetales, no obstante, la extracción con solventes es la más frecuente sobre todo en escalas industriales (Barba et al., 2016). La extracción sólido-líquido, se caracteriza por ser una metodología simple, ampliamente usada en la industria de alimentos, gracias a su eficiencia en la separación de compuestos de interés a partir de matrices vegetales, tales como los compuestos fenólicos (Winitorn et al., 2008).

Los compuestos de interés en las matrices vegetales se encuentran unidos por fuerzas físicas y químicas, que se deben romper para lograr la transferencia del analito al medio de extracción, ya sea por disolución o desorción (Gerke et al., 2018). La mezcla soluto-solvente se difunden hasta la superficie del sólido, moviéndose a través de la interfaz de la partícula hacia la fase del solvente de extracción (Ziaedini et al., 2010), posteriormente, se separa el material sólido de la solución de extracción, mediante la filtración, decantación o por clarificación (Zhang et al., 2018) Con lo anterior, la técnica empleada en la recuperación de compuestos fenólicos es un factor clave para mejorar los rendimientos y selectividad de los metabolitos de interés. Dentro de las metodologías empleadas encontramos a los denominados métodos tradicionales, como la infusión, decocción, maceración, percolación, extracción con reflujo y soxhlet (Mukherjee, 2019). Por otro lado, los no convencionales, extracción con líquidos presurizado, plasma frío, fluidos sub y super críticos, extracción asistida por microondas, extracción con fase sólida, altas presiones hidrostáticas y extracción asistida con ultrasonido (Shams et al., 2015).

1.9.1. Extracción por infusión

En este proceso de extracción la matriz vegetal puede o no ser secada para luego someterla a una molienda fina, luego se pone en un contenedor donde se pone en contacto directo con el solvente (generalmente agua), este puede ser frío o caliente, se mantiene en contacto un breve periodo de tiempo para que ocurra el proceso de transferencia de masa (Azwanida, 2015). La infusión es una solución diluida que contiene el metabolito de interés solubilizado, las relaciones solvente-soluto no suelen ser muy altas rondan entre 4:1 y 16:1 (v/p) (Abubakar & Haque, 2020; Swami Handa et al., 2008). Magalhaes & Dos Santos (2020) optimizaron la obtención de compuestos fenólicos a partir de hinojo, anís, menta, hierba de limón y melisa, por medio de la infusión, reportando rangos de compuestos fenólicos importantes entre 91-558 mg de ácido gálico equivalente por litro de extracto (mg AGE L⁻¹).

1.9.2. Extracción por decocción

Es un proceso de extracción, donde se aplica calor de manera continua, usando un volumen de agua específico. La muestra luego de ser secada y molida se pone en un recipiente donde se agrega el agua, se realiza una agitación constante, y se aplica calor por un corto lapso, que no supera los 15-20 minutos, se usa comúnmente en analitos altamente polares solubles en agua (Abubakar & Haque, 2020; Siani et al., 2014). (Martins et al. (2014) estudiaron la extracción de compuestos fenólicos a partir de orégano empleando las técnicas de infusión y decocción en una relación de 1:200, obteniendo rendimientos significativamente mayores en la decocción (98 mg g⁻¹ extracto).

1.9.3. Maceración

Esta técnica ha sido ampliamente usada en la maduración de vino y otros licores estacionados, ha sido adaptada y aplicada en la obtención de nutraceuticos de matrices vegetales (Azwanida, 2015). Inicialmente la muestra vegetal molida o triturada, se pone en un contenedor cerrado al cual se le agrega una cantidad conocida de solvente y se deja en contacto por periodos de tiempo prolongados que pueden ser entre 1-7 días, durante este periodo se puede aplicar agitación eventual o constante, como también aplicar calor para aumentar la difusividad de los solutos (Ćujić, Šavikin, et al., 2016; Morata et al., 2018). La solución obtenida pasa por un proceso de filtración y clarificación, y los tiempos de contacto se modifican de acuerdo con la matriz vegetal y la facilidad con la que los analitos se difundan a través de la pared celular. Para escalas industriales, se emplean sistemas de circulación que bombean el solvente a través de unos aspersores, mejorando la difusión al lograr una distribución más uniforme del soluto en la solución de extracción (Swami Handa et al., 2008).

1.9.4. Percolación

En esta técnica la muestra vegetal pulverizada es colocada en un percolador donde se hace pasar la solución de extracción para que percole a través de él, el solvente saturado es constantemente reemplazado por solvente nuevo (Figura 1.5), no obstante, algunas matrices pueden sufrir el fenómeno de hinchamiento lo cual dificulta el proceso de extracción (Zhang et al., 2018). Para la obtención de compuestos fenólicos a partir de Colroja, (Ravanfar et al., 2018) estudiaron la extracción mediante la percolación con un rendimiento de 28 mg AGE g⁻¹ muestra.

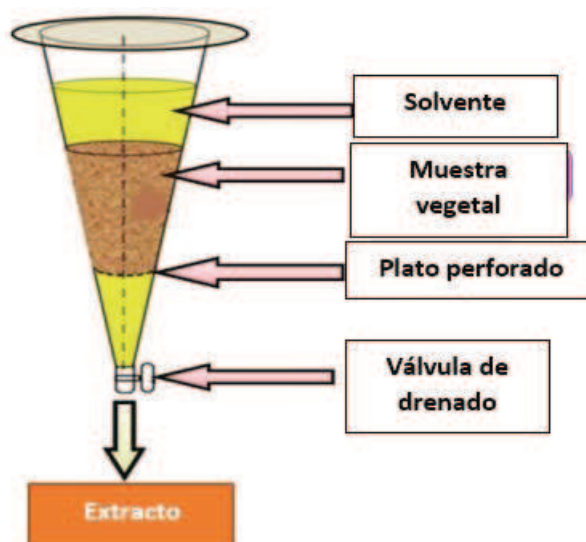


Figura 1. 5. Extracción por percolación (adaptado de (P. K. Mukherjee, 2019)

1.9.5. Extracción por reflujo

Esta tecnología se basa en la condensación de vapor del solvente usado, con el fin de hacerlos recircular por el sistema de extracción, renovando el gradiente de concentración entre la matriz vegetal y el solvente de extracción (Figura 1.6) (Xi et al., 2009). Ghasemzadeh & Jaafar (2014) optimizaron la extracción de compuestos fenólicos totales y flavonoides en pandan (una planta asiática), reportando 1.78 g Kg⁻¹ de flavonoides totales y 6.6 g Kg⁻¹ en base seca (BS) de compuestos fenólicos totales.

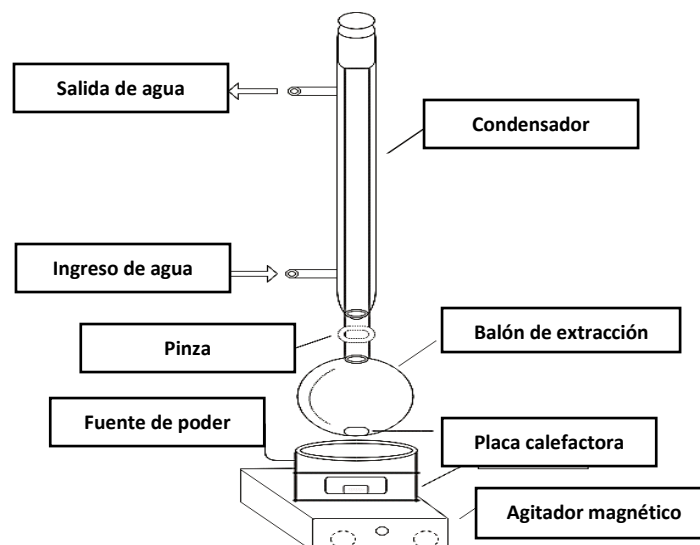


Figura 1.6. Extracción por reflujo (adaptado de Hidayat et al (2019))

1.9.6. Extracción Soxhlet

Esta técnica involucra un proceso de destilación simple, utilizando el principio de la extracción con reflujo, el solvente condensado cae gota por gota en la cámara de extracción, una vez llena, se sifona el solvente de extracción saturado y es continuamente renovado por solvente condensado, este proceso se repite varias veces por un periodo determinado de tiempo. La extracción por Soxhlet es caracterizada por usar menos tiempo y volúmenes de solventes en referencia a la maceración y percolación (Herrero et al., 2012), sin embargo, la exposición a altas temperaturas puede incrementar la degradación térmica de los compuestos de interés (Zygler et al., 2012). La muestra se deposita en un dedal de celulosa y se coloca en la cámara del extractor del equipo Soxhlet, que está compuesto por un tubo de extracción, un balón de vidrio y un condensador del solvente, en el cual se pueden emplear distintos solventes de acuerdo con el objetivo y la matriz vegetal (Zhang et al., 2018). Comúnmente es usado como metodología de referencia por sus rendimientos. Alara et al. (2018) informaron que en las hojas de *Vernonia* se extrajeron 54 mg AGE g⁻¹ hoja (base seca) usando 2 horas de Soxhlet con una relación de extracción de 1:20 p/v.

1.9.7. Elección del método de extracción

La elección de la metodología de extracción es vital en los procesos de obtención de compuestos bioactivos, además está muy ligada con el propósito para el cual se requiera el extracto, y para ello se debe tener en cuenta lo siguiente:

- a) La estabilidad al calor: La mayoría de las tecnologías emplean aplicación continua de calor para mejorar la solubilidad de los compuestos de interés, sin embargo, las

matrices vegetales son muy inestables a las altas temperaturas, por ello es fundamental mantener la temperatura en rangos que no alteren el analito de interés (Abubakar & Haque, 2020)

- b) Costo y pureza del compuesto bioactivo: Se debe tener en cuenta el mercado al cual se quiere dirigir el o los metabolitos obtenidos, ya que a mayor pureza mayor será su costo, y a su vez mayor complejidad en las técnicas de extracción (Banerjee et al., 2017). Por ejemplo, si se requiere extraer un compuesto de bajo costo en bajas concentraciones, la maceración es una tecnología que se ajusta a estos requerimientos. Por el contrario, para tener mayor concentración y selectividad se deben emplear distintas técnicas como Soxhlet con evaporación y fraccionamiento para obtener un extracto más concentrado que a su vez tendrá un costo mayor.
- c) Duración del proceso de extracción: Se debe tener en cuenta la estabilidad de los compuestos de interés y su solubilidad ya que esto dará una pauta para elegir un método relativamente rápido como la decocción o por el contrario extracciones largas como la maceración (Ruiz-Montañez et al., 2014).
- d) Propósito final del extracto: Si el extracto directamente se incorpora en una matriz alimentaria humana, es muy común usar tecnologías como la maceración o las infusiones, que de acuerdo con los estándares se pueden complementar con tecnologías como la evaporación por vacío para concentrar los metabolitos de interés (Patel et al., 2019).
- e) La naturaleza del solvente: Se debe tener en cuenta sus propiedades micro y macroscópicas ya que de esta forma se logra comprender las interacciones entre moléculas solvente-solvente y soluto-solvente, con lo cual cada solución de extracción posee una selectividad de acuerdo con el compuesto que se quiera extraer (El Seoud, 2009). Adicional a esto, se debe conocer su manejo seguro, que no sea tóxico e inflamable (Joshi & Adhikari, 2019); su costo, que permita una viabilidad en el mercado, que sea fácilmente recuperable con un bajo impacto ambiental (Reichardt & Welton, 2010a), su viscosidad, ya que juega un rol fundamental en la penetración en la matriz vegetal (Teutenberg et al., 2009), y su punto de ebullición el cual debe ser lo más bajo posible para evitar el deterioro de los compuestos de interés por calor (Abubakar & Haque, 2020). Por ello, los rendimientos de extracción de compuestos fenólicos están altamente correlacionados con la naturaleza del solvente. Pese a la gran cantidad de compuestos fenólicos que existen con diversas propiedades fisicoquímicas tal como lo describe (Alara, et al., 2021), los solventes orgánicos próticos y apróticos de polaridad media como el metanol, acetona, etanol, cloroformo, n-hexano, acetato de etilo, entre otros, son los más empleados (Villamil-Galindo et al., 2020; Zhang et

al., 2018). Estos solventes son inflamables, volátiles y ejercen diversos efectos negativos en la salud humana y ambiental, dependiendo de las concentraciones y tiempos de exposición a estos (Reichardt & Welton, 2010). Por ello, se ha venido regulando su uso, especialmente en el sector de los nutraceuticos y extractos medicinales, abriéndole paso a los denominados solventes verdes, los cuales provienen de fuentes renovables como biomasa, subproductos de maderables o de la agricultura, poseen una alta solvatación, no son tóxicos y no son inflamables (Chemat et al., 2012). Para la obtención de fenoles comúnmente se usa el etanol y mezclas de etanol-agua para lograr una extracción más completa de las matrices vegetales (Zuorro et al., 2019). Varios autores han estudiado el uso de este tipo de solventes en matrices vegetales (Guandalini et al., 2019; Zhu et al., 2015; Zuorro et al., 2019) incluso a partir de subproductos agroindustriales. Fernández-Agulló et al (2013) reportó que para la obtención de fenoles a partir de cáscaras de nogal, el agua 100% obtuvo los mejores rendimientos (44%) y la mezcla etanol-agua (1:1) presentó las actividades antioxidantes más altas comparada con los extractos de metanol, y etanol (100%).

1.10. Tecnologías alternativas de extracción sólido-líquido.

La extracción es un fenómeno multiparamétrico fundamental en la recuperación de analitos de interés a partir de matrices vegetales, como es el caso de los compuestos fenólicos con alto valor bioactivo. Sin embargo, durante los últimos años la eficiencia, la selectividad y el impacto ambiental que tienen las técnicas convencionales de extracción, como las mencionadas previamente, han generado el creciente interés en el desarrollo de nuevas tecnologías con el fin de mejorar los rendimientos de extracción con tiempos reducidos que permiten una mayor capacidad de procesamiento con un impacto menor a nivel ambiental (Panja, 2018). Por ello, se ha introducido el concepto de química verde para la extracción de compuestos. Chemat et al (2012) definieron la extracción verde como *‘El descubrimiento y diseño de procesos de extracción que reduzcan el consumo de energía, permitan el uso de solventes alternativos y productos naturales renovables, que garanticen un extracto/producto seguro y de alta calidad’*. Esto permitió establecer seis principios fundamentales para la aplicación de procesos de extracción alternativa verde (Chatel, 2018; Chemat et al., 2012).

- Principio 1: Innovación mediante la selección de variedades y el uso de recursos vegetales renovables.
- Principio 2: Uso de solventes alternativos, principalmente agua o agro-solventes.
- Principio 3: Reducción del consumo de energía a través de la recuperación de energía y el uso de tecnologías innovadoras.

- Principio 4: Producción de productos secundarios en lugar de residuos, para incluir la industria de bio-refinación y agro-refinación.
- Principio 5: Reducción de las operaciones unitarias y favorecimiento de procesos seguros, robustos y controlados.
- Principio 6: Buscar un extracto no desnaturalizado y biodegradable sin contaminantes.

Estos principios no son normas o reglas sino más bien una guía para lograr un objetivo en común en términos de los objetivos de desarrollo sostenible. Con ello, se han venido empleando distintas tecnologías de extracción como la extracción con líquidos presurizados (PLE). Este es un método de extracción automatizado relativamente nuevo basado en la extracción a temperatura elevada (50-200°C). Donde la alta presión mantiene los solventes en estado líquido por encima de su punto de ebullición, lo cual genera una alta solubilidad y tasa de difusión de solutos en el solvente, y una alta penetración del solvente en la matriz vegetal. La PLE disminuye drásticamente el consumo de tiempo de extracción y solvente y tiene una mejor repetibilidad en comparación con otros métodos (Zhang et al., 2018).

La Extracción por fluidos supercríticos (SFE) implica el uso de una sustancia en estado líquido y gaseoso, sometido a condiciones de temperatura y presión específicas. En estas condiciones, el fluido supercrítico tiene propiedades únicas que lo hacen eficiente para la extracción de compuestos de interés (Panja, 2018). El fluido supercrítico más comúnmente utilizado es el dióxido de carbono (CO₂), que se vuelve supercrítico a una temperatura de aproximadamente 31°C y una presión de 74 bar. Sin embargo, otros fluidos supercríticos, como el agua y el etanol, también pueden utilizarse en ciertos casos (Ferrentino et al., 2018).

La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica utilizada para extraer compuestos de interés de diversas muestras utilizando microondas como fuente de energía. En este método, las microondas generan calor selectivamente en el material de la muestra, lo que acelera la transferencia de masa y mejora la eficiencia de extracción (Sarah et al., 2018). Debido a la eficiencia de calentamiento de las microondas, se puede utilizar una menor cantidad de solventes, lo que reduce los costos y el impacto ambiental (Spigno & De Faveri, 2009).

Estas tecnologías alternativas se han usado para extraer compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales, pero existe una tecnología con versatilidad y selectividad destacables, que mediante su accesibilidad y proyección industrial en la extracción sólido-líquido permitió que este trabajo de investigación doctoral se enfocara en ella, dicha tecnología es la extracción asistida por ultrasonido.

1.11. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

Las investigaciones y desarrollo de productos alimenticios y nutraceuticos con ultrasonido (US) vienen en un constante crecimiento puesto que su aplicación ha permitido reducir tiempos de procesamiento, aumentar los rendimientos de extracción, y ha mostrado tener bajos costos de mantenimiento. Adicionalmente, el US ha mostrado mejorar propiedades físicas y sensoriales de algunos alimentos, como en el caso de la obtención industrial de aceite virgen de oliva y en la obtención de pigmentos como la clorofila y betacarotenos (Clodoveo et al., 2017; Tamminen et al., 2022). Además, el uso de ultrasonido como tecnología de extracción ha sido muy relacionado con la química verde (*Green Chemistry*) gracias a que reduce la energía empleada por los sistemas de extracción convencional, también permite el uso de solventes no convencionales o también llamados 'verdes' con buenos resultados, incluso esta tecnología se ha empleado como herramienta de descontaminación y remediación ambiental (Chatel, 2018; Mason, 2007). Chemat et al (2017) afirmaron que a escala de laboratorio la cantidad de dióxido de carbono generada en una extracción Soxhlet es de $6400 \text{ g CO}_2 \text{ 100g}^{-1}$ de material extraído y para una extracción con maceración es de $3600 \text{ g CO}_2 \text{ 100g}^{-1}$ de material extraído, viéndose reducido a $200 \text{ g CO}_2 \text{ 100g}^{-1}$ de material extraído cuando se emplea la extracción asistida por ultrasonido.

Esta tecnología alternativa se fundamenta en la generación de ondas sonoras con frecuencias superiores a los 20 kHz las cuales son imperceptibles para el oído humano (Cravotto & Cintas, 2006). La transformación de la energía eléctrica en energía mecánica produce las oscilaciones mecánicas que constituyen el ultrasonido. Estas ondas acústicas se propagan a través de un medio elástico líquido, gaseoso o sólido donde se generan varios ciclos de compresión y descompresión, lo cual genera una alteración estructural sobre la matriz en la cual se aplica la UAE, donde la presión negativa generada durante la descompresión del ciclo supera la fuerza de atracción entre las moléculas de la matriz generando espacios intermoleculares con burbujas de cavitación, las cuales incrementan su volumen gracias a la coalescencia. Además, durante el ciclo de compresión las burbujas colapsan, generando un aumento de la temperatura y presión en micro sectores de la matriz vegetal, permitiendo que la interacción solvente-soluto sea mucho más rápida (Kumar et al., 2021; Welti-Chanes et al., 2017). Adicional a esto, el colapso de las burbujas de cavitación y las ondas acústicas generan sobre la matriz vegetal los siguientes fenómenos: la fragmentación, la erosión localizada, la formación de poros, la fuerza de cizallamiento, el aumento de la absorción y el índice de hinchamiento en la matriz vegetal, dando lugar a la solubilización de los metabolitos secundarios de interés en el solvente empleado, ya que durante la fragmentación celular se incrementa el área superficial,

aumentando la tasa de transferencia de masa, permitiendo una mayor recuperación de compuestos bioactivos (Alara et al., 2021; Goula et al., 2017).

El equipamiento para aplicar la extracción asistida por ultrasonido consiste en un generador eléctrico acoplado a un transductor y a un emisor cuya función es emitir las ondas acústicas a través del medio de propagación. En la industria se utilizan comúnmente 2 tipos de equipos de ultrasonido, uno con una sonda de diámetro variable para emitir las ondas ultrasónicas y el otro usando un baño. No obstante, el uso del baño ultrasónico esta más orientado a labores de limpieza o catalizar algunas reacciones, ya que la distribución de la potencia no es uniforme, contrario a la sonda ultrasónica la cual ejerce una distribución de las ondas más uniforme y genera una turbulencia en el medio de extracción la cual permite una mayor interacción del solvente con el soluto (Chemat et al., 2017; Welti-Chanes et al., 2017) En la Figura 1.7. se ilustran las distintas disposiciones en que se puede emplear la extracción asistida por ultrasonido en la obtención de compuestos bioactivos.

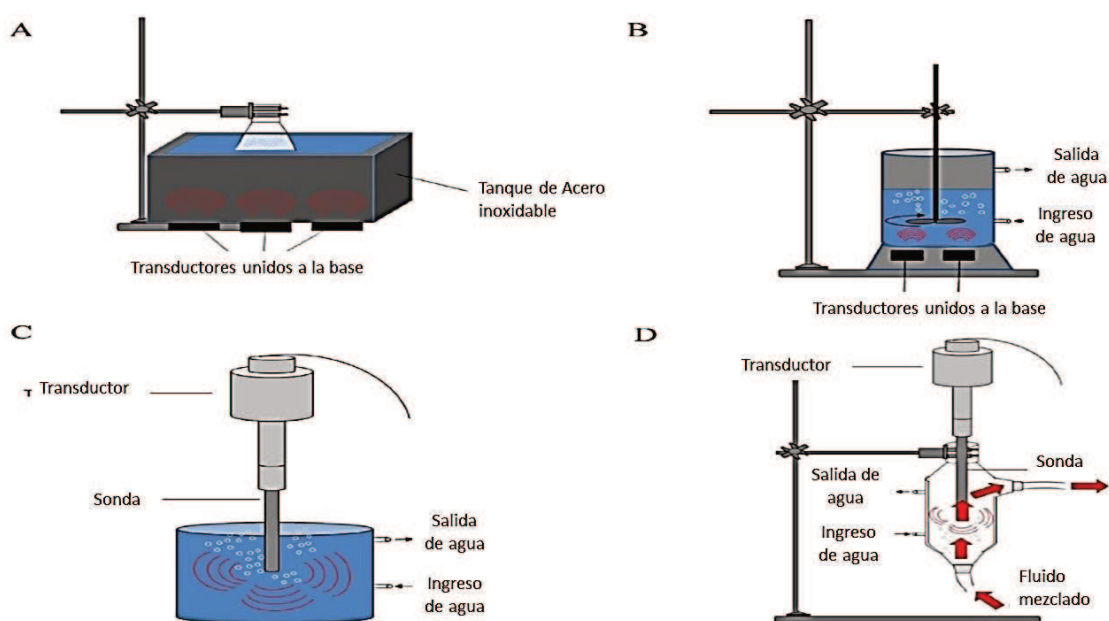


Figura 1.7. Sistemas ultrasónicos de uso común (A: baño de ultrasonido, B: reactor de ultrasonido con agitación, C: sonda de ultrasonido, D: sonificación continua con sonda de ultrasonido) (Adaptado de Chemat et al. (2017))

Existen factores exógenos y endógenos fundamentales para el diseño de un proceso de extracción de compuestos bioactivos mediante el uso de ultrasonido, dentro de los cuales encontramos:

1.11.1. Impacto de la potencia.

La potencia empleada en un extractor con ultrasonido genera grandes cambios físicos y químicos en el medio utilizado. Uno de los métodos más empleados para determinar la potencia efectiva del ultrasonido es por calorimetría, basada en que una parte de la potencia total que entra al equipo de extracción asistida por ultrasonido se disipa en forma de calor en el medio. En este caso la potencia efectiva de ultrasonido se calcula de acuerdo con la ecuación 1.1 (Toma et al., 2011):

$$P = m \cdot Cp \cdot \frac{dT}{dt} \quad EC. 1.1$$

Donde: Cp es la capacidad calorífica del solvente utilizado a presión constante (J/g.°C); m es la masa del solvente en gramos; y dT/dt es la variación de la temperatura por segundo.

La variación de la potencia genera cambios drásticos en los materiales sometidos a UAE como es el caso de la fuerza de cizallamiento generada, el volumen de las microburbujas de cavitación y la velocidad de estas, aumentando en función de la potencia empleada (Sajjadi et al., 2015; Toma et al., 2011). Sin embargo, es necesario optimizar este parámetro para reducir el consumo de energía en el proceso, obteniendo los mejores rendimientos de extracción.

1.11.2. Impacto de la Frecuencia

La frecuencia empleada en un sistema de extracción con US afecta directamente en la morfología de las burbujas de cavitación, de igual forma dándole selectividad a esta tecnología de extracción. El incremento en la frecuencia acústica en medios líquidos tiende a generar un descenso en la producción e intensidad de la cavitación (Chukwumah et al., 2009). González-Centeno et al. (2015) estudiaron el efecto de la frecuencia (40, 80, 120 kHz) en la extracción de compuestos fenólicos de subproductos del procesamiento de uva, optimizando su extracción a 40 kHz con un tiempo de extracción de 25 minutos ya que la variación de la frecuencia no solo está ligada con el tamaño de las burbujas de cavitación, sino que también influye directamente con la resistencia a la transferencia de masa. En la tabla 1.1 se muestra las características de una burbuja típica a 20 kHz y 500 kHz, estas características permiten tener una selectividad sobre el tipo de moléculas que se requieren extraer de la matriz vegetal (Chemat et al., 2017).

Tabla 1.1. Comparación de las características de una burbuja producida a 20 y 500 kHz con una intensidad de US de 10 W cm⁻²

Frecuencia (kHz)	Amplitud (μm)	Presión acústica (atm)	Longitud de onda (cm)	Duración del colapso (μs)	Diámetro promedio (μm)
20	2.95	5.4	7.42	10	330
500	1.1	5.4	0.29	0.4	13

1.11.3. Impacto de la intensidad

La energía que se transmite por segundo y por metro cuadrado de superficie emisora, se conoce como intensidad. Está directamente correlacionada con la amplitud del transductor, y modula la presión de la amplitud de la onda; los incrementos en dicha presión ocasionan que el colapso de la burbuja sea más violento. Sin embargo, las altas intensidades generan un rápido deterioro de las sondas. No obstante, para solventes de alta viscosidad se requiere un nivel de intensidad ultrasónica mayor (Tiwari, 2015). La intensidad ultrasónica (UI) se calcula en función de la potencia empleada, de acuerdo con la ecuación 1.2.

$$UI = \frac{4P}{\pi D^2} \quad \text{EC. 1.2}$$

Donde: UI es la intensidad ultrasónica (W cm⁻²), P es la potencia del ultrasonido (W), y D es el diámetro de superficie emisora del transductor. Para lograr el umbral mínimo de cavitación la UI debe ser aumentada de acuerdo con la frecuencia. Generalmente, los equipos con sistemas ultrasónicos utilizados para la extracción son fabricados a una frecuencia determinada que garantice una adecuada cavitación (Niazi et al., 2014)

1.11.4. Influencia del solvente.

La intensidad ultrasónica empleada en un sistema de UAE en medios líquidos, depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del solvente empleado, lo cual lo convierte en un factor determinante (Martínez-Ramos et al., 2020). La viscosidad, la tensión superficial y la presión de vapor del solvente afectan significativamente el umbral de cavitación. Puesto que, durante el ciclo de compresión se genera una presión negativa, la cual debe superar las fuerzas de cohesión de la interacción de moléculas solvente-solvente, al aumentar la viscosidad o la tensión superficial del medio, estas interacciones incrementan, así como también lo hace el umbral de la cavitación acústica generada (Santos-Zea et al., 2021). Por otro lado, los solventes con una baja presión de vapor, favorecen la intensidad en que las burbujas de cavitación colapsan, no obstante, la presión de vapor es función de la temperatura del medio, por ello es otro importante factor para tener en cuenta en el momento de diseñar un proceso de UAE (Flannigan & Suslick, 2010).

En la obtención de compuestos fenólicos con ultrasonido se suelen emplear solventes como el agua, el etanol, metanol y el hexano, sin embargo, el agua y el etanol son los más empleados por su seguridad y baja toxicidad (Wen et al., 2018).

1.11.5. Influencia de la temperatura

El paso de las ondas sonoras a través del medio y la colisión de las burbujas de cavitación genera cambios drásticos en el equilibrio del sistema por acción conjunta de la presión y el aumento de la temperatura (Cravotto & Cintas, 2006). La temperatura es un factor determinante ya que su aumento está directamente relacionado con un descenso en la viscosidad y la tensión superficial del solvente. Lo cual reduce la energía con la cual colapsan las burbujas de cavitación, disminuyendo considerablemente el efecto del ultrasonido sobre la matriz vegetal (Chemat et al., 2017a). Por otro lado, al disminuir la viscosidad por el aumento de la temperatura, se favorece la difusión del analito hacia el solvente, adicionalmente, se debilitan las interacciones entre el analito y la matriz vegetal, facilitando su extracción (Yusoff et al., 2022). Para obtener una extracción eficiente, la temperatura es un parámetro que se debe optimizar.

1.11.6. Influencia de la matriz vegetal

Hay una gran variedad de matrices vegetales empleadas como fuentes de compuestos bioactivos que se pueden obtener a través de la extracción asistida por ultrasonido, por lo cual se debe tener en cuenta sus características químicas y físicas, para así definir un pretratamiento adecuado que no degrade los componentes de interés, así como establecer un tamaño de partícula que facilite la interacción con el solvente y el efecto del ultrasonido. Otro parámetro crítico es la relación sólido-líquido la cual afecta significativamente la eficiencia de extracción, para ello se debe tener en cuenta el tamaño de partícula, la composición y la plasticidad del material vegetal, y lograr establecer una relación sólido-líquido que favorezca la recuperación de compuestos bioactivos (Shahidi, 2022).

Petigny et al. (2013) optimizaron la extracción de compuestos fenólicos a partir de hojas de boldo a escala piloto, empleando una intensidad de 23 W cm^{-2} durante 30 minutos a 36°C , mejorando los rendimientos de extracción en un 22% comparado con la extracción por maceración durante 120 minutos. Clodoveo et al. (2017) lograron un aumento cercano al 50% en tocoferol y 30% de carotenoides en la extracción industrial de aceite de oliva, empleando una potencia de 4000 W. El uso de la cavitación en algunos casos permite la identificación y obtención de más compuestos fenólicos, tal como lo reportado por (Munekata et al., 2020), quienes compararon el uso de ultrasonido y la extracción con maceración y agitación, además del uso de agua frente al etanol al 50%, en tomillo, viendo

que, con ultrasonido se identificaron 25 compuestos fenólicos frente a 22 de la extracción tradicional, además, que el mayor contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana se logró con los extractos con agua y ultrasonido. Por otro lado, (Rezaie et al., 2015) reportaron que la extracción con agua durante 10 minutos con ultrasonido obtuvo los mismos rendimientos de compuestos fenólicos totales que la maceración con agitación por 24 horas, a partir de cáscaras de pistachos.

Barba et al. (2016) realizaron una revisión en cuanto a las nuevas tecnologías de extracción. Allí determinaron que para obtener los compuestos bioactivos a partir de desperdicios y subproductos vegetales es necesario optimizar los parámetros de procesamiento con respecto a las fuentes naturales, el tipo de compuesto de interés y la tecnología utilizada. El ultrasonido ha demostrado su eficiencia para la extracción de compuestos bioactivos, proporcionando una mayor recuperación en comparación con las extracciones clásicas, preservando también el objetivo de las bioactividades de los extractos (Pingret et al., 2012). En el estudio de la extracción de polifenoles de aronia se usó ultrasonido durante 15 minutos, obteniéndose rendimientos tres veces mayores con UAE comparado con una extracción por maceración por 60 minutos (Galván D'Alessandro et al., 2012).

Para los subproductos de achicoria, se analizó la influencia de la potencia ultrasónica en el rendimiento de extracción para las dos temperaturas (30 y 70°C) estudiadas, comparando experimentos con y sin asistencia ultrasónica (0 y 100 W, respectivamente). A las dos temperaturas estudiadas, se observó un significativo efecto positivo del ultrasonido sobre la tasa de extracción en los primeros treinta minutos (Pradal et al., 2016). En el caso de la cáscara de naranja se logró una reducción del tiempo de extracción de hasta 3 veces con esta tecnología (Khan et al., 2010). Los equipos más utilizados en la extracción asistida por ultrasonido es el baño (Figura 1.10) y las sondas. El baño de ultrasonido se utiliza principalmente por su bajo costo y accesibilidad, cuenta con una desventaja y es que el líquido del baño que rodea al recipiente que contiene la mezcla líquido-sólido de la extracción, provoca una disminución del efecto de las ondas generadas por ultrasonido (Takeuchi et al., 2008). El uso de sondas ultrasónicas es ampliamente utilizado a escala laboratorio y piloto, puesto que se ha demostrado que genera altas tasas de transferencia de masa debido a que las ondas ultrasónicas no tienen ningún tipo de obstáculo durante la propagación de las ondas acústicas, no obstante, se debe tener precaución ya que algunos solventes con el uso continuo generan corrosión (Wen et al., 2018).

1.12. Modelado de la cinética de extracción

Con el fin de mejorar el control, diseño y rendimiento del proceso de extracción sólido-líquido, se debe tener un profundo conocimiento acerca de los fenómenos involucrados en este proceso, para ello, el modelado matemático permite describir de manera acertada los procesos de extracción a través de la obtención de los coeficientes cinéticos, la difusividad efectiva (D_e) y el coeficiente de transferencia de masa (K_f) (Wright, 2015). El modelado matemático comúnmente se aplica usando 2 tipos de enfoques. El primero es a través de modelos empíricos los cuales surgen de una función estándar que, con solución analítica, permite conocer la velocidad de extracción sin llegar a obtener los coeficientes cinéticos (D_e y K_f) (Simeonov et al., 2004). En el segundo enfoque, se aplica un modelo teórico-matemático con el fin de obtener los coeficientes cinéticos del proceso, de esta forma describir y encontrar un punto óptimo de las variables de extracción para obtener mayores rendimientos (Winitorn et al., 2008).

Las soluciones analíticas de la ecuación de la segunda ley de Fick son ampliamente usadas, adaptándola a distintas geometrías definidas, y de esta forma, describir el proceso de transferencia de masa en la extracción (Wright, 2015; Ziaedini et al., 2010), asumiendo:

- 1) La partícula sólida es esférica, simétrica y homogénea.
- 2) La difusión del analito es unidireccional y puede describirse por el coeficiente efectivo de difusión (D_e), que es constante.
- 3) El solvente está perfectamente homogenizado, y la concentración de los analitos en el solvente depende únicamente del tiempo.
- 4) Se asume que la concentración de todos los analitos en la interfaz del líquido interno y externo es igual.
- 5) La concentración inicial es calculada mediante los datos experimentales obtenidos en el tiempo final de cada extracción (Winitorn et al., 2008).

Varios estudios de extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales se han llevado a cabo por medio de las soluciones de la segunda ley de Fick asumiendo distintas geometrías, especialmente la figura esférica (Ben Amor & Allaf, 2009; Fernando & Soysa, 2015; Perez et al., 2011).

Sin embargo, en procesos de extracción donde la matriz vegetal es susceptible del fenómeno de hinchamiento, lo cual irregulariza el tamaño y forma de las partículas de los sólidos, no es recomendable usar este tipo de modelados. También se ha reportado el uso de la ley de velocidad adaptada a la extracción de compuestos fenólicos mediante extracción sólido-líquido (Xiao et al., 2012) siguiendo la ecuación 1.3 para determinar la concentración de soluto a cualquier tiempo.

$$C(t) = \frac{t}{\left(\frac{1}{h}\right) + \left(\frac{t}{C_{\infty}}\right)} \quad (Ec\ 1.3.)$$

Donde:

$C(t)$ = Concentración del contenido total de fenoles (g AGE Kg⁻¹)

t = tiempo de extracción (min)

h = la velocidad inicial de extracción

C_{∞} = Concentración de compuestos fenólicos totales luego de tiempo infinito

Por otro lado, los modelos empíricos son propuestos para este tipo de procesos (Galván D'Alessandro et al., 2014)'. Diferentes ecuaciones empíricas han sido propuestas para modelar la extracción de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales, mostrando una gran variabilidad de acuerdo con el tipo de compuestos de interés y las condiciones de extracción (temperatura, relación sólido-líquido, solvente, entre otros) (Sant'Anna et al., 2012)'. Por la similitud entre las cinéticas de extracción y de la sorción se puede aplicar el modelo de Peleg (ecuación 1.4) (Jokić et al., 2010; Peleg, 1988).

$$C(t) = \frac{t}{k_1 + k_2 * t} \quad (Ec\ 1.4.)$$

Donde:

$C(t)$ = Concentración del contenido total de fenoles (g AGE Kg⁻¹)

t = tiempo de extracción (min)

k_1 = Constante de velocidad de extracción (min⁻¹)

k_2 = Constante de capacidad (g AGE Kg⁻¹).

El modelo de Peleg ha sido ampliamente reportado en el estudio de la cinética de extracción sólido-líquido de compuestos fenólicos (Galván D'Alessandro et al., 2014; Gerke et al., 2018; Vetel et al., 2012)' representando adecuadamente los fenómenos de extracción. Jokić et al (2010) estudiaron la cinética de extracción de compuestos fenólicos a partir de granos de soja, encontrando en el modelo de Peleg, altos coeficientes de correlación con los datos experimentales ($R > 0.985$), incluso mayores a un modelo logarítmico ($R\ 0.92$). En términos generales, el tipo de modelado aplicado a la obtención de compuestos fenólicos por extracción sólido-líquido, depende en gran medida de la técnica empleada, si se hace de manera continua o discontinua (por lotes) (Chan et al., 2014). En la extracción por lotes se puede dividir el proceso de extracción en 2 etapas: la primera, la etapa rápida (etapa de lavado), y en la segunda, la etapa lenta (etapa de difusión) como se puede observar en la Figura 1.8 (Perez et al., 2011).

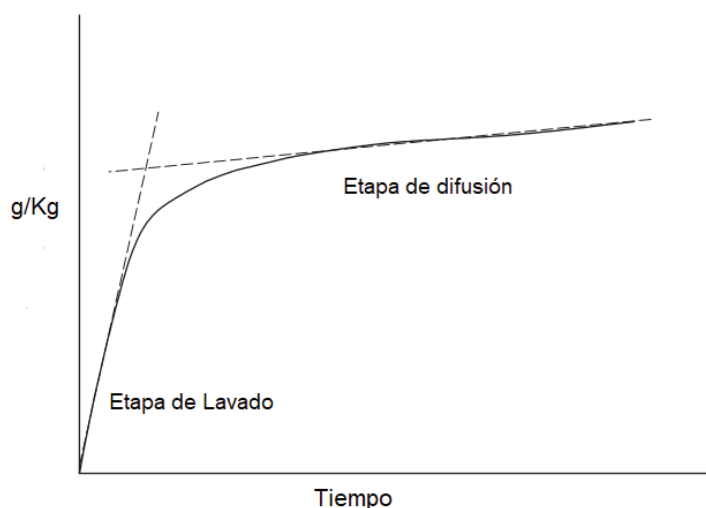


Figura 1.8. Curva típica de extracción de compuestos fenólicos sólido-líquido por lotes. Adaptado de Chan et al (2014).

1.13. Bioactividad y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son moléculas de gran importancia que no solo actúan como antioxidantes, neutralizando especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, sino que también desempeñan diversas funciones en la diferenciación celular, desactivación de compuestos pro-carcinógenos, mantenimiento y reparación del ADN, entre otras acciones importantes (Forni et al., 2019). Los flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y taninos, especialmente las proantocianidinas, son compuestos fenólicos especialmente relevantes. Dependiendo de su estructura, los compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento y proliferación de células cancerosas, tanto de manera directa, mediante la donación de electrones y protones, como de manera indirecta, al alterar las actividades de enzimas clave en la respuesta celular (Ferreira-Santos et al., 2021). Es vital para retrasar y prevenir el síndrome metabólico, caracterizado por anomalías metabólicas como hipertensión, obesidad central, resistencia a la insulina y dislipidemia. La patogénesis del síndrome metabólico implica factores genéticos y adquiridos que intervienen en la vía final de la inflamación de las células y tejidos en el cuerpo humano (Ambroselli et al., 2023).

Con el paso de los años, se han reportado cada vez más efectos positivos de los componentes presentes en las frutas y hortalizas, lo que ha llevado a un aumento en su consumo. Se han identificado tendencias significativas para aprovechar estos compuestos beneficiosos, especialmente utilizando técnicas novedosas y amigables con el medio ambiente, como las tecnologías de ultrasonidos, microondas y alta presión (Goula et al., 2017). En este sentido, se han recopilado los abundantes compuestos fenólicos presentes en diferentes tipos de matrices vegetales, donde se han estudiado exhaustivamente sus

efectos beneficiosos para la salud, incluyendo actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antihipertensivas y anti hiperglucémicas tanto *in-vitro* como *in-vivo*, especialmente en frutos como la frutilla y la manzana ricos en compuestos como elagitaninos, antocianinas, flavonoles, flavanoles, entre otros (Ky et al., 2016; Pap et al., 2021; Rue et al., 2018). Investigaciones recientes, respaldadas por resultados obtenidos en estudios *in-vivo*, han demostrado efectos positivos en la reducción del estrés oxidativo. Estos hallazgos respaldan la noción de que las bayas y sus productos funcionales tienen un gran potencial económico para mantener la salud y la función humana (Cervantes et al., 2020; Forni et al., 2019; Pap et al., 2021).

Los compuestos bioactivos de los alimentos pueden sufrir cambios significativos cuando están expuestos a condiciones ambientales adversas (como luz, oxígeno y temperatura), y a las condiciones gastrointestinales. Esto representa un gran desafío a la hora de generar suplementos nutracéuticos ricos en metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos (Coman et al., 2020). Los modelos *in-vitro* del sistema gastrointestinal se utilizan para simular las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal humano, reproduciendo proporciones constantes de enzimas, concentraciones de sal, pH y tiempo de digestión en cada fase digestiva, de manera que se asemejen a las condiciones reales (Ferreira-Santos et al., 2021). Estos modelos estáticos de digestión *in-vitro* son ampliamente utilizados debido a las numerosas ventajas que presentan sobre los modelos *in-vivo* y los modelos dinámicos gastrointestinales. Permiten obtener conclusiones importantes sobre la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de diferentes matrices, como alimentos, compuestos bioactivos, suplementos y moléculas aisladas (Gómez-Maqueo et al., 2020).

Los residuos que se generan durante el acondicionamiento industrial de frutilla y manzana pueden ser dispuestos mediante metodologías tradicionales como los rellenos sanitarios, incineración, producción de biocompostaje, o biocombustibles. Estos métodos se emplean en distintos grados en función de las características de los residuos y del proceso agroindustrial, teniendo un bajo valor agregado. No obstante, en la agroindustria de la frutilla y la manzana Granny Smith, actualmente no se tienen procesos estándares de revalorización adecuados, lo que genera graves impactos ambientales en la región por consumo y procesamiento masivo. Adicionalmente, las tendencias de consumo están orientadas hacia productos naturales que aporten un beneficio sobre la salud de los consumidores. Por ello, el uso de materias primas secundarias como los residuos agroindustriales, mediante su revalorización a través de tecnologías alternativas de bajo impacto ambiental, representa una estrategia hacia la reutilización de estas matrices, maximizando la rentabilidad de este sector gracias a la economía circular. Este enfoque

permite el máximo aprovechamiento y revalorización de estos subproductos a un bajo coste, mediante la obtención de compuestos de alto valor nutracéutico. Actualmente, no existe información clara sobre la respuesta de la cáscara de manzana y residuos del acondicionamiento de frutilla a factores de estrés abiótico, su extracción, estabilidad y potencial bioactivo como agente antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno.

1.14. OBJETIVOS

1.14.1. Objetivo general

El objetivo principal de esta tesis es estudiar estrategias sostenibles para la revalorización de los sub-productos agroindustriales de frutilla y manzana, reduciendo los impactos negativos en el ambiente y en la economía. Se propone incrementar el potencial bioactivo de estos tejidos mediante la aplicación de estreses abióticos como herramienta de biofortificación, modelando y optimizando la extracción de compuestos fenólicos por medio del uso de tecnologías emergentes y solventes eco-amigables; estudiando su bioaccesibilidad, biodisponibilidad y citotoxicidad *in-vitro*. Finalmente, se estabilizarán los extractos ricos en polifenoles obtenidos mediante su microencapsulación.

1.14.2. Objetivos específicos

- Evaluar el impacto de diferentes solventes de extracción en el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de los extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith', así como investigar el efecto de la etapa de extracción de pectina asistida por ultrasonido y la secuencia de realización de las etapas de extracción tanto para obtener compuestos fenólicos como pectina a partir de la cáscara de manzana.
- Estudiar el impacto de dos disolventes eco-amigables (agua y etanol 80%), y diferentes relaciones sólido-líquido sobre el contenido total de compuestos fenólicos, el perfil de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante *in-vitro* de los extractos de residuos agroindustriales de frutilla y manzana 'Granny smith'.
- Estudiar la cinética de extracción por maceración de compuestos fenólicos a partir de los subproductos de la transformación industrial de frutilla y cáscara de manzana 'Granny Smith'.
- Analizar el efecto de las variables de extracción y determinar los parámetros cinéticos de la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales de la frutilla y cáscara de manzana 'Granny Smith' determinando su estabilidad durante la digestión *in-vitro*. Además, de evaluar el potencial bioactivo en modelos celulares.
- Determinar las condiciones óptimas de radiación UVA, temperatura y tiempo de almacenamiento para aumentar el contenido de compuestos fenólicos en los subproductos agroindustriales de la frutilla.
- Determinar las condiciones óptimas de radiación UVA, estrés por daño mecánico y almacenamiento (temperatura y tiempo) para biofortificar con compuestos fenólicos la cáscara de manzana 'Granny Smith'.

- Evaluar y caracterizar la microencapsulación de los extractos óptimos obtenidos por extracción asistida por ultrasonido de los residuos agroindustriales de frutilla y cáscara de manzana ‘Granny Smith’.
- Determinar la estabilidad durante el proceso digestivo simulado de los compuestos fenólicos de los residuos, biofortificados con compuestos fenólicos, su extracto optimizado y sus encapsulados con alginato de sodio
- Evaluar el potencial bioactivo a través de cultivos celulares de los tejidos biofortificados con compuestos fenólicos y sus extractos optimizados por asistencia del ultrasonido.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

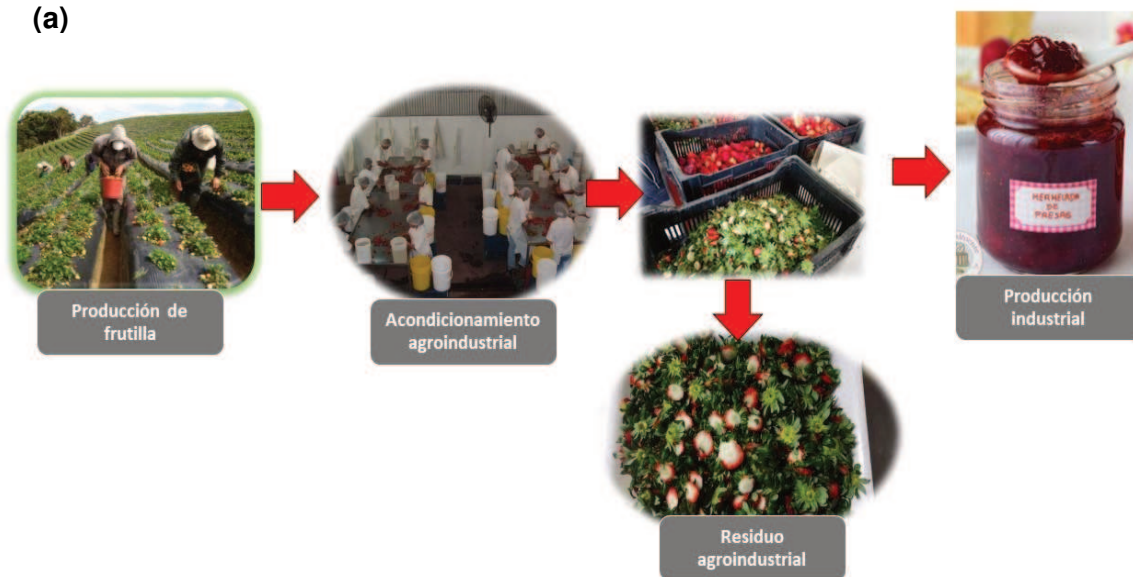
Para el caso de la frutilla, el material vegetal se obtuvo a partir del residuo generado por el acondicionamiento de las frutillas (*Fragraria x ananassa Duch*), destinadas al procesamiento industrial. El residuo consiste básicamente en la parte no comestible o aprovechable del fruto, tales como sépalos, pedúnculo, hojas y restos de fruta (RF), que se retiran manualmente durante el proceso (Figura 2.1-a). El residuo no corresponde a un cultivar en particular sino a una mezcla de la cosecha diaria y fue obtenido en una plantación de frutilla ubicada en la región de Coronda (Provincia de Santa Fe, Argentina) a través de la Ing. María del Huerto Sordo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en los periodos de cosecha de los años 2019 al 2023.

Las manzanas (*Malus Domestica*) del cultivar 'Granny Smith' se obtuvieron en un mercado local en Santa Fe, Argentina, en cosechas de los años 2019 a 2023, fueron llevadas al Instituto de Tecnología de los Alimentos (FIQ-UNL, Argentina) donde se almacenaron en cámara de refrigeración a 1°C, 90-95%HR hasta el día de su procesamiento para la obtención de productos mínimamente procesados, en un estudio simultaneo con la pulpa de la fruta según Faicán et al. (2018). La fruta se sometió a un proceso de selección donde se observaba que tuviera madurez de consumo, tamaño uniforme y no presentara daños mecánicos ni biológicos. Posteriormente, se lavaron con agua potable, seguido por una desinfección con hipoclorito de sodio a 100 ppm durante 3 minutos en inmersión, y posterior enjuague con agua potable. A continuación, se procedió a retirar la cáscara (GS) manualmente por medio de un cuchillo de acero inoxidable manteniendo un grosor de aproximadamente 1 mm. Las cáscaras se almacenaron en bolsas de polipropileno de 40 µm (Figura 2.1-b).

Se determinó el contenido de humedad en RF y GS por triplicado mediante termogravimetría utilizando un analizador de humedad RADWAG PMR 50 (Polonia) con radiador halógeno como elemento calefactor, a 80°C durante 1 hora. RF mostró una humedad promedio de $89.2\% \pm 0.07$. Para GS se determinó una humedad promedio de $80.4\% \pm 0.52$. Ambos tejidos vegetales tienen un gran contenido de humedad lo cual los hace muy perecederos y vulnerable al ataque y proliferación de microorganismos, por ende, es imperante establecer estrategias que puedan conservar y explotar el potencial que tienen estos residuos agroindustriales.

Para realizar la presente tesis se emplearon alrededor de 5-7 Kg de residuo cada año comprendiendo muestras anuales de los años 2019 al 2023.

(a)



(b)



Figura 2.1. Proceso agroindustrial donde se generan los residuos de (a) frutilla y (b) manzana "Granny Smith".

2.2. Estudio de la extracción secuencial de compuestos fenólicos y pectina a partir de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

2.2.1. Preparación de las muestras.

Parte de las cáscaras frescas de manzana ‘Granny Smith’ (P) se almacenaron en bolsas de polipropileno de 40 μm (300 g de cáscara) a -20°C para el estudio de la extracción de compuestos fenólicos AE (Etapa obtención de pectina posterior a la extracción de compuestos fenólicos, Figura 2.2). Otra parte de la cáscara se sometió a secado en una estufa de tiro forzado a 50°C por 24 horas, obteniendo una cáscara seca con un 9% de humedad, que se molió y tamizó hasta un tamaño de partícula $< 1\text{ mm}$ (DP: cáscara seca, Figura 2.2). Se almacenaron en bolsas de polipropileno de 40 μm (100g) para la obtención de BE (Etapa de obtención de pectina previa a la extracción de compuestos fenólicos, Figura 2.2).

2.2.2. Extracción secuencial de compuestos fenólicos en la cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

2.2.2.1. Diseño experimental

Se estudiaron diferentes sistemas de extracción de compuestos fenólicos a partir del tejido vegetal de descarte de manzana ‘Granny Smith’ (GS) a través de la extracción sólido-líquido, asistida por ultrasonido. A través de un diseño factorial de tres variables, se evaluó el efecto del tipo de solvente [agua (100%) y etanol, metanol y acetona (80%)]; la concentración de ácido fórmico (C_{FA}) [0 y 0.5%]; y las etapas de extracción [1 etapa (1/10 p/v) y 2 etapas (1/5 p/v)] sobre el contenido fenólico total (TPC), el contenido total de flavonoides (TF), el perfil de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) de los extractos de GS, con un total de 16 corridas experimentales realizadas por triplicado, y de esta forma seleccionar el sistema de extracción más apropiado para obtener compuestos fenólicos de alta calidad a partir de residuos de manzana GS.

2.2.2.2. Proceso de extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos se realizó por triplicado según Villamil-Galindo et al. (2020) para estudiar el proceso de extracción en una etapa y en dos etapas. Para la extracción en una etapa, se puso en contacto la cáscara de manzana molida con el solvente en una relación de extracción 1:10 p/v, se homogenizó la mezcla con un vortex para luego ser sonicada en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner, Testlab, Buenos Aires, Argentina) a 160 W y 40 kHz durante 15 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4°C (Neofuge 18R Heal Force centrifuge, Shanghai, China). Se recogió el sobrenadante y se reservó hasta el análisis de TPC, TF, DPPH y FRAP.

La extracción en dos pasos consistió en sonicar durante 15 min a 20°C , la mezcla de la muestra molida más el solvente (1:5 p/v) (primera etapa), y luego se centrifugó a 12000 g

durante 20 min a 20°C. El sobrenadante se recogió en un matraz aforado, y el residuo se volvió a extraer con solución de solvente fresco (1:5 p/v) (segunda etapa). A continuación, se sonicó la mezcla, se centrifugó y se separó el sobrenadante. Ambos sobrenadantes se mezclaron y analizaron. El sistema de extracción con el mayor rendimiento de compuestos fenólicos se utilizó para analizar el impacto de la extracción de polifenoles en la extracción de pectina y viceversa.

2.2.3. Extracción secuencial de pectina

Con el fin de aprovechar integralmente el tejido GS se realizaron procesos de extracción y cuantificación de fenoles, previo (BE) y posteriormente al proceso de secado y al proceso de extracción de pectina (AE), de esta forma, determinar la viabilidad de la extracción secuenciada de fenoles y pectina a partir de este subproducto.

2.2.3.1. Diseño experimental

La secuencia en que se realizan las etapas de extracción de los compuestos fenólicos y de pectina, así como la metodología utilizada, podrían afectar el rendimiento final de pectina obtenida a partir de subproductos agroindustriales. La pectina se obtuvo antes (BE) y después (AE) de la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscaras de manzana. La pectina BE se extrajo de la cáscara seca de la manzana (DP), y la pectina AE se obtuvo del tejido residual seco obtenido tras la extracción de compuestos fenólicos (DRT). Además, se evaluaron dos metodologías de extracción para la extracción de pectina, tanto BE como AE, con extracción asistida por ultrasonido (US) y sin ultrasonido (proceso convencional, TR) (Figura 2.2).

Después de cada ensayo de extracción, se caracterizó la pectina determinando el rendimiento de extracción de pectina, el grado de esterificación de la pectina (DE), el contenido de metoxilo y el peso equivalente de pectina.

2.2.3.2. Metodologías de extracción de pectina.

La pectina se extrajo de acuerdo con cuatro tratamientos diferentes de extracción, cada uno realizado por triplicado. El primero consistió en la extracción a partir de la cáscara seca de manzana (DP), denominada pectina BE. Por otro lado, se extrajo pectina a partir del tejido residual seco (DRT) obtenido tras la extracción de fenoles, denominada pectina AE, mediante extracción asistida por ultrasonidos (US), siguiendo la metodología de Marañón et al (2017) con algunas modificaciones (Figure 2.2). Se introdujeron cinco gramos de muestra (DP o DRT) en un Erlenmeyer con una solución de ácido cítrico (pH 2.0) para completar una relación de extracción de 1:18. La mezcla se sonicó en un baño de ultrasonido (Testlab) a 40 kHz y 160 W a 50°C durante 1 h. Tras centrifugar a 12000 g durante 20 min a 4°C (Neofuge 18R Heal Force), se filtró el sobrenadante, se añadió al

mismo volumen de etanol absoluto y se dejó precipitar la pectina durante 30 min a 4°C. El pellet de pectina se centrifugó (20 min, 12000g, 4°C), se recogió y se lavó tres veces con etanol. El precipitado de pectina se dejó reposar durante 12 h en etanol al 70% y se secó en una estufa de laboratorio (50°C, 24 h). De esta forma se obtuvo pectina BE-US y pectina AE-US (Figura 2.2).

Los tratamientos restantes consistieron en un método de extracción convencional de pectina (TR) también se realizó de forma similar, pero sustituyendo la etapa de ultrasonidos por un baño termostático (80°C, 2 h) para determinar el efecto de la extracción asistida por ultrasonidos. Se obtuvo pectina en las etapas BE-TR y pectina AE-TR (Figura 2.2). Los rendimientos de las extracciones se calcularon como sigue (ecuación 2.1):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso de la pectina (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

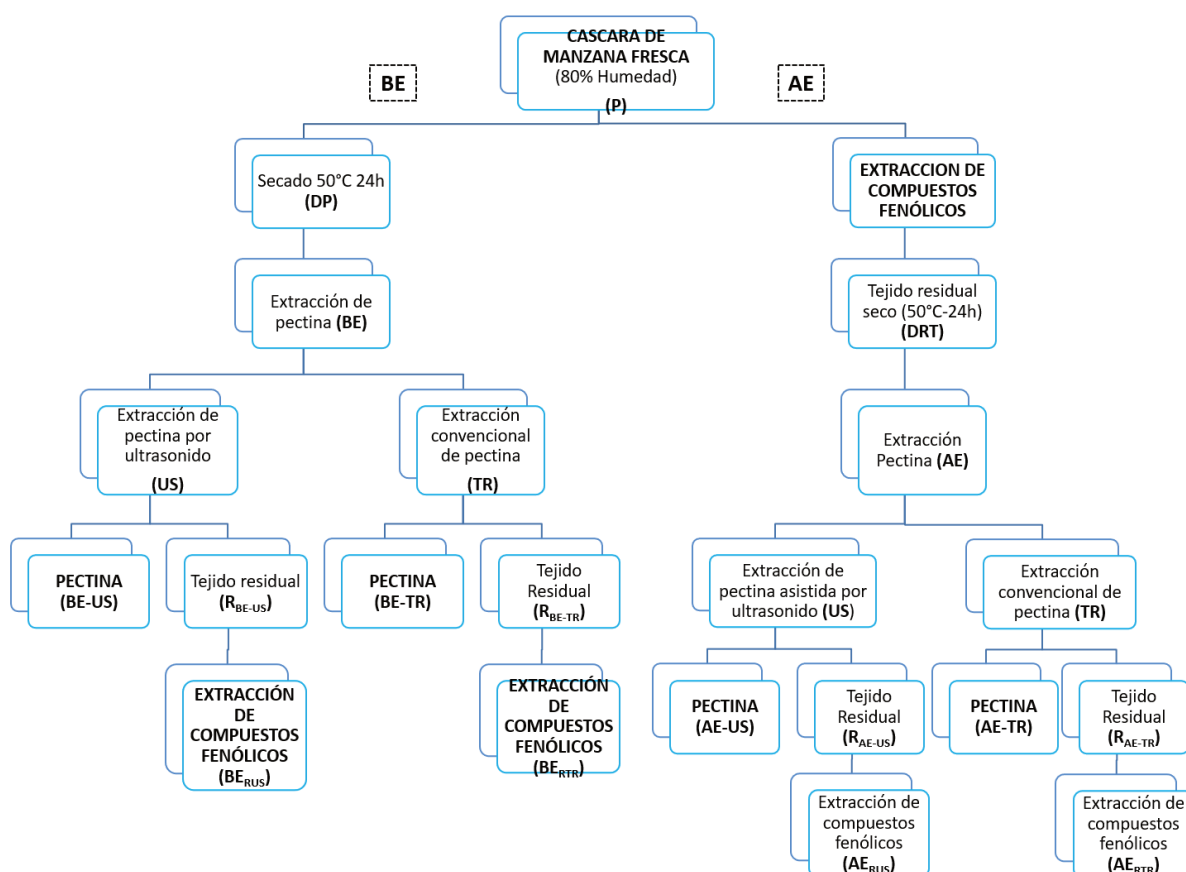


Figura 2.2. Diagrama de flujo de los procesos de extracción de compuestos fenólicos y pectina de la cáscara de manzana 'Granny Smith'.

Donde: BE: Proceso de extracción de pectina antes de obtener compuestos fenólicos; AE: Proceso de extracción de pectina después de obtener los compuestos fenólicos; P: Cáscara fresca; DP: cáscara seca; DRT: Tejido residual seco; TR: extracción convencional

de pectina; US: extracción de pectina asistida por ultrasonidos; RBE-US: tejido residual de la extracción de pectina.

2.3. Extracción por Soxhlet

Mediante un diseño experimental factorial se estudió el efecto del solvente de extracción (S) y de la relación sólido-líquido (R) en la extracción de compuestos fenólicos de cada tejido vegetal (RF y GS). Las dos variables experimentales de cada diseño factorial fueron S y R, con dos niveles [S: agua (W) y etanol 80% (EtOH)] y cuatro niveles [R: 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40 p/v]. Para garantizar una extracción uniforme, los tejidos residuales del acondicionamiento industrial de frutilla (RF) y manzana 'Granny Smith' (GS) frescos fueron previamente congelados a -20°C , posteriormente se molieron en un mortero empleando CO_2 para evitar el descongelamiento de la muestra y la lixiviación de metabolitos de interés, hasta obtener un tamaño de partícula $\leq 1\text{ mm}$. La extracción por metodología Soxhlet se realizó de acuerdo con lo planteado por Alara et al. (2018) con algunas modificaciones. El tejido residual molido (RF o GS) se colocó en un dedal extractor de celulosa para Soxhlet, pesando la cantidad necesaria según las diferentes relaciones sólido-líquido estudiadas. Posteriormente se agregó la cantidad de solvente de acuerdo con cada experiencia (Figura 2.3). La extracción Soxhlet se realizó durante 4 h para la extracción con EtOH y 8 h para la extracción con W (tiempos determinados en ensayos preliminares). Los extractos se enfriaron a temperatura ambiente, se filtraron, se llevaron a volumen final, y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis (determinación de TPC, perfil de compuestos fenólicos y Capacidad antioxidante por DPPH).



Figura 2.3. Extracción de compuestos fenólicos por Soxhlet

2.4. Extracción por maceración

Con el fin de modelar y optimizar la extracción de compuestos fenólicos a partir de estos subproductos (RF y GS) se realizaron ensayos de extracción siguiendo un diseño factorial. Las tres variables experimentales fueron el solvente (S: 100% agua, W, y 80% etanol, EtOH); la relación sólido-líquido (S:L: 1:20, 1:30, y 1:40 p/v), y la temperatura de extracción (T: 20°C y 70°C) (Tabla 2.1). Cada ensayo de extracción se llevó a cabo por triplicado con agitación (400 rpm) por 4h, empleando un agitador magnético con placa calefactora y control de temperatura (DragonLab MS-H280 Pro) (Figura 2.4).

Tabla 2.1. Diseño factorial para la extracción de compuestos fenólicos a partir de RF y GS por maceración.

Factor	Niveles
Solvente (S)	Agua (100%) (W)
	Etanol (80:20) (EtOH)
Temperatura (T)	20° C
	70° C
Relación de extracción (S:L)	1:20
	1:30
	1:40

Se tomaron muestras a los 5, 10,15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos de extracción. Cada muestra fue filtrada en filtros de nylon 0.45 µm (Gamafil, Buenos Aires, Argentina). Los extractos se almacenaron a -20°C hasta realizar los análisis de fenoles totales (TPC), y capacidad antioxidante por DPPH* (CA). Adicionalmente, se determinó el perfil de fenoles obtenido por HPLC-DAD para el punto final de cada ensayo de extracción.

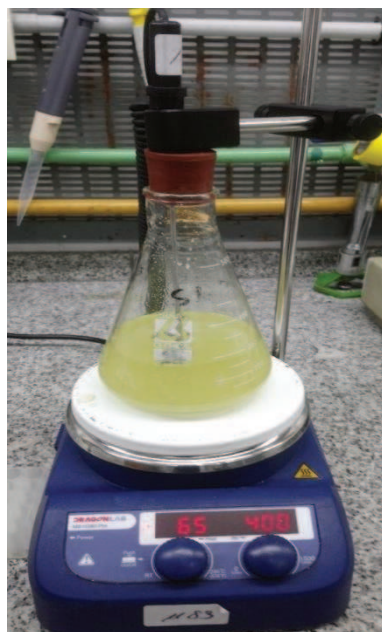


Figura 2.4. Extracción por maceración.

2.4.1. Modelado de las cinéticas de extracción por maceración de RF y GS

Los resultados experimentales obtenidos para TPC y CA durante los ensayos de extracción por maceración en ambos tejidos vegetales se estudiaron comparativamente a través de dos modelos matemáticos empíricos. El modelo de Peleg modificado propuesto por Galván D'Alessandro et al. (2014) (MI, ecuación 2.2), y el modelo empírico (MII) que considera las dos fases de la extracción solido-liquido (etapa de lavado y etapa de difusión) propuesto por Bengardino et al. (2019) para la extracción de compuestos bioactivos (ecuación 2.3). Estos modelos describen la cinética de extracción y permiten analizar la influencia de las variables de extracción estudiadas y las diferencias entre ambos tejidos vegetales. Los modelos también ayudan a determinar las mejores condiciones de extracción para obtener los mayores valores de TPC y CA para cada matriz.

$$C(t) = \frac{t}{\left(\frac{1}{K1}\right) + \left(\frac{1}{K2}\right) * t} \quad (Ec\ 2.2)$$

Donde (t) es el tiempo de extracción en minutos, $C(t)$ es la concentración de TPC (g AGE Kg⁻¹) o CA, la actividad antioxidante por DPPH (μmol TE g⁻¹), $K1$ es la constante de velocidad de Peleg en g AGE min⁻¹ Kg⁻¹ para TPC o μmol TE min⁻¹ g⁻¹ para la capacidad antioxidante, $K2$ es la constante de capacidad de Peleg en g AGE Kg⁻¹ para TPC o μmol TE g⁻¹ para la capacidad antioxidante

$$C(t) = cw(1 - e^{-Kwt}) + cd(1 - e^{-Kdt}) \quad (Ec\ 2.3)$$

Donde $C(t)$ es la concentración de TPC (g AGE Kg⁻¹) o la actividad antioxidante por DPPH (μmol TE g⁻¹) al tiempo t , cw y cd son las cantidades de soluto extraído en el solvente en la

etapa de lavado, y difusión respectivamente (g AGE Kg^{-1} de subproducto), así como la capacidad antioxidante ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$ de subproducto). K_w y K_d son los coeficientes cinéticos de extracción durante el periodo de lavado y el periodo de difusión respectivamente.

2.5. Estudio del proceso de biofortificación de residuos agroindustriales de frutilla y cáscara de manzana.

2.5.1. Estudio de la biofortificación del residuo agroindustrial de frutilla (RF) mediante el uso de radiación UVA y diferentes temperaturas de almacenamiento

Los ensayos se realizaron siguiendo un diseño factorial de superficie de respuesta con tres variables (x_i) en tres niveles: dosis UVA (LOW, MEDIUM, and HIGH), temperatura de almacenamiento (ST: 5, 10, and 15°C), y tiempo de almacenamiento (TM: 0, 24, 48, y 72 h). El tratamiento de radiación UVA se llevó a cabo en una cámara climática (Memmert, Alemania) equipada con dos lámparas UVA de 8 W con un rango de espectro de 320-400 nm. Las dosis de irradiación aplicada sobre RF fueron de 28.8 KJ m^{-2} (UVA-LOW), 57.6 KJ m^{-2} (UVA-MEDIUM) y 86.4 KJ m^{-2} (UVA-HIGH), determinadas con un dosímetro UVA (modelo 501, Solar Light Co., PA, EE. UU.). La muestra se invirtió en el medio del tiempo de proceso para garantizar una dosis homogénea de radiación UVA. El RF fue expuesto a radiación UVA durante 1, 2 y 3 horas a 20°C . Después de cada tratamiento, las muestras de RF tratadas con UVA (RF-E) se almacenaron en contenedores de polipropileno cubiertos con película de PVC (20 g). Las muestras tratadas con UVA (RF-E) y las muestras control (RF-N, tejido de RF no tratado), igualmente empaquetadas, se almacenaron a 5, 10 y 15°C (ST), 90% HR, durante 24, 48 y 72 h (TM) (Figura 2.5), y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su análisis (Y_k : determinación de TPC, actividades de las enzimas PAL y PPO, contenido de compuestos fenólicos individuales, y TPC_{HPLC}). Cada una de las respuestas (Y_k) se modeló en función de las variables del proceso (x_i) a través de una ecuación polinómica de segundo orden (ecuación 2.4).

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 * \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 \quad \text{Ec. 2.4.}$$

donde: Y_k es la respuesta analizada (TPC, PAL, PPO, concentración de compuestos fenólicos individuales, o TPC_{HPLC}); β_0 , β_i , β_{ij} y β_{ii} son los coeficientes; y x_i son las variables independientes estudiadas (dosis UVA, ST y TM).

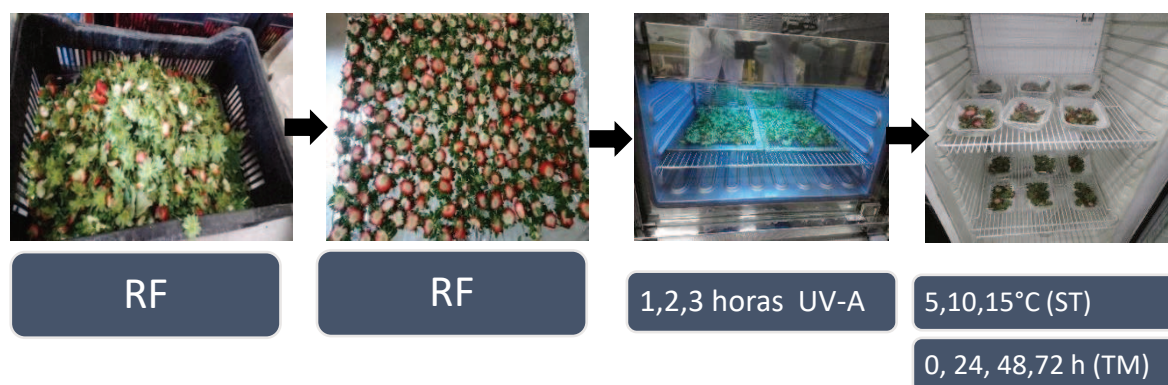


Figura 2.5. Diagrama de la estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos de los residuos agroindustriales de frutilla (RF).

2.5.2. Estudio de la biofortificación de cáscara de manzana “Granny Smith” (GS) mediante la aplicación de estrés abiótico por daño mecánico y almacenamiento.

Se evaluó el efecto del estrés abiótico debido al daño mecánico inducido por corte, la temperatura y el tiempo de almacenamiento a través de un diseño factorial general con tres variables: tipo de corte (Ct: [C1 (entera), C2 (5 mm), C3 (1.5 mm)], temperatura de almacenamiento (ST) (20, 15, 10, 5°C) y tiempo de almacenamiento (TM) (0, 12, 24, 48, 72 h) (Figura 2.6). Se realizaron un total de 60 corridas en triplicado. Las muestras después de cada tratamiento se congelaron a -20°C hasta su análisis (determinación de TPC, actividades de las enzimas PAL y PPO, contenido de compuestos fenólicos individuales y TPC_{HPLC}). Antes de cada análisis, se molieron las muestras a un tamaño de partícula de <1 mm.



Figura 2.6. Diagrama de la estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos por estrés por corte en cáscara de manzana “Granny Smith” (GS).

Cada una de las respuestas (Y_k) se modeló para cada tipo de corte (Ct) en función de las variables del proceso (x_i) a través de una ecuación polinómica de segundo orden (ecuación 2.5).

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i x_i + \beta_{i(i+1)} x_i x_{(i+1)} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} x_i^2 \quad \text{Ec. 2.5.}$$

donde: Y_k es la respuesta determinada (TPC, PAL, PPO, concentración de compuestos fenólicos individuales, o TPC_{HPLC}); β_0 , β_i , $\beta_{i(i+1)}$ y β_{ii} son los coeficientes; y x_i son las variables independientes estudiadas (ST y TM).

2.5.3. Estudio de la biofortificación de la cáscara de manzana “Granny Smith” (GS) mediante el efecto combinado de la aplicación de estrés abiótico por daño mecánico, radiación UVA y almacenamiento.

Para esta estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos de GS, se evaluó el efecto combinado del estrés por corte y la dosis de radiación UVA para biofortificar la cáscara de manzana ‘Granny Smith’ (GS) con compuestos fenólicos luego de realizar tres tipos diferentes de cortes (Ct): entero (C1), 5 mm de ancho (C2), y 1.5 mm de ancho (C3), seguido de la aplicación de radiación UVA en una cámara climática (Memmert, Alemania) con dos lámparas LED-UVA de 8 W con un espectro de rango de 320-400 nm, utilizando diferentes dosis (UVA): Control (0 KJ m⁻²), UVA3 (3 h con 86.4 KJ m⁻²), y UVA6 (6 h con 172.8 KJ m⁻²). Las dosis se determinaron con un dosímetro UVA (modelo 501, Solar Light Co., PA, EE. UU.). En el medio del tiempo de radiación, se invirtió el sentido de la muestra GS para garantizar una radiación uniforme. Las muestras se empacaron en bandejas de polipropileno (30 g) y se cubrieron con película de PVC. Las bandejas se almacenaron a cuatro temperaturas (ST), 20°C, 15°C, 10°C y 5°C, todas con a 90% HR, durante el tiempo de almacenamiento óptimo (TM) determinado en el ensayo de estrés por corte (3.5.2), determinado previamente. Posteriormente, las muestras se congelaron a -20°C hasta el momento de análisis, en el cual se molieron a un tamaño de partícula inferior a 1 mm y se analizaron (Figura 2.7).

En cada proceso de biofortificación con compuestos fenólicos se evaluó la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL), la enzima polifenol oxidasa (PPO), el contenido total de compuestos fenólicos (TPC), la concentración de los compuestos fenólicos individuales, y su total determinados por HPLC (TPC_{HPLC}) como respuestas.

Para el análisis de las respuestas en esta estrategia de biofortificación con

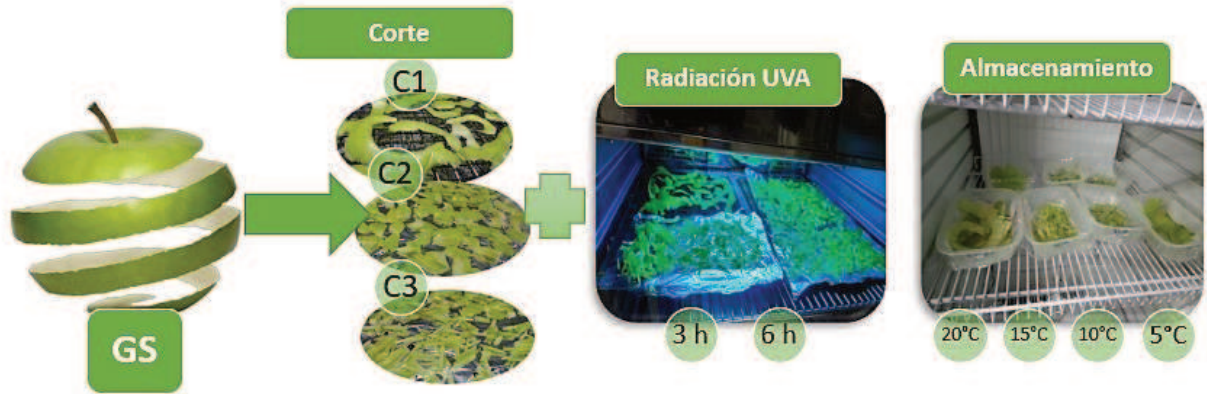


Figura 2.7. Diagrama de la estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos de GS mediante la aplicación combinada de estrés por corte y radiación UVA.

compuestos fenólicos de GS, se analizó la actividad de las enzimas fenilalanina amoníaco liasa y polifenol oxidasa, junto con el contenido total de compuestos fenólicos y el contenido individual de compuestos fenólicos determinado por HPLC-DAD. Los resultados se presentaron como el porcentaje de variación (%VQ) de la respuesta evaluada en el tiempo óptimo de almacenamiento determinado en el estrés por corte, Q_t ($t=56h$), en referencia a cada tipo de estrés por corte (C1, C2, C3) en el día cero (Q_0), calculado mediante la ecuación 2.6.

$$\%VQ = \left(\frac{Q_t - Q_0}{Q_0} \right) \times 100 \quad \text{Ec 2.6.}$$

Cada una de las respuestas (Y_k) se modeló para cada tipo de corte (C_t) en función de las variables del proceso (x_i) a través de una ecuación polinómica de segundo orden (ecuación 2.7).

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i x_i + \beta_{i(i+1)} x_i x_{(i+1)} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} x_i^2 \quad \text{Ec. 2.7.}$$

donde: Y_k es la respuesta determinada (TPC, PAL, PPO, concentración de compuestos fenólicos individuales, o TPC_{HPLC}); β_0 , β_i , $\beta_{i(i+1)}$ y β_{ii} son los coeficientes; y x_i son las variables independientes estudiadas (UVA y ST).

2.6. Extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos de residuos agroindustriales de frutilla (RF) y cáscara de manzana (GS)

2.6.1. Diseño experimental

Para estudiar la técnica de extracción asistida por ultrasonido (UAE) se utilizó un sistema de sonda ultrasónica (UP400S Hielscher Inc., Teltow, Alemania) con un sonotrodo cilíndrico de 22 mm de diámetro (Horn 22, Hielscher Inc.). La potencia del equipo se controló entre el 20-100% de la potencia total (400W), con una frecuencia de 24 kHz. La Tabla 2.2 muestra las variables experimentales y niveles ensayados junto al cálculo de la intensidad ultrasónica aplicada para cada tipo de solvente y porcentaje de potencia ensayado en cada tejido vegetal, según las ecuaciones 1.1 y 1.2 descritas en la introducción. Determinado por el método calorimétrico mediante el registro del aumento de temperatura debido a la conversión de la energía acústica en energía térmica durante los ensayos (Milić et al., 2013). La temperatura se registró utilizando una termocupla acoplada al sistema de sonda ultrasónica. Durante la UAE, se tomaron muestras a los 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 min para estudiar la cinética de extracción de RF y GS sin biofortificar con compuestos fenólicos (RF-N y GS-N). A continuación, los extractos se centrifugaron a 12000 *g* por 20 min a 4 °C, en una centrífuga Neofuge 18 R Heal Force (Shanghai, China), y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su análisis (determinación de TPC y perfil de compuestos fenólicos).

Tabla 2 2. Intensidad del ultrasonido (UI) calculada para cada condición de extracción estudiada.

Solvente	Potencia US (%)	UI (Wm⁻²)
Agua	20	264243.70
	60	319460.78
	100	316666.67
EtOH 40%	20	195665.73
	60	208713.49
	100	195462.65
EtOH 80%	20	129973.05
	60	135099.69
	100	140890.20

US: Ultrasonido. EtOH 40%: Mezcla de etanol y agua (40:60 v/v).
EtOH 80%: Mezcla de etanol, y agua (80:20 v/v).

2.6.2. Modelado y optimización de la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos

La herramienta estadística utilizada para evaluar la interacción entre las distintas variables e identificar las condiciones óptimas del proceso de extracción por ultrasonido fue la metodología de superficie de respuesta (RSM), a través de un diseño experimental de Box-Benkhen (BB). El diseño experimental se realizó en RF y GS. Se estudiaron tres variables independientes (X_i) en tres niveles: X_1 : concentración de etanol (0, 40, 80%), X_2 : relación sólido-líquido (1:20, 1:30, 1:40 p/v), y X_3 : porcentaje de potencia de ultrasonidos (20, 60, 100%). Se realizaron 15 corridas experimentales, incluyendo dos réplicas en el punto central, y se utilizaron tres niveles codificados diferentes: bajo (-1), medio (0) y alto (+1). La respuesta estudiada y optimizada fue el contenido total de compuestos fenólicos (TPC).

Para cada punto de diseño de BB, se determinó el TPC durante los 24 min de extracción para RF-N y GS-N (de acuerdo con ensayos preliminares). El TPC calculado en base seca obtenido durante la UAE para cada punto del diseño experimental se ajustó al modelo empírico de Peleg modificado (Ec. 2.2) debido a la forma similar de las curvas de sorción y extracción (Galván D'Alessandro et al., 2014), y se determinaron las constantes cinéticas correspondientes (K_1 and K_2 ; Ec. 2.2) a través de regresión no lineal.

Para cada punto de diseño, se ajustaron los valores obtenidos de K_1 y K_2 (Ec. 2.2) a un modelo polinómico de segundo orden (Ec. 2.8) para describir el efecto de las variables de UAE sobre cada constante cinética y maximizar los TPC utilizando las constantes obtenidas de los modelos cinéticos como se describe a continuación.

$$K_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 * \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 \quad \text{Ec. 2.8.}$$

Donde: K_i es la constante del modelo de Peleg, K_1 o K_2 ; β_0 es la constante del modelo, β_i es el coeficiente lineal, β_{ii} es el coeficiente cuadrático, β_{ij} es el coeficiente para el efecto de interacción, y X_i es el valor codificado adimensional de cada variable independiente (X_1 : concentración de etanol; X_2 : relación sólido-líquido; y X_3 : porcentaje de potencia de ultrasonidos).

Los modelos desarrollados para K_1 y K_2 tanto para RF-N como GS-N, se usaron para obtener los valores óptimos de las variables de extracción que maximizan las constantes del modelo de Peleg.

Para validar los modelos de predicción desarrollados, se realizaron extracciones en las condiciones experimentales óptimas obtenidas, a partir del diseño BB tanto en los tejidos no biofortificados (RF-N y GS-N), como en los biofortificados en las condiciones óptimas determinadas previamente (RF-E y GS-E). Además, se modelaron los cambios en el contenido fenólico total (TPC) a lo largo del tiempo utilizando los parámetros cinéticos obtenidos de la Ecuación 2.4, para los valores óptimos de las variables, en la ecuación de Peleg modificada (Ec. 2.2). Para estas extracciones, se determinaron el perfil de compuestos fenólicos para ambos subproductos, con y sin biofortificación bajo las condiciones óptimas previamente determinadas, su bioaccesibilidad y su bioactividad en cultivo celular. Estos resultados se compararon con una extracción de control realizada bajo parámetros óptimos, pero sin asistencia de ultrasonidos (MAE).

Al final de cada extracción, el extracto fue filtrado y el etanol fue recuperado por evaporación mediante un Rotavapor R-220 (Büchi, Suiza). Se congeló el extracto a -80°C y se liofilizó en un liofilizador Labconco (Kansas City, MO). El extracto seco se pesó, y siguiendo la ecuación 2.9, se determinó el rendimiento del proceso (Figura 2.8).

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Peso extracto liofilizado (Kg)}}{\text{Peso residuo inicial (Kg)}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.9}$$

Finalmente, se realizó un análisis proximal del bagazo retenido luego del proceso de filtrado del extracto óptimo obtenido por UAE de RF-E y GS-E con el fin de conocer su composición principal y poder explorar otras estrategias de aprovechamiento integral a futuro. La humedad se determinó por gravimetría, mediante un analizador de humedad RADWAG PMR 50 (Polonia) con radiador halógeno como elemento calefactor, a 80°C durante 1.5 horas. La proteína total y las cenizas se determinaron según los métodos oficiales de la AOAC 991.20 (2000) y 940.26 (2005), y los lípidos totales por el método de Bligh & Dyer (AOAC, 2005)). La fibra cruda se realizó por el método enzimático-gravimétrico (método oficial 985.29 de la AOAC). El extracto libre de nitrógeno (hidratos de carbono) se calculó por diferencia (100 - %humedad - %proteína - %cenizas - %lípidos).

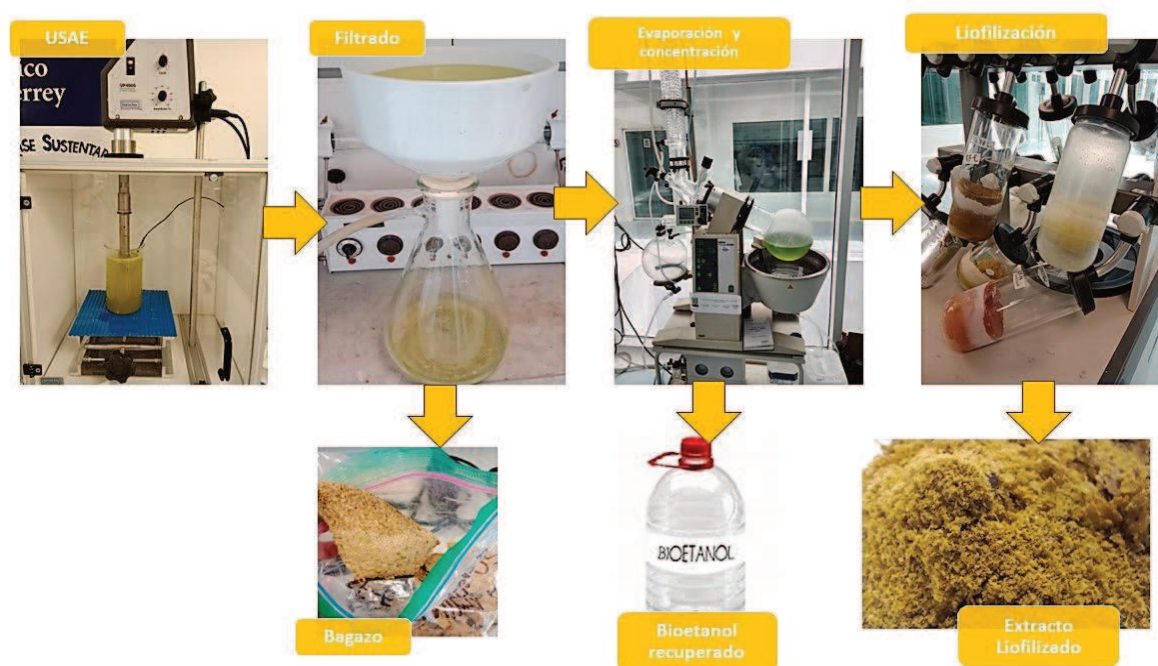


Figura 2.8. Diagrama del proceso de obtención del extracto UAE rico en compuestos fenólicos liofilizado.

2.7. Determinación de la estabilidad de los compuestos fenólicos durante el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*.

El ensayo se realizó según la metodología propuesta por Flores et al. (2014). Consta de tres fases diferenciadas: fase oral (Fluido Salival Simulado, FS), fase gástrica (Fluido Gástrico Simulado, FG), y fase intestinal (Fluido Duodenal Simulado, DF, y solución biliar, BF) (FI). La composición de las diferentes fases se preparó de acuerdo con la Tabla 2.3.

Las muestras biofortificadas con compuestos fenólicos (RF-E y GS-E) y sus controles (RF-N y GS-N) se pesaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con tapón en una proporción de 1:3 p/v con FS. Se añadió el líquido FS que contenía α -amilasa humana (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EE.UU.) y se incubó la muestra a $\text{pH } 6.8 \pm 0.2$ durante 2 min. A continuación, se añadieron 6 mL de FG que contenían pepsina gástrica porcina Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, EE.UU.), se ajustó el pH a 1.3 ± 0.2 y se volvió a incubar la muestra durante 1 h. El paso final del procedimiento de digestión incluyó la adición de 6 mL de DF y 3 mL de BF que contenían pancreatina porcina (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EE.UU.). El pH se ajustó a 7.0 ± 2 , y las muestras se incubaron durante 1 h más a 37°C en un agitador (New Brunswick Scientific, Eppendorf). Se recogieron alícuotas (0.5 mL) después de cada fase, y las muestras se colocaron inmediatamente en un baño de agua a 90°C durante 3 min para inactivar las enzimas. A continuación, se centrifugaron a

4°C durante 15 min a 9000×g (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemania), y se recogió el sobrenadante. Cada digestión se realizó por triplicado. Cada fase obtenida se analizó mediante HPLC-DAD, y la fase final (fase intestinal) se utilizó para realizar los ensayos de cultivo celular.

Tabla 2.3. Composiciones de fases gastrointestinales simuladas.

Reactivo	Fluido salival (FS)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)	Fase duodenal (DF)
Agua desionizada (mL)	500	500	500	500
NaCl (g)	0.0585	2.752	7.012	5.259
KCl (g)	0.0745	0.824	0.564	0.376
NaHCO ₃ (g)	1.05		3.388	5.785
Urea (g)	0.20	0.085	0.10	0.250
NaH ₂ PO ₄ (g)		0.266		
CaCl ₂ ·H ₂ O (g)		0.399		
NH ₄ Cl (g)		0.306		
HCl (mL)		6.5	0.18	0.150
KH ₂ PO ₄ (g)			0.08	
MgCl ₂ (g)			0.05	
Enzimas				
α-Amilasa (g)	1			
Pepsina (g)		2.5		
Pancreatina (g)			9	
Lipasa (g)			1.5	
Sales Biliares (g)				8.20

Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de bioaccesibilidad según la relación entre la concentración de compuestos fenólicos en la fracción intestinal (o fase gástrica) y su concentración inicial en la materia prima o extracto seco (ecuación 2.10).

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{\text{compuestos fenólicos fase intestinal (o fase gástrica)}}{\text{compuestos fenólicos en material}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.10}$$

2.8. Ensayos de potencial bioactivo en cultivo celular.

Las líneas celulares, células de adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2 y HT29), macrófago de ratón (RAW 264.7); murina 3T3-L1 (ATCC) y fibroblasto dérmico primario adulto; (HDFa) se adquirieron en la *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EE.UU.). Las células se mantuvieron en medio águila modificado de Dubelco (DMEM suplementado con un 5% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de antibiótico, estreptomycin (10,000 µg mL⁻¹), a 37°C y bajo un 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

(a)

RF

Biofortificación compuestos fenólicos

Liofilización

Molienda

RF-N RF-E

Bioaccesibilidad

FS

FG

FI

Filtración

Concentración

Liofilización

USRF-N USRF-E

Cultivo celular

Fración intestinal

-Antiinflamatorio

-Antioxidante

-Antiproliferativo

-Antiobesogénico

(b)

GS

Biofortificación compuestos fenólicos

Liofilización

Molienda

GS-N GS-E

Bioaccesibilidad

FS

FG

FI

Filtración

Concentración

Liofilización

USGS-N USGS-E

Cultivo celular

Fración intestinal

-Antiinflamatorio

-Antioxidante

-Antiproliferativo

-Antiobesogénico



2.8.1. Ensayo del potencial antiinflamatorio.

Se probó la actividad antiinflamatoria potencial de la fracción de digestión intestinal de los residuos con y sin biofortificación (RF-N, RF-E, GS-N y GS-E), así como los respectivos extractos obtenidos por UAE (USRF-N, USRF-E y USGS-N y USGS-E). Se realizaron pruebas a distintas concentraciones de los digeridos para RF de 0.11-1.75 mg mL⁻¹ y para GS de 0.2-7.5 mg mL⁻¹ de la fracción digerida. Para este ensayo, se utilizó la línea celular RAW 264.7 para medir la producción de óxido nítrico (NOX) inducida por lipopolisacáridos (LPS) de *Salmonella enterica serotipo typhimurium* (L7261, Sigma-Aldrich, St Louis, MO; EE.UU.). El ensayo se realizó según Moreno-García et al. (2022), con algunas modificaciones. Previamente, se sembraron 100 µL con 5x10⁵ células en cada pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Después de 24 h, se colocaron 50 µL de cada muestra por triplicado y se incubaron durante 4 h a 37°C, seguido de la adición de 50 µL de LPS (10 µg mL⁻¹) a la mitad de los pocillos para estimular el proceso inflamatorio. La mitad de los pocillos se utilizaron como control con 50 µL de medio DMEM y se dejaron incubar durante 18 h a 37°C. La producción de NOX se determinó mediante el sistema de reactivos de Griess (Promega, Madison, WI, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo del sistema de reactivos de *Griess* se basa en la formación de un cromóforo (con absorción a 545 nm) por reacción de la sulfanilamida con el nitrito en medio ácido, seguida de acoplamiento con aminas bicíclicas como el dihidrocloruro de N-1-(naftil) etilendiamina. Brevemente, se tomaron 100 µL de cada muestra y de los controles y se colocaron en una nueva placa de 96 pocillos, se añadieron 10 µL del componente A (1 mg/mL) (N-(1-naftil) etilendiamina dihidrocloruro) a cada pocillo, agitando las placas durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 10 µL del componente B (10 mg mL⁻¹) (ácido sulfanílico) a cada pocillo. La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de nitritos (1.5-50 µM, R² 0.99), y teniendo en cuenta las células sin estímulo LPS y la viabilidad celular. La placa inicial se utilizó para determinar la viabilidad de RAW 264.7 utilizando *CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, WI, EE.UU.), la medición se realizó añadiendo 10 µL de reactivo *CellTiter* en cada pocillo y se dejó incubar 45 minutos a 37°C, después se midió la absorbancia a 490 nm para determinar la viabilidad celular. Los datos se expresaron como porcentaje de inhibición, en referencia a la placa de control positivo y a la viabilidad celular.

2.8.2. Actividad antioxidante celular.

Para medir el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por las células en presencia de diferentes extractos digeridos a 2.2 mg mL⁻¹ para RF y 3.75 mg mL⁻¹ para GS, se sembró una suspensión de células Caco-2 a una densidad de 5 x 10⁵

células/mL en una microplaca negra de 96 pocillos en 100 μ L de medio de crecimiento por placa 24 h antes del ensayo. Para determinar la actividad antioxidante celular de los diferentes extractos, se utilizó la metodología propuesta por Moreno-García et al. (2022) con algunas modificaciones. Después de 24 h, se retiró el medio y cada pocillo se lavó cuidadosamente con PBS. Las muestras se diluyeron en medio DMEM hasta una concentración 2x, y a continuación se añadió el agente fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, 120 μ M) en una concentración final de 60 μ M. La mezcla se añadió a un volumen de 100 μ L en cada pocillo. Para el control negativo y positivo, se colocaron 100 μ L de medio DMEM con 60 μ M de DCFH. Para el blanco de reacción, se añadieron 100 μ L de DMEM. La placa se incubó a 37°C durante 20 min. Posteriormente, se retiraron las soluciones de reacción de cada pocillo y las células se lavaron dos veces con PBS. Para inducir los estímulos prooxidantes en las células, se añadieron 100 μ L/pocillo de APPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)) a 500 μ M, excepto en los pocillos de blanco (100 μ L de DMEM) y de control negativo (100 μ L de PBS). La fluorescencia emitida a 538 nm con excitación a 485 nm se midió cada 2 min durante 120 min a 37°C. Los resultados se expresaron de la siguiente manera (Ecuación 2.11).

$$\%(CAA) = 1 - \left(\frac{\int SA}{\int CA} \right) \quad \text{Ec. 2.11.}$$

2.8.3. Actividad anti proliferativa celular

La fracción digerida de los residuos y extractos de RF y GS se ensayaron sobre la viabilidad de células Caco-2, HT29, y se utilizaron células HDFa como control de células sanas. La proporción de células vivas y muertas se determinó mediante la metodología propuesta por Pacheco-Ordaz et al. (2018). Brevemente, se probaron diferentes concentraciones de extracto (0,0094-122,00 mg mL⁻¹) para RF y para GS (2.00-49.00 mg mL⁻¹). Se sembraron las células Caco-2, HT29 y HDFa, cada una en una placa de 96 pocillos en una suspensión de 100 μ L a 5×10⁵ células mL⁻¹. Tras 24h de incubación a 37°C, se colocaron 100 μ L de cada extracto a las concentraciones finales, y las placas se incubaron durante 48 h a 37°C. Posteriormente, se añadieron 10 μ L de *CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, WI) en cada pocillo y, a continuación, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, EE.UU.). Los valores IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular) de cada muestra se determinaron a partir de los datos de viabilidad porcentual frente a la concentración; éstos se ajustaron a una ecuación sigmoideal asimétrica, y se calculó la concentración adecuada para inhibir el 50% de viabilidad en las células estudiadas.

2.8.4. Estudio del potencial antiobesogénico.

En la Figura 2.10 se ilustra el proceso para determinar el potencial efecto antiobesogénico de los extractos de GS y RF, utilizando la línea celular murina 3T3-L1 (ATCC). El cultivo se llevó a cabo en condiciones estándar. Las células se mantuvieron en cultivo utilizando DMEM (Gibco) suplementado con 10% suero de ternero recién nacido (NBCS) hasta lograr confluencia, además de realizar cambios de medio cada 48 horas. En primer lugar, se determinó que las diluciones a utilizar en el ensayo no fueran lo suficientemente tóxicas como para interrumpir el proceso de diferenciación de las 3T3-L1, para esto, se realizó un ensayo de MTT. Se subcultivaron 10×10^3 células/pozo a una microplaca de 96 pozos. Posterior a las 24 horas del subcultivo celular, se colocaron los diferentes tratamientos durante 24 h. Además, cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. Posteriormente, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 8000 células por pozo, una vez que alcanzaron confluencia se inició el proceso de diferenciación utilizando DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y un coctel de 0.5 mM de isobutil-metil-xantina (IBMX) (Sigma), 1 μ M dexametasona (Dex) (Sigma) y 10 μ g mL⁻¹ de insulina (Sigma). Posterior al día cuatro de la inducción de diferenciación, los cambios de medio subsiguientes se realizaron con DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 10 μ g/mL de insulina. Se usó buffer fosfato (PB) 0.01M pH 7.4 para re suspender todas las fracciones digeridas RF (3.05 mg mL⁻¹) y GS (1.23 mg mL⁻¹) evaluadas. Además de usarse como vehículo (VH), Cada muestra se puso en contacto con las células desde el inicio de la inducción de la diferenciación de las 3T3-L1 cada uno por triplicado. La tinción con rojo oleoso (ORO) permite la identificación visual y cuantitativa de los lípidos presentes en las vacuolas lipídicas de los adipocitos diferenciados. Por lo que una vez transcurridos los ocho días de la inducción de la diferenciación de las 3T3-L1, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y la monocapa de células se lavó dos veces con 1 mL de PB 0.01M pH 7.4. Posteriormente, se realizó la fijación de las células con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, y nuevamente lavados con 1 mL de PB 0.01M. Posteriormente, se realizó un tratamiento de permeado añadiendo 500 μ L de IPA al 60% durante 15 segundos. Para la tinción, se añadió una solución de trabajo de rojo oleoso (5 mg mL⁻¹ en isopropanol) durante 20 minutos. Seguido, la monocapa se lavó en dos ocasiones con PB 0.01M y se observaron al microscopio para el registro fotográfico. Finalmente, el contenido de lípidos totales se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490 nm, como se muestra en la Figura 2.10, calculando el % de lípidos tomando como referencia (100%) al control.

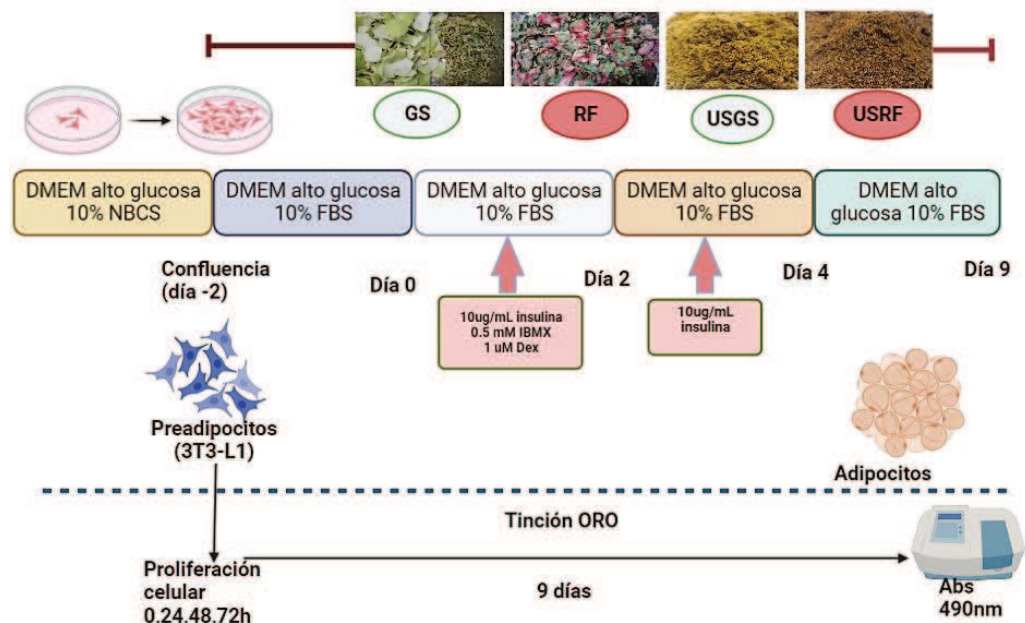


Figura 2.10. Diagrama del proceso de diferenciación celular 3T3-L1 en el ensayo de actividad antiobesogénica de GS y RF.

2.9. Ensayo de obtención de microcápsulas de alginato de sodio con los extractos UAE de RF y GS.

Las microesferas se obtuvieron según la metodología propuesta por Dalponte Dallabona et al. (2020) con algunas modificaciones. Inicialmente, se disolvieron dos gramos de alginato de sodio ($C_6H_7NaO_6$)_n, grado analítico, Número CAS: 9005-38-3 (Sigma-Aldrich), posteriormente se pesaron y se adicionó un gramo de extracto rico en compuestos fenólicos liofilizado obtenido por extracción asistida por ultrasonido de RF y GS (USRF-E y USGS-E), biofortificado. La mezcla se disolvió con 100 mL de agua desionizada, bajo agitación magnética constante. Una vez homogeneizada, la solución (alginato + extracto) se dejó reposar durante ~24 h para eliminar cualquier burbuja de aire. A continuación, la solución se añadió a una jeringa de 20 mL para ser goteada a 80 mL de solución de cloruro cálcico al 4% (p/v). La obtención adecuada de las microcápsulas se controló acoplando una punta de pipeta con una capacidad de 200 μ L en el extremo de la jeringa (para obtener el diámetro lo más uniforme y adecuado para las microcápsulas), la velocidad de goteo se definió en 20 mL h⁻¹, y la distancia establecida entre la punta y la superficie de la solución de CaCl₂ fue de 7 cm. Las cápsulas formadas en este proceso se mantuvieron en la solución de CaCl₂ durante ~15-20 min bajo agitación magnética a 110 rpm. Después se filtraron en una malla de acero inoxidable y se lavaron tres veces con agua desionizada. Finalmente, las microcápsulas se secaron al aire a 27 °C durante 24 h y se conservaron en un desecador a 20°C (Figura 2.11).



Figura 2.11. Proceso de encapsulación de extractos ricos en compuestos fenólicos de RF y GS.

2.9.1. Caracterización de las microcápsulas

Se determinó el peso promedio de las cápsulas por medio de una balanza analítica determinándolo en 30 microcápsulas de cada tipo (RF y GS). Adicionalmente, se realizó una caracterización morfológica usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) marca JEOL, modelo JSM-7401FS, operado a 2 kV de voltaje de aceleración para la adquisición de imágenes. Se adquirieron imágenes con un detector de electrones secundarios (LEI).

2.9.2. Eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia del ensayo de encapsulación (EE) de los extractos de RF y GS, se evaluaron los TPC. Se empleó un método basado en la disolución completa de las microcápsulas obtenidas luego de su secado, en una solución de citrato de sodio al 5% (p/v) en un baño de maría con agitador (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) durante 2 h a 37°C y 100 rpm. Midiendo los TPC y expresando el porcentaje de eficiencia de acuerdo con la ecuación 2.12.

$$EE(\%) = \frac{\text{Concentración de TPC en capsulas (g AGE Kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración TPC solución inicial (g AGE Kg}^{-1}\text{)}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.12.}$$

2.10. Determinaciones analíticas

2.10.1. Contenido de flavonoides totales (TF)

El contenido de flavonoides totales se determinó por triplicado según Villamil-Galindo et al. (2020), usando una solución de cloruro de aluminio al 2% para formar un complejo coloreado (amarillo) con máxima absorción a 415 nm y usando una curva

estándar de quercetina se determinó la concentración en los extractos. Los resultados fueron expresados como quercetina equivalente (g QE Kg⁻¹).

2.10.2. Grado de esterificación y contenido de metoxilo de la pectina.

El grado de esterificación (DE) y el contenido de metoxilo (MC) de la pectina se determinaron mediante un método volumétrico, según Gazala et al. (2017) y Doesburg (1966). La pectina (200 mg) se diluyó en agua (20 mL) y se agitó (2 h, 40°C) hasta su completa disolución. La solución de pectina se tituló con NaOH 0.1 M hasta un pH de 8.1 (V1: volumen gastado). A continuación, se añadieron 10 mL de NaOH 0.1 M, y la solución homogeneizada se dejó reposar durante 120 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 10 mL de HCl 0.1 M, se homogeneizó y se valoró con NaOH 0.1 M hasta pH 8.1 (V2). La DE y la MC se calcularon utilizando las ecuaciones 2.13 y 2.14, respectivamente.

$$DE (\%) = \frac{V2}{(V1 + V2)} \times 100 \quad Ec \ 2.13.$$

$$MC (\%) = \frac{V2 \times normalidad \times 3.1}{peso \ de \ la \ muestra \ (g)} \quad Ec \ 2.14.$$

2.10.3. Peso equivalente de la pectina

El peso equivalente de la pectina (EW), calculado según Doesburg (1966), fue el número de gramos de ácido poligalacturónico puro que corresponde a un equivalente de grupos carboxilo libres. El EW se calculó con la ecuación 2.15, donde DE (%) era el grado de esterificación de la pectina de acuerdo con la ecuación 2.13.

$$EW = \frac{17600 + 14 * DE}{100 - DE} \quad (Ec \ 2.15)$$

2.10.4. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos

Las determinaciones del contenido de fenoles totales (TPC) se hicieron por triplicado en cada uno de los extractos obtenidos, de acuerdo con la técnica de Singleton et al (1965). La determinación se llevó a cabo a través del método de Folin-Ciocalteu, adaptado. El reactivo está compuesto por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico en medio básico, los que sufren una reducción al oxidar los compuestos fenólicos, originando un complejo tungsteno-molibdeno de color azul cuya absorbancia es dependiente de la concentración de los polifenoles de la muestra. Se llevó a cabo la reacción de 100 µL de extracto diluido con 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 500 µL de solución de Na₂CO₃ (10%) y 1650 µL de agua destilada durante un período de 30 minutos en un ambiente oscuro. Acto seguido, se midió la absorbancia a 760 nm. Para el control de la reacción se procedió de la misma manera, pero sustituyendo los 100 µL de extracto por 100 µL de la solución extractante correspondiente. La absorbancia de la

reacción se midió en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) a 760 nm. Se utilizó ácido gálico (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.) como reactivo estándar (20–100 ppm).

La concentración de compuestos fenólicos totales de cada extracto obtenido se expresó en gramos equivalentes de ácido gálico por kilogramo de residuo (g AGE Kg⁻¹ de subproducto).

2.10.5. Perfil de compuestos fenólicos

El perfil de compuestos fenólicos de los distintos extractos obtenidos se determinó empleando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia LC-20AT con un detector de arreglo de diodos (DAD) y software de control y procesamiento de datos Lab Solutions (Shimadzu Co., Kyoto, Japón). La separación se realizó en una columna de fase reversa híbrida Gemini 5μ C18 110Å de 250 x 4.6 mm, unida a un guarda columna (Phenomenex Inc, CA, USA). Las determinaciones se realizaron de acuerdo con Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann (2010). La separación se realizó utilizando un sistema de solvente de gradiente lineal que consiste en 1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B) de la siguiente manera: 90– 75% de (A) durante 30 min; seguido de 75–40% de (A) de 30 a 45 min a un caudal de 1 mL min⁻¹ a 25° C. La identificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción UV-Vis de compuestos fenólicos estándares reportado en frutilla, manzana y/o sus residuos (Van De Velde et al., 2013; Villamil-Galindo et al., 2021) (Van De Velde et al., 2013; Villamil-Galindo et al., 2021b); así como también a través de información previa obtenida por espectrometría de masas (Van de Velde et al., 2016; Van de Velde et al., 2019).

La cuantificación de los compuestos identificados se realizó mediante el uso de patrones externos (Sigma-Aldrich Inc.; St. Louis, Misuri, EE. UU.), utilizando curvas de calibrado de: ácido elágico (AE) (0.03-0.50 mg mL⁻¹, R² 0.9916), kaempferol-3-O-glucósido (K3G) (0.06-0.50 mg mL⁻¹, R² 0.9972), quercetina-3-O-glucósido (Q3G) (0.06-1.00 mg mL⁻¹, R² 0.9979), ácido clorogénico (ACI) (0.125-1 mg mL⁻¹, R² 0.9952), procianidina B2 (PACB2) (0.02-0.2 mg mL⁻¹, R² 0.994), (-) epicatequina (EPQN) (0.03-0.25 mg mL⁻¹, R² 0.9746), (+) catequina (CQN) (0.03-1 mg mL⁻¹, R² 0.9996) y floretina (FLN) (0.06-1 mg mL⁻¹, R² 0.981). Los resultados se expresaron como g del compuesto fenólico por kilogramo de subproducto.

2.10.6. Capacidad Antioxidante (CA)

La capacidad antioxidante total de los extractos de cáscara de manzana, mediante el ensayo del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP), se realizó según Rodríguez-Arzuaga y Piagentini (2018). El reactivo FRAP se preparó con un tampón acetato 300 mM

(pH 3.6), una solución de 10 mM de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina en HCl 40 mM y una solución de cloruro férrico (III) de 20 mM de solución de cloruro férrico (III), en una proporción 10:1:1. Se incubaron cincuenta microlitros de muestra con 900 µl de reactivo FRAP y 130 mL de agua durante 30 min a 37°C, y luego se midió la absorbancia a 583 nm. Los resultados FRAP se expresaron como mmol Fe²⁺ Kg⁻¹.

La capacidad antioxidante, utilizando el radical DPPH*, se determinó de acuerdo con Teow et al. (2007) modificado. Los extractos ricos en fenoles de RF y GS (20 µL del extracto diluido) se hicieron reaccionar con 200 µL de solución metanólica (0,08 mM) de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH*) (Sigma-Aldrich), por un periodo de 2 h en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia de la reacción a 515 nm en un lector de microplacas (Asus UVM 340, Cambridge, Inglaterra) usando metanol absoluto como blanco de reacción. Como reactivo de referencia se utilizó el ácido 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich), para realizar la curva de calibrado. La actividad antioxidante se realizó por triplicado y se expresó en µmol de Trolox equivalente por gramo de residuo (µmolTE/ g subproducto).

2.10.7. Determinación de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)

La actividad PAL se midió de acuerdo con la metodología propuesta por Arrieta-Guevara et al. (2010) con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g de residuo (RF o GS), se agregó 10 mL de solución extractante (Buffer fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 8, EDTA 2 mmol L⁻¹, PVPP 30 g L⁻¹, DTT 7 mmol L⁻¹, Triton X-100 0.1% v/v), la mezcla se homogeneizó con un vortex, y se agitó durante 45 min a 4°C en un agitador orbital. A continuación, la mezcla se centrifugó a 12.000×g durante 20 min a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se separó y se utilizó para la evaluación de la actividad de la PAL. Para la reacción se emplearon 1060 µL de Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH = 8.8; 530 µL de fenilalanina 50 mmol L⁻¹ y 150 µL de extracto enzimático. A continuación, la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se detuvo la reacción con 260 µL de ácido tricloro acético (TCA) 10 g/L y se centrifugó a 12.000×g durante 10 minutos. La producción de ácido cinámico se midió a través de un espectrofotómetro a 290 nm en celda de cuarzo contra blanco de agua y los resultados se expresaron como la variación de absorbancia en una hora por miligramo de proteína del extracto (ΔA h⁻¹ mg⁻¹).

2.10.8. Determinación de la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO)

La velocidad de consumo u oxidación de compuestos fenólicos generada por la aplicación de las distintas estrategias de estrés sobre los tejidos residuales RF y GS se midió a través de la variación en la actividad de la enzima PPO. Para determinar la actividad de esta enzima se usó la técnica propuesta por Massolo et al. (2011). Empleando cinco

gramos de subproducto (RF o GS) a los que se añadieron 0 mL de solución de extracción (Buffer fosfato 100 mmol L⁻¹ pH = 6.0 PVPP 30 g L⁻¹, Triton X-100 0.1% v/v, NaCl 1 mol L⁻¹), la mezcla se homogeneizó durante 30 s y se agitó durante 1 h a 4°C. Tras esto, la mezcla se centrifugó a 12.000×g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se separó y se utilizó para la evaluación de la actividad PPO. La mezcla de reacción fue de 900 µL de agua destilada; 200 µL de pirocatecol 200 mmol L⁻¹; 150 µL de Buffer fosfato 1 mol L⁻¹ pH = 6.0 y 250 µL de extracto. La mezcla se incubó durante 1 h a 37°C. Se midió la variación de absorbancia a 410 nm debida a la oxidación del pirocatecol y los resultados se expresaron como la variación de absorbancia en una hora por miligramo de proteína del extracto ($\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

2.10.9. Determinación de proteínas en los extractos enzimáticos.

El contenido de proteínas se determinó en los diferentes extractos por el método de Lowry et al. (1951). Se añadieron 200 µL de extracto enzimático (en dilución adecuada) a 2 mL de reactivo de Lowry (100 partes de Na₂CO₃ al 3.0% en NaOH al 0.4%, 1 parte de tartrato sódico al 4%, y 1 parte de CuSO₄·5 H₂O al 2%), y se pasó a incubación a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadieron 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1/2), se agitó vigorosamente la mezcla, y después se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se midió la absorbancia de la reacción a 660 nm frente a un blanco de reacción. Los resultados fueron comparados frente a una curva de calibración partiendo de una solución 1 mg L⁻¹ de albúmina. Los resultados se expresaron en miligramos de proteína por gramo de muestra.

2.11. Análisis estadístico

2.11.1. Análisis estadístico del modelado de la cinética de extracción

Los datos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA), y las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, con un nivel de significación del 5%. Asimismo, se realizó un análisis de correlación entre las variables estudiadas mediante los coeficientes de correlación de Pearson. Los análisis estadísticos se realizaron con STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., Warrenton. VA, USA).

Los datos experimentales de los ensayos de extracción fueron ajustados a los modelos y las constantes cinéticas se determinaron mediante ajuste cuadrático no lineal usando el software ORIGIN PRO-8 (Microcal Software, Northhampton, MA, USA). La bondad de ajuste de los modelos propuestos fue establecida por el coeficiente de correlación (R^2 -adj) y la raíz del error cuadrado medio (RSME) (ecuación 2.16). Los valores más altos de R^2 -adj y los más bajos de RSME, determinaron cual fue el modelo que mejor ajustó a

los datos experimentales obtenidos. Las diferentes medias obtenidas para las diferentes respuestas estudiadas se sometieron a un análisis de varianza ANOVA, además de usar la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% para determinar diferencias significativas entre las medias. Este análisis fue llevado a cabo con STATGRAPHICS centurión XV software (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

$$RSME = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Experimental_i - Predicho_i)^2} \quad Ec\ 2.16.$$

2.11.2. Análisis estadístico del proceso de biofortificación, validación y ensayos de bioactividad.

El efecto de los factores de estrés, la temperatura y el tiempo de almacenamiento en los ensayos de biofortificación con compuestos fenólicos de las matrices GS y RF sobre las actividades PAL y PPO, TPC y contenido de compuestos fenólicos individuales se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre cada proceso de biofortificación ($p < 0.05$). Las respuestas analizadas se ajustaron a modelos polinómicos de segundo orden, y se determinó el coeficiente de determinación (R^2) y la falta de ajuste para cada modelo. El procedimiento *stepwise backward* se utilizó para reducir los modelos eliminando los términos no significativos. Se realizó una optimización de respuesta múltiple utilizando la función de deseabilidad según Amdoun et al. (2018). Se empleó el programa *Design Expert* DX 7.01 (Stat Ease Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) para el diseño factorial general, el análisis de datos y el ajuste del modelo polinómico. Se realizaron ensayos experimentales en las condiciones óptimas determinadas para validar los modelos obtenidos, determinando la diferencia entre los valores experimentales y predichos mediante la prueba *t-Student*.

Para los ensayos de bioaccesibilidad y cultivo celular, se realizaron tratamientos por triplicado y se efectuaron las pruebas de Tukey y pruebas t ($p < 0.05$) para determinar las diferencias significativas entre las medias del tejido biofortificado óptimo y el tejido de control. Los análisis se realizaron con el software STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, EE. UU.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto del tipo de solvente, concentración de ácido y número de etapas de en la extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de manzana “Granny Smith”

3.1.1. Efecto sobre el contenido de fenoles totales de los extractos

El solvente (S), la concentración de ácido fórmico (C_{FA}) y el número de etapas de extracción (ES) afectaron significativamente al contenido de fenoles totales y a la capacidad antioxidante ($p \leq 0.001$) de los extractos de cáscara de manzana (Tablas 3.1 y 3.2). La interacción S. C_{FA} fue altamente significativa ($p \leq 0.001$) para todas las respuestas, y la interacción S. C_{FA} .ES afectó significativamente al TPC, TF y DPPH. El efecto de las variables de extracción sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante no puede analizarse por separado, ya que la mayoría de las interacciones fueron altamente significativas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. ANOVA para el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (TF), y la capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados			
		TPC	TF	DPPH	FRAP
S	3	10.60***	0.108***	0.0006***	0.00012***
C_{FA}	1	0.315***	0.004 ^{ns}	4.278E-7 ^{ns}	0.00003***
ES	1	7.012***	0.071***	0.0001***	0.00003***
S.C_{FA}	3	0.356***	0.027***	0.00004***	0.00001***
S.ES	3	0.458***	0.011 ^{ns}	0.00007***	0.000005***
C_{FA}.ES	1	0.030**	0.004 ^{ns}	0.00002***	4.512E-7 ^{ns}
S. C_{FA}.ES	3	0.413***	0.058***	0.00002***	1.23E-7 ^{ns}
Residuos	16	0.031	0.020	0.0000089	0.0000027
Total	31	19.219	0.302	0.0009	0.0002

S: solvente, C_{FA} : concentración de ácido fórmico, ES: etapas de extracción, GL: grados de libertad. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. ns: $p > 0.05$.

La C_{FA} del 0.5% en la solución de extracción mejoró el rendimiento de TPC en los extractos obtenidos con solventes próticos polares (100% agua - W, 80% metanol - MeOH, y 80% etanol - EtOH). En el caso del TF, el aumento de la concentración de ácido redujo el contenido de flavonoides en todos los sistemas de extracción. Por otro lado, los TPC y

la capacidad antioxidante (FRAP) fueron mayores en los extractos obtenidos con extracciones en dos etapas en comparación con la extracción de una etapa. Del mismo modo, los sistemas con solventes próticos polares mostraron mayores rendimientos de TPC y mayor capacidad antioxidante en la extracción en dos etapas (Tabla 3.2).

Para los extractos de una sola etapa ($C_{FA} = 0\%$), la acetona 80% (Ac) mostró el mayor TPC ($p < 0.05$) con $1.94 \text{ g AGE Kg}^{-1}$ (Tabla 3.2). A pesar de tener una baja capacidad para donar enlaces de hidrógeno, el momento dipolar de la acetona le permite la solvatación de los compuestos fenólicos ya que tiene una alta aceptación de enlaces de hidrógeno, explicando sus propiedades solvatocrómicas. En soluciones acetona-agua, el agua facilita la difusión y las interacciones soluto-solvente (Villamil-Galindo et al., 2020). El TPC aumentó ($p < 0.05$) alrededor del 15%, cuando $C_{FA} = 0.5\%$ en la extracción en una sola etapa con soluciones de MeOH y Ac (Tabla 3.2). La reducción del pH en las soluciones de extracción permite la hidrólisis de la matriz vegetal, estabilizando las cargas de ciertos compuestos fenólicos y su solvatación (Takeuchi et al., 2008).

Tabla 3.2. Compuestos fenólicos totales (TPC), contenido total de flavonoides (FT) y capacidad antioxidante mediante DPPH* y FRAP de diferentes extractos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

S	ES	TPC (g AGE Kg ⁻¹)		TF (g quercetin Kg ⁻¹)		DPPH (mmol Trolox Kg ⁻¹)		FRAP (mmol Fe ²⁺ Kg ⁻¹)	
		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)	
		0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
W	1	0.78 ± 0.01 eA	0.78 ± 0.01 fA	0.11 ± 0.05 cA	0.12 ± 0.006 dA	1.20 ± 0.40 eB	2.30 ± 0.10 eA	4.40 ± 0.09 dA	6.30 ± 0.04 dB
	2	1.25 ± 0.08 dA	1.60 ± 0.004 dB	0.23 ± 0.01 bA	0.22 ± 0.01 cA	4.90 ± 0.50 dA	4.91 ± 0.10 dA	5.60 ± 0.20 cA	6.10 ± 0.50 dA
EtOH	1	1.39 ± 0.01 dA	1.40 ± 0.02 eA	0.28 ± 0.01 bA	0.20 ± 0.001 cB	5.30 ± 0.10 dA	2.90 ± 0.60 eB	5.30 ± 1.00 cdA	5.60 ± 0.50 dA
	2	2.09 ± 0.01 bcB	2.27 ± 0.01 cA	0.33 ± 0.01 bA	0.38 ± 0.01 aA	7.20 ± 0.80 cA	6.80 ± 0.30 cA	7.60 ± 0.50 bA	8.10 ± 0.07 cA
MeOH	1	1.39 ± 0.07 dB	1.64 ± 0.06 dA	0.22 ± 0.001 bB	0.28 ± 0.002 bA	1.00 ± 1.10 eA	1.00 ± 0.01 fA	5.50 ± 0.08 cdB	8.50 ± 0.30 cA
	2	2.19 ± 0.10 bB	3.00 ± 0.02 bA	0.43 ± 0.001 aA	0.37 ± 0.002 aB	6.30 ± 0.20 dB	13.10 ± 1.00 bA	7.30 ± 0.02 bB	10.80 ± 0.10 bA
Ac	1	1.94 ± 0.07 cB	2.23 ± 0.01 cA	0.27 ± 0.002 bA	0.28 ± 0.01 bA	17.60 ± 0.40 aB	12.08 ± 0.90 bA	7.70 ± 0.40 bB	11.20 ± 0.50 bA
	2	3.47 ± 0.06 aA	3.14 ± 0.10 aB	0.45 ± 0.06 aB	0.21 ± 0.01 cA	16.10 ± 1.00 bA	14.79 ± 2.00 aB	11.0 ± 0.30 aB	13.40 ± 0.04 aA

S: Solvente, C_{FA}: concentración de ácido fórmico, ES: etapas de extracción. Media (n=3). W: agua 100%, EtOH: etanol 80%, MeOH: metanol 80% Ac: acetona 80%. Letras mayúsculas y minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey, entre la concentración de ácido fórmico y entre los sistemas de extracción, respectivamente.

Además, el uso de acetona 80%, en dos etapas de extracción, sin ácido fórmico, proporciona el mayor ($p<0.05$) TPC ($3.47 \text{ g AGE Kg}^{-1}$) entre los extractos (Tabla 3.2). Este rendimiento fue un 44% superior al obtenido con acetona 80% en con una sola etapa de extracción y un 9.5% superior al extracto con $C_{FA}= 0.5\%$ en extracción con dos etapas. Respecto al fenómeno de transferencia de masa que se produce en las diferentes extracciones realizadas en la cáscara de manzana, la relación solvente-soluto genera la fuerza motriz para que se produzca este fenómeno (Takeuchi et al., 2008). Estos contenidos de compuestos fenólicos fueron superiores a los reportados por Drogoudi & Pantelidis (2011) ($3.03 \text{ g AGE Kg}^{-1}$) y Guyot et al. (2002) ($3.15 \text{ g AGE Kg}^{-1}$) para la cáscara de 'Granny Smith'. Siendo incluso superiores a los reportados para la cáscara de otros cultivares como 'Golden Delicious' ($3.04 \text{ g AGE Kg}^{-1}$) y la cáscara de 'Red Delicious' obtenida con acetona 80% con una relación sólido-solvente de 1:10 ($2.48 \text{ g AGE Kg}^{-1}$) (Piagentini & Pirovani, 2017). Los compuestos fenólicos presentan una amplia diversidad estructural, lo que contribuye a sus diferentes propiedades, como la polaridad, demostrando que ningún solvente por sí solo puede garantizar una extracción completa de los compuestos fenólicos (Azwanida, 2015). En comparación con estudios previos realizados utilizando los mismos sistemas de extracción en los subproductos de frutilla, la extracción con metanol 80% con $C_{FA}= 0.5\%$ en dos etapas mostró el mayor rendimiento de TPC con 15 g Kg^{-1} (Villamil-Galindo et al., 2020). Estos resultados confirman la variación de compuestos fenólicos y sus concentraciones entre los diferentes subproductos de frutas. Además, las diversas estructuras moleculares de estos metabolitos les confieren diferentes polaridades, generando así un fenómeno de solvatación preferencial. En consecuencia, los compuestos fenólicos de los subproductos de frutilla se extrajeron mejor con MeOH, mientras que los rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana 'Granny Smith' fueron mejores con Ac (Tabla 3.2).

Por lo tanto, el uso de soluciones binarias de solventes orgánicos y agua amplía el rango de solvatación debido al cambio de polaridad, viscosidad y constante dieléctrica, entre otros, y, en consecuencia, permitiendo una mayor recuperación de compuestos fenólicos (Takeuchi et al., 2008). La disolución acetona-agua se utilizó con excelentes resultados, obteniéndose mayores rendimientos que con el disolvente puro o mezclas de otros solventes orgánicos (Stavrou et al., 2018). El momento dipolar de la acetona le confiere una excelente capacidad para aceptar enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos (Villamil-Galindo et al., 2020).

Los flavonoides han sido reportados como los principales compuestos fenólicos en muchos cultivares de manzana (Kalinowska et al., 2014). La extracción en un solo paso y $C_{FA}=0 \%$ produjo el mayor contenido de TF ($0.28\text{-}0.27 \text{ g QE Kg}^{-1}$) con EtOH y Ac, sin

diferencias entre ellos ($p>0.05$) (Tabla 3.2). El TF extraído con EtOH y Ac fue 2.5 veces superior al W en las mismas condiciones. Estos resultados muestran la posibilidad de utilizar solventes verdes, como el etanol, para la recuperación de flavonoides a partir de subproductos de residuos agroindustriales. En cuanto a W, EtOH y Ac, el uso de $C_{AF}=0.5\%$ no mejoró significativamente el rendimiento de extracción de TF, probablemente, porque la estructura heterocíclica que une los anillos A y B de los flavonoides podría haber sido alterada por el uso del ácido, dificultando su recuperación y cuantificación (Kalinowska et al., 2014).

Los extractos de dos etapas con $C_{FA}=0\%$ mostraron el mayor contenido de TF entre todas las condiciones estudiadas, siendo MeOH y Ac, las mejores soluciones de extracción ($0.43\text{-}0.45\text{ g QE Kg}^{-1}$) ($p>0.05$) para recuperar flavonoides a partir de la cáscara de manzana 'Granny Smith'. Savatović et al. (2008) informaron resultados similares para el extracto metanólico de orujo de manzana 'Granny Smith' (0.51 g Kg^{-1}).

3.1.2. Efecto sobre la capacidad antioxidante de los extractos

En cuanto a la capacidad antioxidante, en la Tabla 3.2 se puede observar que en los extractos obtenidos con una etapa de extracción y $C_{FA}=0\%$, el Ac presentó la mayor actividad antirradical (DPPH*) ($17.60\text{ mmol Trolox Kg}^{-1}$), siendo hasta 17 veces superior al W y al MeOH, ambos similares ($p>0.05$) y con el menor DPPH. En las extracciones en dos etapas, la adición de ácido fórmico 0.5% no mejoró significativamente la capacidad antioxidante (DPPH* y FRAP) de los extractos obtenidos con solventes verdes como agua y etanol 80% (Tabla 3.2). Determinando que no necesariamente el sistema de extracción con mayor concentración de compuestos fenólicos va a tener la mayor actividad antirradicalaria, tal como discutieron Shahidi & Ambigaipalan (2015) donde a altas concentraciones de compuestos fenólicos se pierde actividad antioxidante incluso puede generar un efecto pro oxidante, esto depende del mecanismo antioxidante del compuesto bioactivo, su resonancia estructural y entropía. Es imperante aclarar que el método DPPH se caracteriza por su rapidez, sencillez y rentabilidad. Este método es muy adecuado para analizar numerosas muestras y proporciona información valiosa sobre el potencial reductor de los extractos, sin embargo, este método es limitado, ya que puede presentar interferencias con otros radicales libres el medio, con los solventes, azúcares y algunas proteínas (Kedare & Singh, 2011). La acetona 80% que mostró altos valores de neutralización del radical DPPH si bien es el solvente con mayor recuperación de compuestos fenólicos, también extrae azúcares y otros compuestos que pueden estar generando un sobre estimación. No obstante, por eso en las etapas subsiguiente de esta tesis se estudió el potencial antioxidante en modelos *ex vivo*. Por otro lado, los valores obtenidos fueron similares a los reportado por Lončarić et al. (2020) para la manzana

'Granny Smith' ($18 \text{ mmol Trolox Kg}^{-1}$) y superior al de la cáscara de 'Golden Delicious' ($15 \text{ mmol Trolox Kg}^{-1}$). En cuanto a la capacidad antioxidante FRAP, el extracto obtenido con Ac en un paso sin ácido fórmico tuvo $7.70 \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ Kg}^{-1}$. El uso de la extracción en dos etapas de extracción mejoró significativamente la FRAP en un 30% ($11 \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ Kg}^{-1}$). El uso de un $C_{FA}=0.5\%$ incrementó el FRAP significativamente ($p<0.05$), teniendo el extracto en dos etapas obtenido con acetona 80% el valor FRAP más alto ($13.4 \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ Kg}^{-1}$), 2.4 veces mayor que el extracto EtOH en un paso. Los valores FRAP de los extractos de Ac muestran la importancia de los extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith' como excelente fuente de compuestos antioxidantes. Estos valores fueron superiores a los reportados para otros subproductos agroindustriales como la cáscara de pistacho ($6.6 \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ Kg}^{-1}$) obtenidos con acetona al 100% (Rezaie et al., 2015).

3.1.3. Efecto sobre el perfil de compuestos fenólicos de los extractos

Se identificaron y cuantificaron diez compuestos fenólicos (Tablas 3.3 y 3.4). Los flavan-3-oles, flavonoles, ácidos fenólicos y dihidrochalconas fueron las principales familias de compuestos fenólicos determinadas en la cáscara de la manzana 'Granny Smith'. Los flavan-3-oles (procianidinas) fueron los principales compuestos fenólicos (59.6%), seguidos de los flavonoles (38.3%), los ácidos fenólicos (0.85%) y las dihidrochalconas (0.67% de los compuestos fenólicos identificados). Massini et al. (2016) informaron resultados similares para la cáscara de manzana 'Bramley', con las procianidinas (64%) como la principal familia de compuestos fenólicos, seguidas de los flavonoles (26%), utilizando etanol 80% como disolvente de extracción.

Entre los flavan-3-oles, la (+) Catequina [(+) CTQN] se identificó en concentraciones de $0.005\text{-}0.082 \text{ g Kg}^{-1}$, siendo el MeOH en dos etapas el sistema de extracción con mayores rendimientos, y la concentración de ácido fórmico no afectó ($p>0.05$) al rendimiento de extracción (Tabla 3.3). Además, la (-) Epicatequina [(-) EPQN] se extrajo en $0.006\text{-}0.199 \text{ g Kg}^{-1}$. El MeOH con $C_{FA}=0.5\%$ en dos etapas, y Ac con $C_{FA}=0\%$ en dos etapas (Tabla 3.4) mostraron los mayores rendimientos de (-) EPQN (0.196 y 0.199 g Kg^{-1} , respectivamente).

Tabla 3.3. ANOVA para el perfil de compuestos fenólicos en cáscara de manzana determinado por HPLC-DAD.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados										
		(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	ACL	Q3G	QP	QHS	K3G	FLN	TPC _{HPLC}
S	3	0.0125***	1.1902***	0.1076***	0.2056***	0.00018***	0.2874***	0.0192***	0.0365***	0.0790***	0.0002***	9.8247***
C_FA	1	00000 ^{ns}	0.0097 ^{ns}	0.0004 ^{ns}	0.0016 ^{ns}	1.582E-7 ^{ns}	0.0013 ^{ns}	0.00034 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.0009 ^{ns}	0.00001*	0.0014 ^{ns}
ES	1	0.00164**	0.0601**	0.0178***	0.0429***	0.00002**	0.0355***	0.0046***	0.0023***	0.0004 ^{ns}	0.0002***	1.5212***
S.C_FA	3	0.00013 ^{ns}	0.0110 ^{ns}	0.0002 ^{ns}	0.0026 ^{ns}	0.3017 ^{ns}	0.0014 ^{ns}	0.00027 ^{ns}	0.0006 ^{ns}	0.0010 ^{ns}	0.0002 ^{ns}	0.0440 ^{ns}
S.ES	3	0.0019***	0.1574 ^{ns}	0.0077***	0.0414***	0.00003**	0.0261***	0.0044***	0.0016**	0.0018 ^{ns}	0.00009***	0.9462***
C_FA.ES	1	0.00009*	0.0331 ^{ns}	0.0004 ^{ns}	0.00216 ^{ns}	0.00002 ^{ns}	0.0003*	0.00001 ^{ns}	0.0005*	0.0028**	0.00005***	0.2125**
S. C_FA.ES	3	0.0003*	0.3310 ^{ns}	0.00102 ^{ns}	0.00251 ^{ns}	0.00009 ^{ns}	0.0036 ^{ns}	0.0010*	0.0009 ^{ns}	0.0015 ^{ns}	0.00004**	0.0373 ^{ns}
Residuos	16	0.0003	0.3310	0.0033	0.0176	0.00002	0.0073	0.0012	0.0016	0.0032	0.00004	0.4638
Total	31	0.0169	2.0871	0.1384	0.3167	0.0003	0.3657	0.0311	0.044	0.0907	0.0007	13.0509

S: solvente, C_FA: concentración de ácido fórmico, ES: etapas de extracción, DG: grados de libertad. (+)CTQN: Catequina, PACB2: Procianidina B2, (-)EPQN: Epicatequina, PACT: procianidina tetrámero, ACL: ácido clorogénico, Q3G: Quercetina-3-glucuronido, QP: Quercetina pentóxido, QHS: Quercetina hexóxido, K3G: Kaempferol-3-glucuronido, FLN: Floretina TPC_{HPLC}: Compuestos fenólicos totales determinados por HPLC *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. ns: $p > 0.05$.

Las concentraciones de (+) catequina y (-) epicatequinas obtenidas aquí fueron superiores a las notificadas para la pulpa de manzana 'Idared' (0.05 g Kg⁻¹ (+) CTQN, y 0.137 g Kg⁻¹ (-) EPQN) (Mieszczakowska-Frąc et al., 2016). La (+) CTQN se correlacionó significativamente con la capacidad antioxidante FRAP tanto en la extracción en una y dos etapas con C_{FA}=0.5% (R² 0.72 y 0.89, respectivamente), y también en la extracción en dos etapas C_{FA}= 0% (R² 0.73). Por otro lado, el (-) EPQN mostró una correlación significativa (p<0.05) con la capacidad antioxidante FRAP en todos los sistemas de extracción. Para la extracción en dos etapas C_{FA}=0.5% se correlacionó con ambas capacidades antioxidantes (R² 0.86 para DPPH* y 0.88 para FRAP p<0.01). Estos resultados sugieren la importante contribución de los taninos condensados presentes en la cáscara de la manzana 'Granny Smith', como la (+) Catequina y la (-) Epicatequina en la capacidad antioxidante, debido a su capacidad de eliminación de radicales, propiedades redox, y la capacidad de quelar metales de transición. Asimismo, He & Liu (2008) informaron de la elevada actividad antioxidante de la catequina obtenida de la cáscara de manzana 'Red Delicious' extraída con acetona al 80%. También se identificaron dos procianidinas, el tetrámero de procianidina (PACT) y la procianidina B2 (PACB2). Esta última es el principal compuesto fenólico extraído de la piel de la manzana 'Granny Smith', representando el 23-38% del total de compuestos fenólicos (Tabla 3.4). Los extractos obtenidos con Ac y C_{FA}= 0%, en dos etapas, mostraron la mayor concentración de PACB2 (0.77 g Kg⁻¹) seguidos por el extracto de MeOH (C_{FA} =0%, en dos etapas) con 0.73 g Kg⁻¹. Las procianidinas B son dímeros de epicatequinas, caracterizadas por su polaridad media-baja. Presentan un único enlace interflavano entre el carbono 4 del anillo B y el carbono 8 o el carbono 6 del anillo C (Massini et al., 2016). Este hecho facilitó la solubilización con disolventes de polaridad media como el metanol y la acetona.

Además, la cavitación generada por los ultrasonidos permitió la ruptura de los cloroplastos de la célula vegetal donde se almacenaban las proantocianidinas, facilitando el proceso de extracción (Dzah et al., 2020). En este estudio, el contenido de PACB2 de los extractos de EtOH, MeOH y Ac obtenidos en dos etapas fue superior al reportado por Almeida et al. (2017) para el extracto metanólico de cáscara de manzana 'Granny Smith' (0.28 g/Kg) y 'Golden Delicious' (0.38 g Kg⁻¹), sin extracción asistida por ultrasonidos. Además, el PACT mostró una correlación significativa con la capacidad antioxidante FRAP en todos los sistemas de extracción. Además, en la extracción con C_{FA} de dos etapas= 0.5%, el PACB2 y el PACT se correlacionaron significativamente con las capacidades antioxidantes DPPH y FRAP (R²>0.8). Los flavonoles, la segunda familia principal de compuestos fenólicos identificados en la piel de la manzana 'Granny Smith', fueron Quercetina-3-o-glucurónido (Q3G), Quercetina-pentósido (QP), Quercetina-hexósido

(QHS) y Kaempferol-3-glucurónido (K3G). El EtOH, uno de los disolventes próticos polares utilizados, mostró la mejor recuperación de flavonoles, representando hasta el 40% de los fenoles totales, con el sistema de extracción EtOH de una etapa, $C_{FA} = 0.5\%$. Además, un $C_{FA} = 0.5\%$ mejoró los rendimientos hasta un 18% en el caso de QP (0.048 g Kg^{-1}) (Tabla 3.4). Las manzanas fueron una de las fuentes más significativas de flavonoides en la dieta humana (Almeida et al., 2017).

Los extractos realizados en dos etapas con $C_{FA} = 0.5\%$ mostraron una correlación altamente significativa con las actividades DPPH y FRAP ($R^2 > 0.9$). Las estructuras de los compuestos fenólicos y la disposición de los grupos hidroxilo en este tipo de extracción les confirieron un gran potencial como fuente antioxidante natural a bajo coste (He & Liu, 2008). Estos resultados proporcionaron información valiosa sobre la extracción de flavonoides con disolventes respetuosos con el medio ambiente como el agua o el etanol al 80%, permitiendo la valorización de estos subproductos a un coste mínimo a partir de la cáscara de la manzana 'Granny Smith'.

En el caso de las dihidrochalconas, se identificó y cuantificó la floretina (FLN) en extractos de cáscara de manzana. La FLN derivaba de varios productos metabólicos, como la florizina, la trilobactina, el 20-O-xiloglucósido de floretina, la sieboldina, la 3-hidroxiflorizina y la 3-hidroxifloretina. Fue un compuesto de interés, especialmente en la cáscara de manzana, donde su síntesis fue mayor, estando presente en concentraciones de $0.02\text{-}0.42 \text{ g kg}^{-1}$ (Mariadoss et al., 2019). Concentraciones similares se obtuvieron en extractos de EtOH (dos etapas, $C_{FA} = 0\%$) (0.019 g kg^{-1}), siendo superiores a las reportadas por Kschonsek et al. (2018) para pulpa de manzana 'Granny Smith' (0.007 g kg^{-1}). Por otro lado, el ácido clorogénico (ACI), un ácido fenólico, se identificó en la cáscara de manzana 'Granny Smith' ($0.006\text{-}0.33 \text{ g kg}^{-1}$) (Tabla 3.4) en concentraciones inferiores a las reportadas para la pulpa (1.34 g kg^{-1}) (Almeida et al., 2017). El contenido fenólico total determinado por HPLC (TPC_{HPLC}) para la extracción en dos etapas con Ac y MeOH mostró la concentración más alta (1.99 y 1.90 g kg^{-1} respectivamente) para $C_{FA} = 0\%$ (Tabla 3.4), de acuerdo con el TPC (Tabla 3.3). Determinando así, que el sistema de extracción en dos etapas ($1:5 \text{ g mL}^{-1}$ cada una) con acetona 80% como solvente de extracción sin agregado de ácido fórmico, mostró los mejores rendimientos en la mayoría de las respuestas analizadas, por lo tanto, este sistema se empleó en las siguientes determinaciones en la extracción secuencial de pectina y compuestos fenólicos a partir de la cáscara de manzana 'Granny Smith'.

Tabla 3.4. Contenido de los principales compuestos fenólicos de diferentes extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith' (parte 1)

S	ES	(+) CTQN (g Kg ⁻¹)		PACB2 (g Kg ⁻¹)		(-)EPQN (g Kg ⁻¹)		PACT (g Kg ⁻¹)		ACI (g Kg ⁻¹)	
		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)	
		0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
W	1	0.010± 0.005 cA	0.018 ±0.007 deA	0.034±0.031 abA	0.057 ±0.04 cA	0.005 ±0.008 eA	0.014 ±0.006 eA	0.010± 0.009 dA	0.079±0.07 cdA	0.002 ± 0.01 bcA	0.004±0.000 1 bcA
	2	0.005 ± 0.0001 dA	0.007 ±0.0006 eB	0.0102 ±0.001 bA	0.0286 ±0.009 cA	0.006±0.000 1 eA	0.016±0.004 deA	0.002±0.000 1 dA	0.0044±0.00 01 dB	0.0007±0.00 008 cA	0.0015±0.00 02 cA
EtOH	1	0.022 ± 0.001 cA	0.022±0.002 cdeA	0.192 ±0.002 abA	0.197±0.015 bcA	0.076±0.005 dA	0.090±0.002 cdA	0.07 ±0.014cdA	0.07±0.03 cdA	0.006 ±0.002 abcA	0.006 ±0.0001 abA
	2	0.038±0.002 bA	0.033 ±0.001 bcdA	0.424 ±0.18 abA	0.304 ±0.023 abcA	0.136 ±0.008 bA	0.127 ±0.007 abcA	0.172 ± 0.025 bA	0.15±0.03 abcdA	0.01 ± 0.002 aA	0.007 ±0.002 abA
MeOH	1	0.042 ± 0.004 bA	0.043 ±0.001 bcA	0.298 ±0.042 abA	0.374 ±0.08 abA	0.1 ±0.01 cdA	0.122 ±0.06 bcA	0.12±0.05 bcA	0.14 ±0.04 bcdA	0.007 ±0.001 abA	0.006 ±0.0001 abA
	2	0.074 ± 0.0002 aA	0.082 ±0.01 aA	0.734 ±0.382 abA	0.596 ±0.08 aA	0.177 ±0.008 aA	0.196 ±0.04 aA	0.270±0.009 aA	0.307 ±0.05 aA	0.008 ± 0.0003 aA	0.009 ±0.0009 aA
Ac	1	0.039 ±0.003 bA	0.048±0.001 bA	0.299 ±0.06 abA	0.397± 0.136 abA	0.119 ±0.003 bcA	0.148 ±0.020 abcA	0.16 ±0.01 bcA	0.19 ±0.002 abcA	0.005 ±0.001abA	0.007±0.001 abA
	2	0.066 ±0.0005 aA	0.053 ±0.006 bA	0.772 ±0.319 aA	0.528 ± 0.01 aA	0.199 ±0.01 aA	0.1987 ±0.036 abA	0.280 ±0.006 aA	0.251 ±0.044 abA	0.01 ± 0.001 aA	0.008 ±0.001 aA

S: Solvente, C_{FA}: concentración de ácido fórmico, ES: Etapas de extracción, (+) CTQN: catequina, PACB2: procianidina B2, (-) EPQN: epicatequina, PACT: procianidina tetrámero, ACI: ácido clorogénico. Letras mayúsculas y minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) por la prueba de Tukey, entre la concentración de ácido fórmico y entre los sistemas de extracción, respectivamente.

Tabla 3.4. Contenido de los principales compuestos fenólicos de diferentes extractos de cáscara de manzana ‘*Granny Smith*’ (parte 2)

S	ES	Q3G(g Kg ⁻¹)		QP(g Kg ⁻¹)		QHS(g Kg ⁻¹)		K3G(g Kg ⁻¹)		FLN(g Kg ⁻¹)		TPC _{HPLC} (g Kg ⁻¹)	
		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)		C _{FA} (%)	
		0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
W	1	0.01±0.002 cA	0.048 ±0.002 dB	0.005±0.002 cA	0.012 ±0.001 cB	0.002 ±0.00001 cA	0.003 ±0.00001 eA	0.009± 0.003 cA	0.021±0.005 cB	0.0001 ± 0.00001 cA	0.0001±0.00 00002 bA	0.092±0.06 cA	0.268±0.04 deA
	2	0.0012 ± 0.0007 cA	0.018 ±0.008 dA	0.006 ±0.00008 bcA	0.0115 ±0.001 cA	0.0006±0.00 001 cA	0.006±0.001 efB	0.007±0.002 cA	0.011±0.002 cA	0.002±0.000 01 cB	0.0019±0.00 003 abA	0.05±0.001 cA	0.106 ±0.04 eA
EtOH	1	0.143 ± 0.02 bA	0.154±0.006 cA	0.034 ±0.002 bcA	0.034±0.003 bcA	0.046±0.003 bcA	0.054±0.001 cdA	0.088 ±0.015 bA	0.109±0.014 abA	0.001 ±0.0001 cA	0.002 ±0.001 abA	0.680 ±0.007 bcA	0.753 ±0.06 cdA
	2	0.193 ± 0.02 bA	0.184 ±0.028 cA	0.039 ±0.003 bcA	0.048 ±0.01 bA	0.076 ±0.01 abA	0.034 ±0.009 deA	0.115 ± 0.02 abA	0.064±0.03 bcA	0.019 ± 0.002 aA	0.009 ±0.003 aA	1.221±0.26 abA	0.965±0.13 bcA
MeOH	1	0.159 ± 0.026 bA	0.212 ±0.02 bcA	0.041 ±0.009 bcA	0.061 ±0.008 bA	0.07 ±0.03 abA	0.066 ±0.007 bcA	0.125 ±0.005 abA	0.145 ±0.03aA	0.002 ±0.001 cA	0.002 ±0.001 abA	0.960±0.04 bA	1.16 ±0.09 bcA
	2	0.332 ± 0.04 aA	0.276 ±0.03 abA	0.085 ±0.008 aA	0.07 ±0.008 bA	0.102 ±0.008 aA	0.09 ±0.008 abA	0.114± 0.0 08 abA	0.124 ±0.014 abA	0.008 ± 0.0004 bA	0.008 ±0.001 aA	1.903 ± 0.43 aA	1.756 ±0.145 aA
Ac	1	0.188 ±0.013 bA	0.215 ±0.033 bcA	0.037 ±0.004 bcA	0.043±0.003 bcA	0.067 ±0.007 abA	0.077 ±0.01 abcA	0.117 ±0.003 abA	0.133 ±0.026 aA	0.001 ±0.0001 cA	0.002±0.000 1 abA	1.035 ±0.10 bA	1.288 ±0.22 abA
	2	0.310±0.02 aA	0.340 ±0.024 aA	0.09 ±0.02 aA	0.116 ±0.006 aA	0.101 ±0.105 aA	0.105 ±0.01 aA	0.150 ±0.022 aA	0.154 ±0.018 aA	0.007 ± 0.0007 bB	0.0023 ±0.0002 abA	1.988 ± 0.242 aA	1.737 ±0.181 aA

S: Solvente, C_{FA}: concentración de ácido fórmico, ES: Etapas de extracción, Q3G: quercetina-3-glucurónido, QP: quercetina pentóxido, QHS: quercetina hexóxido, K3G: kaempferol-3-glucurónido, FLN: fletetina, TPC_{HPLC}: Compuestos fenólicos totales por HPLC. promedio (n=3). Letras mayúsculas y minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) por la prueba de Tukey, entre la concentración de ácido fórmico y entre los sistemas de extracción, respectivamente

El procesado industrial de la manzana ha venido generando la mayor parte de los residuos de fruta, y el uso de la cáscara de la manzana 'Granny Smith' como fuente de compuestos fenólicos se convirtió en una cuestión importante (Scarano et al., 2022). La ingesta media diaria de quercetina y floretina en los países desarrollados era de aproximadamente 34 mg 100 g⁻¹ de porción de alimento fresco y 0.7 mg 100 g⁻¹ de dieta, respectivamente, cantidades inferiores a la ingesta de otros compuestos como la hesperidina (100 mg por dieta) (Koch et al., 2015). Además, estas cantidades eran inferiores para la mayoría de la población de los países en desarrollo. Por este motivo, resulta interesante disponer de una fuente de bajo coste de diferentes compuestos fenólicos que aportará al consumidor una fuente de compuestos bioactivos para mejorar las características antioxidantes y saludables de los alimentos.

3.2. Impacto del proceso de extracción sobre la pectina y los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana 'Granny Smith'

El principal uso industrial de las cáscaras de manzana es la producción de pectina. Como parte del proceso convencional de obtención de pectina, la cáscara debe secarse para evitar alteraciones enzimáticas (Constenla et al., 2002). Pero este proceso afecta tanto a la calidad de la pectina y como al contenido de polifenoles. La Figura 3.1 muestra la retención de TPC_{HPLC} de la cáscara de la manzana 'Granny Smith' durante los procesos de extracción de pectina convencional (TR) y asistida por ultrasonido (US) (BE: antes de la extracción de compuestos fenólicos, y AE: después de la extracción de compuestos fenólicos). La cáscara de manzana fresca (P), con 80.1% de humedad y TPC_{HPLC} de 9.9 g kg⁻¹, se secó a 50°C durante 24h para obtener DP. El proceso de secado redujo el TPC_{HPLC} en un 66% (3.4 g kg⁻¹) (Figura 3.1). La extracción de compuestos fenólicos del tejido residual de la pectina BE mediante extracción US (R_{BE-US}) permitió la recuperación del 7.12% de TPC_{HPLC} inicialmente presente en la cáscara fresca de manzana, y del 6.15% de TPC_{HPLC} del tejido residual de la obtención de pectina BE mediante extracción TR (R_{BE-TR}), perdiendo un gran número de compuestos fenólicos valiosos. Por el contrario, en el proceso de extracción secuencial AE, la mayor cantidad de compuestos fenólicos se obtuvo de P (9.9 g kg⁻¹), y el TPC_{HPLC} remanente en R_{AE-US} fue de 0.04 g/Kg bs (0.36%); y en la R_{AE-TR} fue de 0.15 g kg⁻¹ (1.49%). Estos resultados muestran que los mejores rendimientos de recuperación de TPC_{HPLC} corresponden al proceso AE.

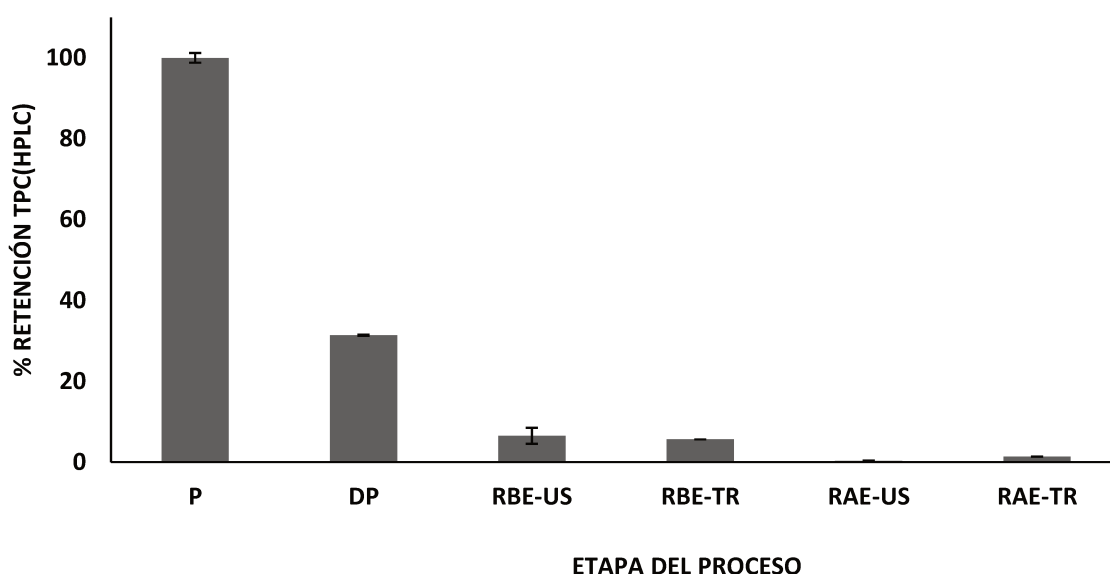


Figura 3.1. Contenido fenólico total (TPC_{HPLC}) durante los diferentes pasos del proceso de extracción de pectina de la cáscara de la manzana ‘Granny Smith’.

P: Cáscara de manzana fresca. DP: Cáscara de manzana deshidratada. RBE-US: Bagazo del proceso de obtención de pectina asistida por ultrasonido. RBE-TR: Bagazo del proceso de obtención de pectina por el método tradicional. RAE-US: Bagazo de la extracción de compuestos fenólicos y pectina asistida por ultrasonido. RAE-TR: Bagazo de la extracción de compuestos fenólicos y pectina por método tradicional.

La Figura 3.2 muestra los cambios en el contenido de compuestos fenólicos durante la extracción secuencial de compuestos fenólicos y pectina. Durante el proceso de secado (DP, Figura 3.2), las procianidinas fueron el compuesto fenólico más afectado. El proceso de secado produjo pérdidas de hasta el 94% de PACB2 y 96% de PACT. De forma similar, Heras-Ramírez et al. (2012) informaron que el secado de orujo de manzana a 60°C redujo significativamente el contenido de compuestos fenólicos (principalmente ácido clorogénico y (-) epicatequina). Por el contrario, los flavonoles (Q3G, QP, QHS, K3G) fueron los menos afectados entre los compuestos fenólicos, incluso en los extractos DP. La concentración de QHS aumentó hasta un 50% en comparación con el extracto P, convirtiéndose en el principal compuesto del extracto DP. Probablemente, el proceso de secado estabilizó estos glucósidos, permitiendo una mejor recuperación en la extracción. Schieber et al. (2003) informaron de que el secado del orujo de manzana en un secadero de tambor de tres etapas aumentaba la recuperación de flavonoles en aproximadamente un 6%, pero afectaba negativamente a las procianidinas hasta en un 22%. Este fenómeno podría ocurrir por factores externos, como la alta temperatura, aunque algunos autores informaron que la mayoría de los compuestos fenólicos eran estables hasta 150-200°C (Huaman-Castilla et al., 2019). No obstante, la degradación térmica de los polifenoles siguió una cinética de primer orden, y algunos compuestos, como el kaempferol, podrían ser inestables a temperaturas inferiores a 50°C (Setyaningsih et al., 2016).

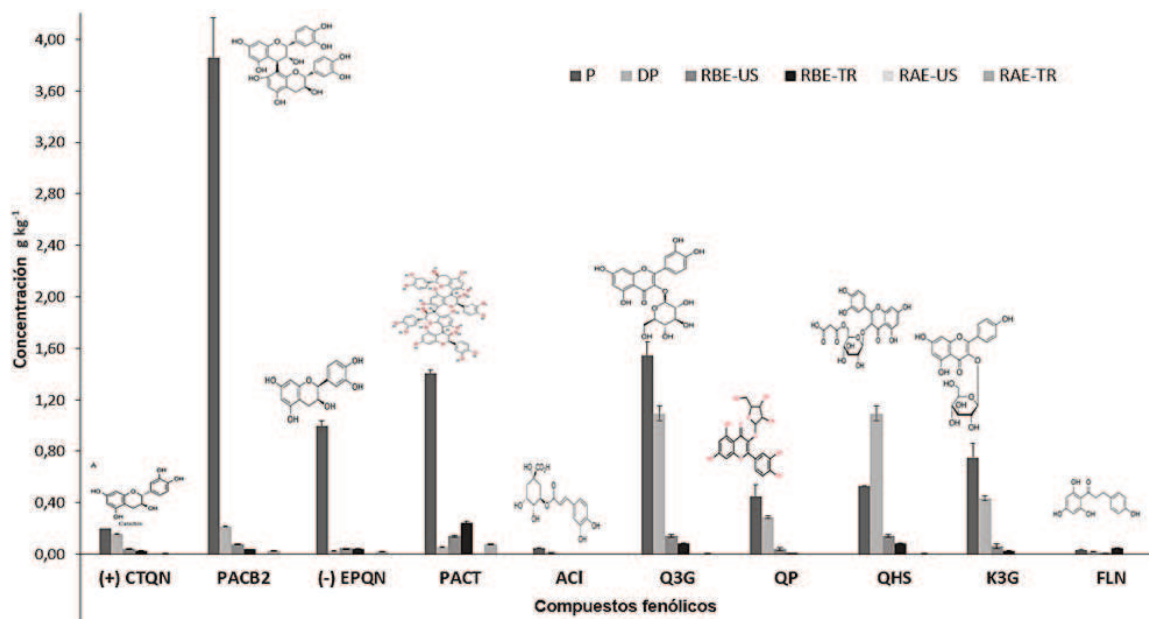


Figura 3.2. Concentraciones de compuestos fenólicos para las diferentes etapas de la extracción de pectina de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

(+) CTQN: catequina, PACB2: procianidina B2, (-) EPQN: epicatequina, PACT: procianidina, ACI: ácido clorogénico, Q3G: quercetina-3-glucurónido, QP: quercetina pentóxido, QHS: quercetina hexóxido, K3G: kaempferol-3-glucurónido, FLN: floreína

Henríquez et al. (2014) estudiaron la degradación térmica de los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’ durante el secado en tambor e informaron de una pérdida del 27% de los compuestos fenólicos a 110°C durante 250 s. Además, los factores internos pueden participar en la degradación fenólica a través de vías anaeróbicas como la vía del benzoil-CoA, la vía del resorcinol y la vía del floroglucinol, promovida por las bajas temperaturas de secado y el tiempo de secado prolongado (Schink et al., 2000). Por lo demás, el proceso convencional de extracción de pectina BE-TR permitió una mayor recuperación de PACT y FLN (0.246 y 0.05 g kg⁻¹, respectivamente) del tejido residual R_{BE-TR} que el recuperado en DP (0.058 y 0.02 g kg⁻¹) (Figura 3.2.). En el tejido vegetal, la ruta metabólica del ácido shikímico produjo la desaminación de la fenilalanina por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), generando ácidos cinámico y cumárico. Posteriormente, las chalconas y las hidrocalconas, como la floreína FLN presente en la cáscara de la manzana ‘Granny Smith’, se obtuvieron mediante la enzima malonil CoA y la chalcona sintasa (EC 2. 3.1.74). A partir de chalconas e hidrocalconas, los taninos condensados (como los homo-oligómeros de epicatequina como las procianidinas, PACT), podrían ser sintetizados por hidroxilasas e isomerasas (Rue et al., 2018). Estos compuestos fenólicos podrían unirse covalentemente a los componentes estructurales de la pared celular en la matriz alimentaria. El proceso de extracción de pectina con ácido cítrico (pH 2) podría extraer estos polifenoles unidos insolubles,

aumentando la concentración de estos compuestos fenólicos en R_{BE-TR} en comparación con DP (Azwanida, 2015; Mariadoss et al., 2019).

En cuanto a la extracción de pectina (Figura 3.3) en el proceso BE, el uso de la extracción asistida por ultrasonidos (US) mostró un mayor rendimiento de pectina (5.35%), un 22% superior al rendimiento de extracción obtenido sin el proceso de ultrasonidos (TR, 4.17%, $p < 0.05$) (Tabla 3.5). Sin embargo, estos resultados son similares a los reportados para la extracción de pectina de la cáscara de 'Granny Smith' (4.2%) con ácido nítrico pH 2.5 y con ácido cítrico a 80°C (5.25%) (Constenla et al., 2002; Kumar et al., 2020). Las frecuencias ultrasónicas generaron micro turbulencias que se transmiten con el flujo acústico y luego se generan los ciclos de contracción-expansión en la solución de ácido cítrico. La cavitación produce un hinchamiento del material vegetal que absorbe más cantidad de la solución de extracción, facilitando la hidrólisis de las paredes celulares, mejorando así los rendimientos de extracción (Maran et al., 2017; Minjares-Fuentes et al., 2014).



Figura 3.3. Obtención de pectina a partir de la cáscara de manzana 'Granny Smith'

Comúnmente, la pectina se clasifica según su grado de esterificación (DE). Si $DE > 50\%$, más del 50% de los grupos carboxilo del ácido poligalacturónico están metilados, y las pectinas se denominaban pectinas de alto metoxilo (HMP). Si $DE < 50\%$, las pectinas se denominaron pectinas de bajo metoxilo (LMP) (Bhatia et al., 2016; Güzel & Akpınar, 2019). El grado de esterificación de la pectina (DE) obtenido en este caso por los diferentes procesos varió entre el 52 y el 58% (pectina de alto metoxilo) (Tabla 3.5). Estos grados de esterificación fueron superiores a los reportados por Gazala et al. (2017) para la pectina de zumo concentrado de manzana (49% DE). El uso de diferentes procesos de extracción secuencial no afectó a las características moleculares de la pectina obtenida (Tabla 3.5). El contenido de metoxilo de la pectina obtenida en este estudio (9.30-10.7%, Tabla 3.5) fue

mayor que el reportado para la pectina de otras fuentes, como las cáscaras de cacao (utilizando ácido cítrico al 5% para la extracción de pectina) (Sarah et al., 2018).

Tabla 3.5. Caracterización de la pectina de cáscara de manzana obtenida mediante procesos de extracción asistidos por ultrasonidos (US) y convencionales (TR).

Parámetros	<i>Antes de la extracción TPC (BE)</i>		<i>Después de la extracción TPC (AE)</i>	
	US	TR	US	TR
Rendimiento (%)	5.35 ± 0.2 abA	4.17 ± 0,3 cB	6.38 ± 0.2 aA	4.92 ± 0.3 bcB
DE (%)	57.64 ± 4aA	57.84 ± 2aA	60.01 ± 2.0 aA	58.15 ± 1.0 aA
Contenido de metoxilo (%)	9.30 ± 0 aA	10.23 ± 0,9 aA	10.70 ± 0.2 aA	10.39 ± 0.2 aA
Peso equivalente	436.23 ± 39,1 aA	437.22 ± 22.4 aA	461.69 ± 23.4 aA	440.1 ± 35.6 aA

DE: grado de esterificación, TPC: compuestos fenólicos totales. Letras mayúsculas y minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por la prueba de Tukey, entre los sistemas de extracción, y entre los métodos de extracción US y TR, respectivamente.

No obstante, los valores de peso equivalente determinados para la pectina extraída aquí fueron inferiores (436-462) a los comunicados para la pectina comercial (1666.67) (Kumar & Chauhan, 2010). Probablemente, los valores más bajos de pH en la solución de ácido cítrico degradaron la pectina. Minjares-Fuentes et al. (2014) informaron que el uso de soluciones ácidas ($\text{pH} < 2.5$) podría conducir a la degradación parcial de las cadenas de homogalacturonano de la pectina. Estos resultados sugirieron que la pectina obtenida podría formar geles a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas a $\text{pH} < 3.5$ y contenido de azúcar superior al 55%. El bajo peso equivalente de la pectina permitiría generar estas interacciones en menos tiempo, pero su estabilidad podría ser inferior a la de la pectina comercial. Es necesario seguir investigando para determinar las condiciones adecuadas para implementar tecnologías alternativas sostenibles para la obtención de compuestos fenólicos y pectina con mejores propiedades funcionales mediante el proceso de extracción AE-US.

3.3. Extracción Soxhlet de compuestos fenólicos de sub-productos de frutilla y cáscara de manzana

Las variables de proceso estudiadas en la extracción Soxhlet (R: relación sólido-líquido, S: solvente) afectaron significativamente ($p < 0.001$) la recuperación de compuestos fenólicos a partir de sub-productos agroindustriales de frutilla (RF) y cáscara de manzana 'Granny Smith' (GS). Observando que, R y S afectaron ($p < 0.001$) a los rendimientos de compuestos fenólicos totales (TPC) y a la capacidad antioxidante (CA) de los extractos de ambas materias primas (Tablas 3.6 y 3.7). El factor de interacción entre R y S también fue

significativo ($p < 0.001$) para ambos tejidos, lo que significa que R afectó de forma diferente al TPC y al CA de los extractos en función del disolvente utilizado.

Tabla 3.6. ANOVA multifactorial para todas las respuestas estudiadas en extractos de sub-productos de frutilla (RF) obtenidos por Soxhlet.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados										
		TPC	CA	TGI	EAP	AGN	EA	Q3G	QHS	K3G	KHS	TPC _{HPLC}
R	3	29.715***	0.00031***	0.346***	0.005***	0.011***	0.006***	0.006***	0.015***	0.002***	0.0002***	0.599***
S	1	398.65***	0.00018***	0.408***	0.0004**	0.467***	0.003***	0.007***	0.015***	0.005***	0.0024***	2.988***
R.S	3	16.813***	0.00002***	0.170***	0.008***	0.003***	0.006***	0.007***	0.002***	0.004***	0.0002***	0.264***
Residuos	16	3.972	0.0000082	0.005	0.0002	0.0003	0.000003	0.00005	0.0001	0.00003	0.0000001	0.0056
Total	23	449.16	0.00052	0.9302	0.0136	0.482	0.01523	0.02017	0.032	0.01115	0.003	3.858

R: relación sólido-líquido, S: disolvente, GL: grado de libertad. TPC: Contenido total de Compuestos fenólicos. CA: Capacidad antioxidante de los extractos Soxhlet. TGI: tetragaloil glucosa Isómero, EAP: ácido elágico pentóxido, AGN: Dímero de galoil-bis-HHDP-glucosa (isómero de agrimoniin), EA: ácido elágico, Q3G: quercetina-3-O-glucuronido, QHS: quercetina hexóxido, K3G: Kaempferol-3-O-glucuronido, TPC_{HPLC}: Compuestos fenólicos totales analizados por HPLC
*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. ns: $p > 0.05$.

3.3.1. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los extractos de RF y GS obtenidos por Soxhlet

La extracción Soxhlet de compuestos fenólicos a partir de RF utilizando agua (W) mejoró la recuperación de TPC a medida que aumentaba R. El mayor rendimiento de TPC ($10.69 \text{ g AGE Kg}^{-1}$) se obtuvo con R $1:40 \text{ g mL}^{-1}$, alcanzando un incremento de hasta el 38% respecto a los valores obtenidos con $1:30$ o $1:20 \text{ g mL}^{-1}$ y hasta un 48% superior a la relación $1:10$ (Tabla 3.7). El gradiente de concentración entre el soluto y el disolvente fue la fuerza impulsora del proceso de difusión. Por lo tanto, con el valor R más elevado ($1:40 \text{ g mL}^{-1}$) se obtuvieron mejores rendimientos de extracción. Así pues, los subproductos de la frutilla tienen un gran potencial como fuente de compuestos bioactivos obtenidos con agua.

La extracción Soxhlet en RF con EtOH aumentó significativamente la recuperación de TPC en comparación con W en un 47-170% (Tabla 3.7). Contrariamente a las extracciones con W, los TPC de los extractos obtenidos con EtOH no se vieron afectados por la variación del factor R (valor medio $15.37 \text{ g AGE Kg}^{-1}$) (Tabla 3.7). Los compuestos fenólicos de los residuos de frutilla podrían presentar una solvatación preferencial cuando se utilizó la mezcla agua-etanol. Los compuestos mostrarían una hidratación hidrofóbica con los pocos grupos polares que podrían tener en su estructura, y una gran cantidad de grupos (-OH) permitiría una mayor interacción con el agua (Bosch & Rosés, 1992). Por lo

tanto, este fenómeno produciría más efecto que el aumento de la relación de extracción. Sin embargo, el uso de EtOH en el sistema de extracción Soxhlet aumentó significativamente los rendimientos de TPC en comparación con los extractos obtenidos utilizando agua como solvente en RF, mejorando los rendimientos de extracción hasta en un 170% para la extracción a 1:10 (Tabla 3.7). Por lo tanto, cuanto menor sea la relación de extracción, menor será la cantidad de disolvente necesaria; en consecuencia, menores serán los costes de producción de los extractos (Alara et al., 2021).

Estos resultados confirman los hallazgos reportados en otros estudios, donde las mezclas binarias de etanol-agua resultan ser un bio-solvente adecuado para la obtención de compuestos fenólicos, gracias a sus propiedades próticas polares (Pingret et al., 2012). Los rendimientos obtenidos para RF con EtOH fueron superiores a los reportados por otros estudios, para compuestos fenólicos de hojas de pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) utilizando extracción Soxhlet, 75% metanol, 70°C y R: 1:32 g mL⁻¹, los rendimientos fueron de 6.6 g AGE Kg⁻¹ (Ghasemzadeh & Jaafar, 2014), y superiores a los rendimientos reportados para subproductos de mango (4.5-6.6 g AGE Kg⁻¹), espárragos (2.8-3.7 g AGE Kg⁻¹), coliflor (1.1-1.8 g AGE Kg⁻¹), y limón bergamota (4-10 g AGE Kg⁻¹) (Blancas-Benitez et al., 2015; Goni & Hervet-Hernandez, 2011; Putnik et al., 2017).

Tabla 3.7. Compuestos fenólicos totales (TPC) y capacidad antioxidante (CA) de los extractos de sub-productos de frutilla (RF) y cáscara de manzana ‘Granny Smith’ (GS).

Muestra	R	TPC (g AGE Kg ⁻¹)		CA (mmol TE Kg ⁻¹)	
		W	EtOH	W	EtOH
RF	1:10	5.58 ± 0.08 ^{cB}	15.10 ± 0.14 ^{dA}	4.82 ± 0.20 ^{cB}	9.95 ± 0.08 ^{aA}
	1:20	6.57 ± 0.23 ^{bcB}	15.13 ± 0.18 ^{dA}	10.43 ± 1.16 ^{bB}	15.44 ± 0.72 ^{bA}
	1:30	6.27 ± 0.02 ^{bB}	15.41 ± 0.21 ^{dA}	10.70 ± 0.21 ^{bB}	19.01 ± 0.86 ^{cA}
	1:40	10.69 ± 0.69 ^{aB}	15.82 ± 1.76 ^{dA}	15.34 ± 0.12 ^{aB}	18.99 ± 1.16 ^{cA}
GS	1:10	4.18 ± 0.02 ^{aB}	6.33 ± 0.12 ^{dA}	3.60 ± 0.14 ^{dB}	7.26 ± 0.20 ^{dA}
	1:20	3.90 ± 0.31 ^{abB}	7.27 ± 0.001 ^{cA}	8.22 ± 0.35 ^{cB}	12.89 ± 0.38 ^{cA}
	1:30	3.55 ± 0.13 ^{bB}	7.92 ± 0.09 ^{bA}	11.48 ± 0.39 ^{bB}	13.75 ± 0.15 ^{bA}
	1:40	4.35 ± 0.24 ^{aB}	11.90 ± 0.01 ^{aA}	14.05 ± 1.09 ^{aB}	20.51 ± 0.79 ^{aB}

R: Relación sólido-líquido. Promedio(n=3) ± desviación estándar. W: agua. EtOH: Etanol 80%. Diferentes letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey, entre solvente y entre diferentes relaciones sólido-líquido, respectivamente.

En cuanto a la capacidad antioxidante mediante el radical DPPH*, los valores de la CA de los extractos acuosos de RF se vieron significativamente afectados por el valor R, de forma similar al TPC (Tablas 3.6 y 3.7). La mayor CA se obtuvo para la relación 1:40 (15.3 mmol TE Kg⁻¹), siendo hasta un 30.2-32.01% superior a los de los extractos 1:30 y 1:20 (10.7-10.4 mmol TE Kg⁻¹) y un 69% superior a los extractos 1:10 (4.8 mmol TE Kg⁻¹). Migueis et al. (2018) reportaron capacidades antioxidantes de 10.1, 12.2 y 13.9 mmol TE Kg⁻¹ para varias especies de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga, una fruta subtropical de América del Sur), similares a las obtenidas para los extractos de agua RF, lo cual indica el potencial antioxidante de este tipo de residuos agroindustriales cuyos metabolitos secundarios se puede extraer adecuadamente con los disolventes ecológicos. Por otro lado, el EtOH mejoró la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos en comparación con los extractos W. Los extractos RF con EtOH con los valores más altos de CA (18.9-19.0 mmol TE Kg⁻¹) fueron los obtenidos con R 1:40 y 1:30 ($p>0.05$), respectivamente. Finalmente, el extracto EtOH RF 1:10 presentó la menor capacidad antioxidante (9.9 mmol TE Kg⁻¹) debido a la rápida saturación del solvente por el soluto y al proceso de difusión más lento.

En cuanto a la cáscara de manzana 'Granny Smith' (GS), los rendimientos de TPC de los extractos obtenidos tras 8 h de extracción Soxhlet con W se vieron significativamente afectados por la relación sólido-líquido (Tablas 3.7 y 3.8). El mayor TPC se obtuvo con el extracto con W, y R 1:40 (4.35 g AGE Kg⁻¹), representando el 40.7% del TPC obtenido para RF en las mismas condiciones de extracción. Esta diferencia en los rendimientos se debe a la variabilidad composicional de los diferentes tipos de residuos agroindustriales que se pueden revalorizar. Además, las interacciones entre los compuestos fenólicos, el tejido vegetal y el disolvente (epimerización, autoxidación, alquilación y esterificación) afectan su extractabilidad, estabilidad y bioactividad (Alara et al., 2021). Además, la exposición a altas temperaturas durante un periodo prolongado podría aumentar dichas reacciones negativas. Sin embargo, los rendimientos de TPC obtenidos para los extractos de GS W fueron similares a los reportados para otros subproductos agroindustriales, como el orujo de uva extraído con etanol al 70% a 40-140°C (3.5-7.0 g AGE Kg⁻¹) (Rajha et al., 2014).

Tabla 3.8. ANOVA multifactorial para todas las respuestas estudiadas en extractos de cáscara de manzana (GS) ‘Granny Smith’ obtenidos por Soxhlet.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados										
		TPC	CA	(+) CTQN	PACB2	(-) EPQN	PACT	Q3G	QPN	QHSX	K3G	TPC _{HPLC}
R	3	31.62***	0.0004***	ns	0.023***	0.003***	0.005***	0.0786***	0.001***	0.003***	0.017***	0.364***
S	1	111.26***	0,0001***	ns	0.005***	0.002***	0.008***	0.1531***	0.001***	0.024***	0.062***	0.647***
R.S	3	23.91***	0,0000***	ns	0.035***	0.005***	0.002***	0.029***	0.005***	0.003***	0.019***	0.021***
Residuos	16	0.26	0.0000	0.0000	0.0001	0.0003	0.0000	0.0001	0.0002	0.0000	0.0003	0.0006
Total	23	167.04	0.0006	0.003	0.063	0.009	0.0153	0.2648	0.008	0.029	0.0996	1.0337

R: Relación sólido-líquido, S: disolvente, GL: grado de libertad. TPC: Compuestos fenólicos totales. CA: Capacidad antioxidante de los extractos Soxhlet. (+) CTQN: catequina, PACB2: procianidina B2, (-) EPQN: epicatequina, PACT procianidina tetramémero, Q3G: quercetina-3-O-glucuronido, QPN: quercetina pentóxido, QHSX: quercetina: hexóxido, K3G: kaempferol-3-O-glucuronido, TPC_{HPLC}: compuestos fenólicos totales analizados por HPLC. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. ns: $p > 0,05$.

El uso de EtOH mejoró la recuperación de TPC de GS, de forma similar a RF (Tabla 3.7). Los TPC de los extractos de GS con EtOH se incrementaron al aumentar R, obteniéndose el mayor rendimiento (11.9 g AGE Kg⁻¹) para R 1:40. Se ha reportado, que valores de la relación de extracción mayores a 1:20 producen mayor recuperación de compuestos fenólicos (Castro-López et al., 2017; Ćujić et al., 2016). Las mezclas binarias de alcohol y agua ofrecen una alternativa sostenible para la obtención de compuestos fenólicos a partir de diferentes matrices vegetales de descarte. La mezcla de agua y etanol actúa de forma sinérgica. La primera es fundamental para ocupar todas las cavidades de la matriz vegetal generando un aumento de su volumen, permitiendo que el etanol, de menor viscosidad, difunda a través del material y rompa las interacciones no covalentes entre el soluto y la matriz, facilitando la esfera de solvatación preferencial transfiriendo el analito al medio de disolución (Ćujić et al., 2016; Villamil-Galindo et al., 2020).

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios de las plantas con mayor actividad antioxidante descrita. Cada compuesto tiene una capacidad antioxidante diferente, gracias a las diferentes reacciones de oxido-reducción que llevan a cabo, su resonancia estructural en su anillo fenilo, y también dependiendo del patrón de sustitución de los grupos hidroxilo (Cvejić et al., 2017; Dzah et al., 2020). El uso de EtOH y el aumento de la relación de extracción Sólido/Líquido, mejoraron la capacidad antioxidante de los extractos de GS (Tabla 3.7). Los extractos de GS con W y R 1:40 presentaron una capacidad antioxidante de 14 mmol TE Kg⁻¹, y EtOH 1:40, 20.5 mmol TE Kg⁻¹, valores comparables a los obtenidos para otros productos mediante extracción Soxhlet como la melaza de remolacha azucarera (9.0 mmol TE Kg⁻¹), la colza (4.1 mmol TE Kg⁻¹), y las flores de *Jatropha integerrima* (5.8 mmol TE Kg⁻¹) (Chen et al., 2015; Szydłowska-Czerniak & Tułodziecka, 2015; Xu et al., 2016).

3.3.2. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos de RF y GS obtenidos por Soxhlet

El uso de la tecnología tradicional Soxhlet en la recuperación de los compuestos fenólicos a partir de los residuos agroindustriales de frutilla (RF) y cáscara de manzana (GS), permitieron la identificación tentativa mediante HPLC-DAD, de ocho compuestos fenólicos principales en el tejido RF, pertenecientes a tres clases principales de compuestos fenólicos: taninos hidrolizables, derivados del ácido elágico y flavonoles (Figura 3.4). El isómero tetragalloil-glucosa (TGI) y el dímero galloil-bis-HHDP-glucosa (agrimoniina) (AGN) se identificaron entre los taninos hidrolizables; el pentósido de ácido elágico (EAP) y el ácido elágico libre (EA) entre los derivados del ácido elágico; y, por último, los flavonoles estaban representados por el quercetin-3-O-glucurónido (Q3G), el quercetin hexósido (QHS), el kaempferol-3-O-glucurónido (K3G) y el kaempferol hexósido (KHS).

Para los extractos con W, R 1:10, los taninos hidrolizables representaron el 38.5% de los compuestos fenólicos totales, similares a los flavonoles con un 39.9%, seguidos de los derivados del ácido elágico con un 21.6% (Figura 3.4-a). Sin embargo, a medida que aumentó la relación de extracción, los taninos hidrolizables representaron el 64% de los compuestos fenólicos totales en los extractos obtenidos con R 1:40, lo que demuestra que el aumento del gradiente de concentración en la solución de extracción (W) permitió una mayor recuperación de taninos hidrolizables de acuerdo con informes anteriores (Villamil-Galindo et al., 2020).

La mayor concentración de TGI en los extractos de W se obtuvo con R 1:40 (0.18 g Kg⁻¹); para los otros valores de R, la concentración de TGI fue similar (0.07-0.1 g Kg⁻¹) (Figura 3.4). La extracción con EtOH mejoró significativamente los rendimientos de TGI para todas las relaciones de extracción, con la concentración máxima con R 1:40 (0.83 g Kg⁻¹). Sin embargo, el EAP tuvo la mayor concentración, 0.08 g Kg⁻¹ ($p<0.05$), en los extractos EtOH (R 1:30), seguido de la extracción con W 1:10 (0.04 g Kg⁻¹) (Figura 3.4-b). Estas concentraciones fueron superiores a las reportadas para los extractos del tallo de *Sanguisorba Officinalis* L. (0.38 g Kg⁻¹) perteneciente a la familia *Rosaceae* (Lachowicz et al., 2020).

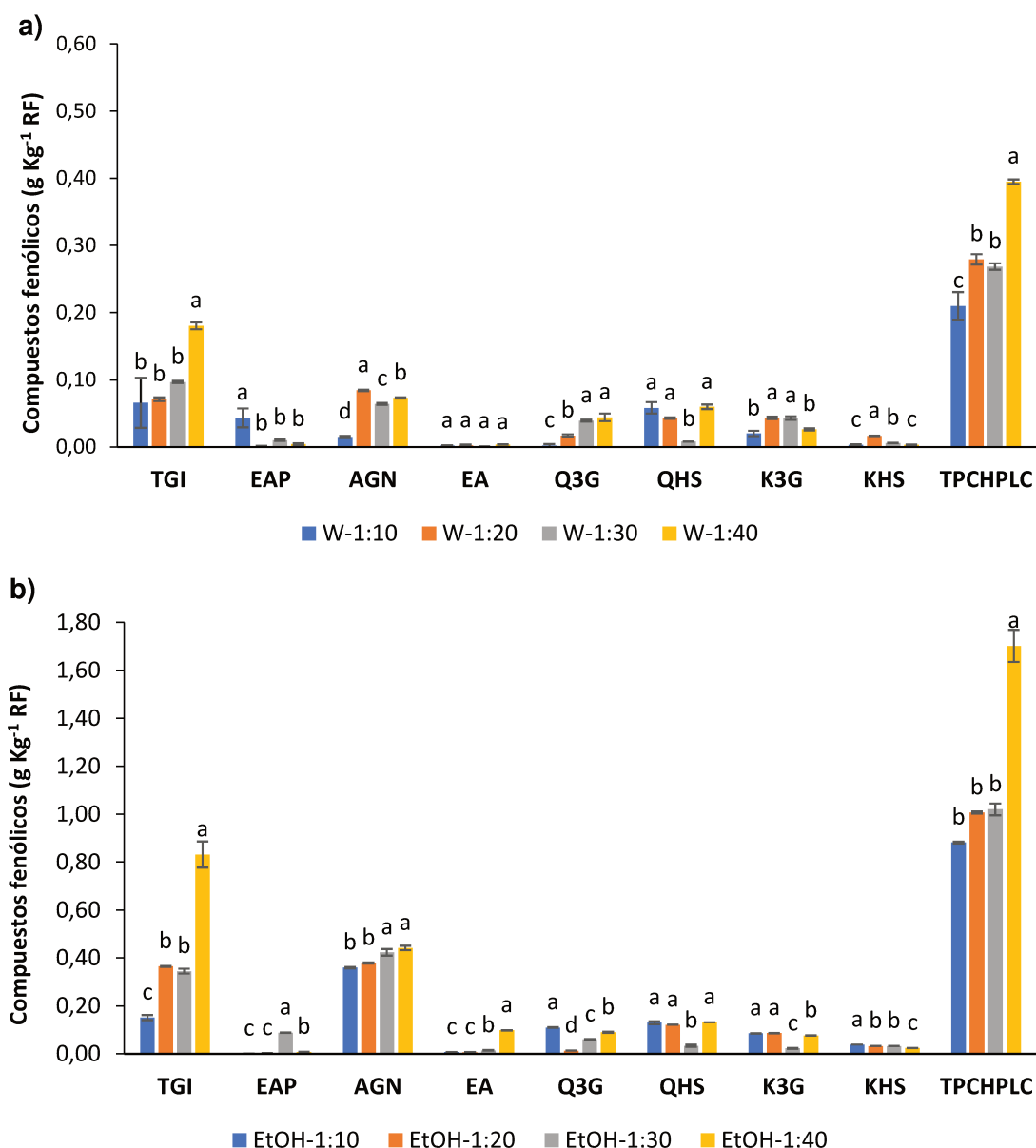


Figura 3.4. Compuestos fenólicos de subproductos de frutilla (RF) extraídos con a) agua (W) y b) 80% de etanol (EtOH).

TGI: tetragaloil glucosa Isómero, **EAP:** ácido elágico pentóxido de, **AGN:** Dímero de galoil-bis-HHDP-glucosa (isómero de agrimoniina), **EA:** ácido elágico, **Q3G:** quercetina-3-O-glucurónido, **QHS:** quercetina Hexósido, **K3G:** Kaempferol-3-O-glucurónido, **TPC_{HPLC}:** Compuestos fenólicos totales analizados por HPLC. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey, entre diferentes relaciones sólido-líquido

El agrimoniin es un compuesto derivado del ácido hexahidroxidifénico (HHDP) considerado un marcador taxonómico de las *Rosaceae*, con gran importancia en la industria nutracéutica debido a sus propiedades bioactivas (Karlińska et al., 2021). RF mostró un contenido de AGN de 0.08 g Kg⁻¹ con la extracción W y R 1:20, seguido de 0.07 g Kg⁻¹ obtenidos con 1:40. Estos rendimientos mejoraron significativamente para todos los valores R ($p < 0.05$) cuando se utilizó EtOH, con una concentración máxima de 0.44 g Kg⁻¹ en los extractos 1:40 (Figura 3.4-b). Este rendimiento de AGN fue superior al contenido reportado para extractos de frutos enteros de frutilla (0.12 g Kg⁻¹) obtenido con metanol al 70% (Nowicka et al., 2019), mostrando a este tejido residual como una valiosa fuente de AGN. Las propiedades antioxidantes de los taninos hidrolizables se han reportado no solo *in-vitro* sino también *in-vivo* (Grochowski et al., 2017). Simirgiotis et al. (2009) informaron que, para la parte comestible de la frutilla, los glucósidos de cianidina y el ácido elágico fueron los compuestos con mayor participación en la actividad antioxidante. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 3.9 para RF, los taninos hidrolizables TGI y AGN tuvieron una correlación significativa ($p < 0.01$) con la capacidad antioxidante DPPH* (R^2 0.75-0.70). Estos compuestos tenían alcohol polihídrico en el centro, y sus grupos hidroxilo podían esterificarse parcialmente con ácido elágico o HHDP, teniendo la capacidad de ceder electrones y neutralizar así los radicales libres presentes (Grochowski et al., 2017; Hill, 2003).

El EA en los extractos de W mostraron concentraciones similares ($p > 0.05$) entre las diferentes proporciones de extracción (0.001-0.004 g Kg⁻¹). De forma similar al AGN, el uso de EtOH mejoró la extracción de EA, con una concentración máxima de 0.10 g Kg⁻¹ R 1:40, seguida de 0.02 g Kg⁻¹ R 1:30. El consumo de derivados del ácido elágico se ha asociado con numerosos beneficios para la salud, ya que en condiciones *in-vivo* se metabolizaron diferentes tipos de urolitinas por la microbiota intestinal, que tenían fuertes actividades antiproliferativas y de inducción de la apoptosis de células cancerosas (Basu et al., 2014; Landete, 2011).

Tabla 3.9. Coeficientes de correlaciones para las variables estudiadas en los extractos de subproductos de frutilla RF.

	TGI	EAP	AGN	EA	Q3G	QHS	K3G	KHS	TPC _{HPLC}	TPC	CA
TGI	--										
EAP	NS	--									
AGN	0.74**	NS	--								
EA	0.93***	NS	0.56*	--							
Q3G	NS	NS	0.62*	0.51*	--						
QHS	0.57**	NS	0.64**	0.51*	NS	--					
K3G	NS	-0,59*	0.62*	NS	NS	0.82***	--				
KHS	NS	NS	0.89***	NS	0.55*	0.60*	0.67**	--			
TPC_{HPLC}	0.93***	NS	0.92***	0.83***	0.63**	0.69**	0.61*	0.69**	--		
TPC	0.70**	NS	0.95***	NS	0.65**	0.68**	0.58*	0.82***	0.88***	--	
CA	0.75***	NS	0.70**	0.54*	NS	NS	NS	NS	0.79**	0.74***	--

TGI: tetragaloil glucosa Isómero, **EAP:** ácido elágico pentóxido de, **AGN:** Dímero de galoil-bis-HHDP-glucosa (isómero de agrimoniina), **EA:** ácido elágico, **Q3G:** quercetina-3-O-glucurónido, **QHS:** quercetina Hexósido, **K3G:** Kaempferol-3-O-glucurónido, **TPC_{HPLC}:** Compuestos fenólicos totales analizados por HPLC, **TPC:** Compuestos fenólicos totales. **CA:** Capacidad antioxidante por DPPH*. NS: no significativo, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

El flavonol Q3G se determinó en una concentración de 0.002-0.04 g Kg⁻¹ al utilizar W como solvente de extracción. Las mayores concentraciones se obtuvieron con R 1:40 y 1:30 ($p > 0.05$), seguidas de 1:20 y 1:10 (Figura 3.4-a). Sin embargo, el uso de etanol al 80% como solvente de extracción aumentó significativamente los rendimientos de Q3G, determinando los mayores rendimientos en R 1:10 (0.1 g Kg⁻¹) y 1:40 (0.09 g Kg⁻¹) (Figura 3.4-b). Rendimientos similares a los reportados por (Ćujić et al., 2016) para extractos de aronia obtenidos por maceración con etanol al 50% a R 1:30 (0.1 g Kg⁻¹). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones de QHS obtenidas para R 1:40, 1:20 y 1:10 con W (0.04-0.05 g Kg⁻¹) y EtOH (0.12-0.13 g Kg⁻¹) (Figura 3.4-a-b). El kaempferol es uno de los flavonoles más comunes en diferentes especies botánicas. En las vacuolas celulares, el kaempferol tiende a glicosilarse con algunos carbohidratos para tener más estabilidad en el pH del medio, por lo que encontramos en los extractos de subproducto de frutilla los diferentes flavonoles glicosilados (Rana & Gulliyya, 2019). En cuanto al K3G, las relaciones de extracción 1:30 y 1:20 con W ($p > 0.05$) produjeron las mayores concentraciones de estos compuestos (0.043 g Kg⁻¹). El EtOH mejoró los rendimientos de extracción de K3G en aproximadamente un 50% (0.086 g Kg⁻¹ para 1:20); los valores de

K3G en RF fueron cercanos a los reportados para el té verde (1.2-1.7 g Kg⁻¹), una popular infusión antioxidante, extraídos con metanol al 60% (Kingori et al., 2021). Por lo tanto, los residuos agroindustriales de frutilla mostraron una gran variedad de compuestos fenólicos de interés. En los extractos acuosos, el mayor rendimiento de KHS (0,016 g Kg⁻¹) se alcanzó con R 1:20 (Figura 3.4-a). Los rendimientos aumentaron hasta un 91% con etanol-agua 80:20 para R 1:10 (Figura 3.4-b). El total de los compuestos fenólicos individuales identificados y cuantificados (TPC_{HPLC}) mostró para los extractos con W y R 1:40 una concentración total de 0.40 g Kg⁻¹, seguida por los extractos con 1:20 y 1:30 ($p>0.05$) (0.27-0.26 g Kg⁻¹), y finalmente por los extractos obtenidos con 1:10 (0.20 g Kg⁻¹). Como se observó en la mayoría de los compuestos fenólicos de RF, el EtOH incrementó el TPC_{HPLC} hasta un 425% comparado con los extractos obtenidos con W, donde la mayor concentración (1.70 g Kg⁻¹) se obtuvo con R 1:40, seguido de 1:30, 1:20 y 1:10 con concentraciones similares ($p>0.05$) (1.0 g Kg⁻¹) (Figura 3.4-b). El contenido máximo de TCP_{HPLC} (1.70 g Kg⁻¹) obtenido para los extractos RF EtOH fue muy cercano al reportado para las hojas de la planta de frutilla (1.95-2.07 g Kg⁻¹) obtenido con metanol-ácido fórmico (99:1) a temperatura ambiente (Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010; Skupień & Oszmiański, 2004).

Para el perfil de compuestos fenólicos obtenido a partir de los extractos de la cáscara de manzana 'Granny Smith' las dos clases principales de compuestos fenólicos identificados y cuantificados fueron los flavan-3-oles con (+) catequina ((+) CTQN), Procianidina B2 (PACB2), (-) epicatequina ((-) EPQN) y Procianidina tetramero (PACT); y los flavonoles con el Quercetina-3-o-glucurónido (Q3G), Quercetina pentóxido (QPN), Quercetina hexóxido (QHSX) y Kaempferol-3-o-glucurónido (K3G) (Figura 3.5).

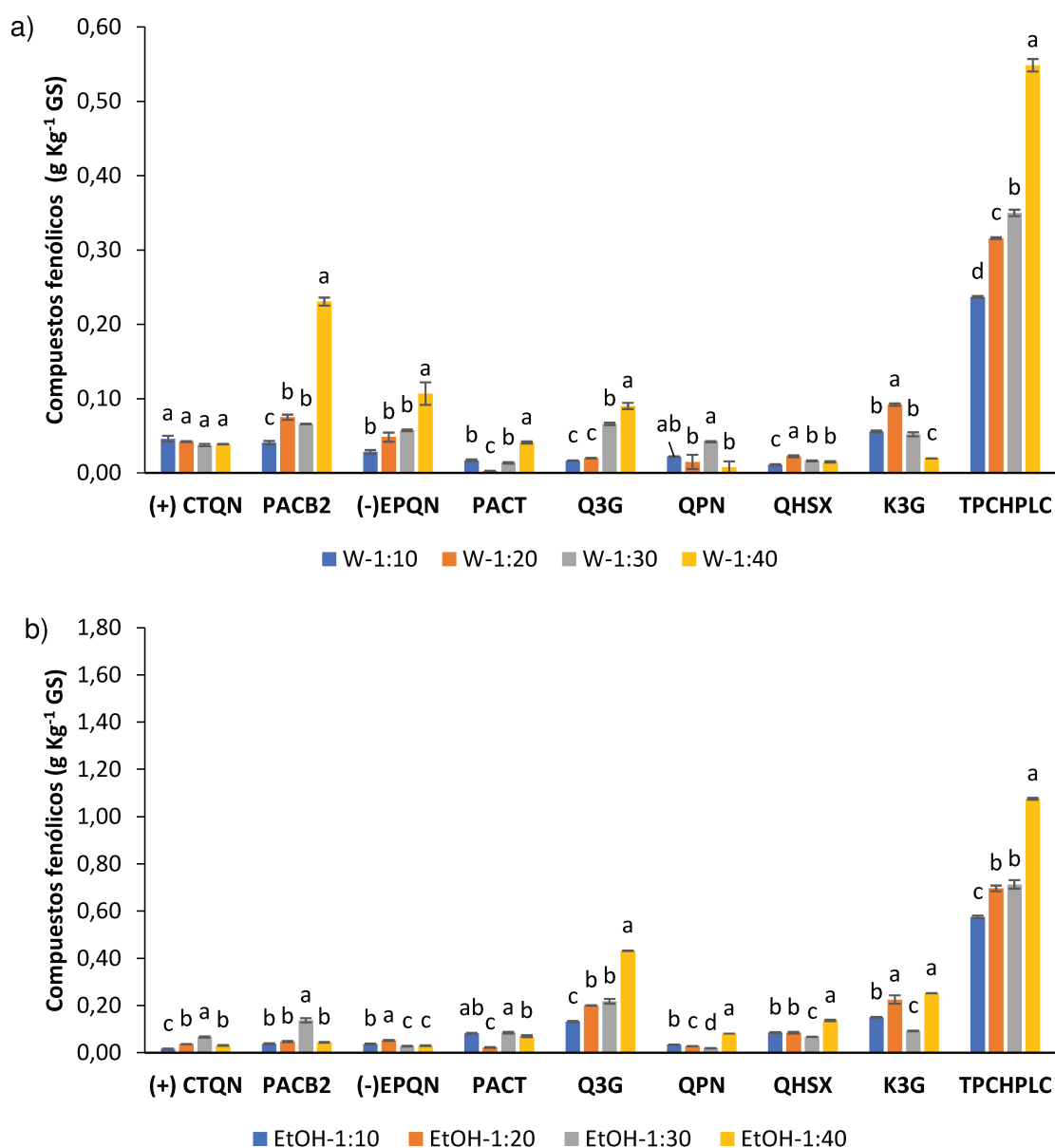


Figura 3.5. Compuestos fenólicos de la cáscara de manzana (GS) ‘Granny Smith’ extraídos con a) agua (W) y b) 80% de etanol (EtOH).

(+) CTQN: catequina, PACB2: procianidina B2, (-) EPQN: epicatequina, PACT: procianidina tetrámero, Q3G: quercetina-3-O-glucurónido, QPN: quercetina pentóxido, QHSX: quercetina: hexóxido, K3G: kaempferol-3-O-glucurónido, TPC_{HPLC}: compuestos fenólicos totales analizados por HPLC. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey, entre distintas proporciones sólido-líquido.

Para los extractos de W con S:L de 1:10, 1:20 y 1:30, los flavan-3-oles y los flavanoles representaron cada uno el 50 % de los compuestos fenólicos totales. Para los extractos W con 1:40, el 76 % de los compuestos cuantificados correspondió a los flavan-3-oles, lo que demuestra la afinidad de estos compuestos fenólicos por un disolvente polar como el agua gracias a su glicosilación (Figura 3.5-a). No obstante, los flavanoles

representaron más del 50 % del total de compuestos fenólicos en todas las extracciones con EtOH, con un máximo del 84 % en los extractos con R 1:40 (Figura 3.5-b).

La variación de R no afectó ($p>0.05$, Tabla 3.8) la concentración de (+)CTQN con agua, obteniéndose concentraciones de 0.037-0.046 g Kg⁻¹. Las extracciones realizadas con EtOH incrementaron los rendimientos de (+)CTQN hasta 0.066 g Kg⁻¹ (R 1:30), siendo un 77% superior a los extractos con W. Los rendimientos de (+)CTQN obtenidos fueron inferiores a los reportados por Almeida et al (2017) para cáscara de manzana 'Granny Smith' extraída con acetona al 100% (0.17 g Kg⁻¹). PACB2 (epicatequina-epicatequina dímero) es la proantocianidina más común que se encuentra en altas concentraciones en frutas como melocotones, manzanas y ciruelas (de la Rosa et al., 2018).

El contenido de PACB2 en los extractos con W fue mayor para la relación de extracción 1:40 (0.23 g Kg⁻¹) siendo hasta un 71% mayor que el extracto con R 1:30 y 1:20 ($p>0.05$), y con 1:10 (0.04 g Kg⁻¹). El etanol sólo mejoró los rendimientos de extracción para R 1:30 (0.13 g Kg⁻¹). La procianidina B2 en medio líquido a partir de 90°C inicia un proceso de degradación por oxidación y epimerización, disminuyendo la recuperación de este metabolito (De Taeye et al., 2014). Varios informes han demostrado la presencia de (-) epicatequina como principal compuesto fenólico en manzanas (He & Luo, 2007; Raudone et al., 2017). La mayor concentración de (-)EPQN se alcanzó con W y R 1:40 (0.10 g Kg⁻¹), siendo superior a la reportada por Li et al. (2020) para extractos de orujo de manzana (0.02 g Kg⁻¹). La mayor concentración de PACT (0.04 g Kg⁻¹) en extractos de W se obtuvo con R 1:40 (Figura 3.5-a). El EtOH mejoró todos los rendimientos de PACT, obteniéndose una mayor concentración (0.085 g Kg⁻¹) con R 1:30 (Figura 3.5-b). Las procianidinas son oligómeros compuestos por catequina y epicatequina; su estructura y alto peso molecular les confieren diferentes propiedades bioactivas y funcionales para la industria alimentaria.

Los rendimientos de extracción de Q3G con W se vieron afectados por R, obteniéndose el mayor rendimiento (0.09 g Kg⁻¹) con R 1:40, un 82% superior a los rendimientos obtenidos con 1:20 y 1:10 (0.016 g Kg⁻¹). Sin embargo, el EtOH mejoró los rendimientos de extracción de Q3G, como era de esperar para un compuesto de polaridad media alta (Massini et al., 2016). La R 1:40 produjo el mayor rendimiento (0.43 g Kg⁻¹), siendo un 50% menor el rendimiento de Q3G con 1:30 y 1:20 (0.2 g Kg⁻¹) (Figura 3.5). Además, Q3G fue el único compuesto con una correlación altamente significativa con la capacidad antioxidante (R^2 0.85, tabla 3.10), siendo un elemento fundamental por su estructura y sus hidroxilos que permiten la donación de electrones, neutralizando los radicales libres presentes en el medio (Martínez-Ramos et al., 2020). Estos resultados difieren de los obtenidos para RF, donde los flavonoles no mostraron una correlación

altamente significativa con la capacidad antioxidante determinada por DPPH. Esto demuestra que este potencial bioactivo no depende sólo de la concentración sino también de la interacción con la matriz alimentaria. Los valores obtenidos con EtOH fueron similares e incluso superiores a los reportados para extractos de acetona de cáscara de manzana 'Granny Smith' ($0.18\text{-}0.4\text{ g Kg}^{-1}$) (Almeida et al., 2017; Massini et al., 2016). QPN, el otro derivado glucósido de la quercetina, se obtuvo con W en un rango de $0.007\text{-}0.04\text{ g Kg}^{-1}$, y la mayor recuperación de QPN se logró con R 1:30 con una concentración de 0.04 g Kg^{-1} , no obstante, el EtOH permitió una mayor recuperación de este flavonol con un rendimiento de 0.08 g Kg^{-1} empleando la R 1:40. La extracción de QHSX con W y R 1:20 (0.02 g Kg^{-1}) obtuvo el mayor rendimiento para este tipo de extracción, hasta un 200% superior al obtenido con R 1:10. Sin embargo, el uso de EtOH con R 1:40 (0.13 g Kg^{-1}) mostró la mayor concentración de QHSX. Según informes previos, la quercetina y sus glucósidos tienen una baja biodisponibilidad (16-25%) debido a su baja solubilidad en agua y su estructura cristalina a temperatura corporal (Kasikci & Bagdatlioglu, 2016; Olthof et al., 2000), por ello, el uso de sistemas de extracción binarios como la mezcla de etanol-agua permite tener una mayor interacción solvente-soluto y mejorar la recuperación de este tipo de compuestos fenólicos. El rendimiento de K3G extraído con W fue de $0.19\text{-}0.91\text{ g Kg}^{-1}$, siendo el más alto el obtenido con R 1:20. De forma similar a los otros flavonoles, el EtOH mejoró la recuperación de este compuesto, con la mayor concentración (0.25 g Kg^{-1}) en R 1:40 (Figura 3.5-b).

Considerando el total de los compuestos identificados y cuantificados de GS, los TPC_{HPLC} obtenidos para los extractos W aumentaron con el aumento de R, determinándose la mayor concentración con R 1:40 (0.55 g Kg^{-1}), seguido de 1:30 (0.35 g Kg^{-1}), 1:20 (0.31 g Kg^{-1}), y 1:10 (0.23 g Kg^{-1}). Los valores más altos de TPC_{HPLC} se obtuvieron con EtOH, 1.07 , 0.71 , 0.69 y 0.57 g Kg^{-1} , para 1:40, 1:30, 1:20 y 1:10, respectivamente. Los TPC_{HPLC} extraídos con EtOH 1:40 fueron superiores a los reportados para la pulpa de manzana 0.93 g Kg^{-1} , mostrando el potencial que posee GS como materia prima de compuestos bioactivos con potencial antioxidante, favoreciendo el valor agregado a este tipo de residuos que actualmente no se aprovechan en su totalidad ya que solo una parte se destina a la obtención de pectina o alimento para producción animal (Cano-Lamadrid & Artés-Hernández, 2021; Güzel & Akpınar, 2019).

Tabla 3.10. Coeficientes de correlación para las variables estudiadas de extractos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

	(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	Q3G	QPN	QHSX	K3G	TPC _{HPLC}	TPC	CA
(+)CTQN	--										
PACB2	NS	--									
(-)EPQN	NS	0.74***	--								
PACT	NS	NS	NS	--							
Q3G	NS	NS	NS	0.63*	--						
QPN	NS	-0.53*	NS	NS	0.76***	--					
QHSX	NS	NS	NS	0.66**	0.92***	0.72**	--				
K3G	NS	-0.5*	NS	NS	0.79***	0.68**	0.92***	--			
TPC _{HPLC}	NS	NS	NS	0.68**	0.98***	0.64**	0.91***	0.76***	--		
TPC	NS	NS	NS	0.67**	0.98***	0.72**	0.95***	0.82***	0.95***	--	
CA	NS	NS	NS	NS	0.85***	0.57**	0.63**	0.49*	0.87***	0.74**	--

(+)CTQN: catequina, PACB2: procianidina B2, (-)EPQN: epicatequina, PACT: procianidina tetramémero, Q3G: quercetina-3-O-glucurónido, QPN: quercetina pentóxido, QHSX: quercetina: hexósido, K3G: kaempferol-3-O-glucurónido, TPC_{HPLC}: compuestos fenólicos totales analizados por HPLC, TPC: contenido total de compuestos fenólicos, CA: Capacidad antioxidante por DPPH*. NS: no significativo, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Dentro de este trabajo de tesis, uno de los principales objetivos fue estudiar la influencia de la relación de extracción sólido-líquido, la temperatura de extracción, el uso de dos solventes ‘verdes’ (agua 100% y etanol 80%) y el tiempo de extracción en la obtención de compuestos fenólicos a partir de 2 matrices vegetales de descarte como lo son los residuos del acondicionamiento industrial de frutilla (RF) y manzana ‘Granny Smith’ (GS). Ya que es fundamental para el diseño de procesos de extracción a escala industrial conocer los fenómenos más influyentes en la extracción de compuestos fenólicos (Winitorn et al., 2008).

3.4. Extracción por maceración de subproductos de frutilla y cáscara de manzana

3.4.1. Extracción de compuestos fenólicos por maceración de subproductos de frutilla (RF)

En la recuperación de compuestos fenólicos a partir de RF empleando la maceración como tecnología de extracción, la variación e interacción de factores como el solvente de extracción, la temperatura, la relación y tiempo de extracción, afectaron significativamente ($p \leq 0.001$) los rendimientos de TPC (Tabla 3.11). Como se mencionó anteriormente, la similitud de las tendencias de las curvas de extracción de compuestos fenólicos y variación de la capacidad antioxidante con las curvas de sorción planteadas en el modelo de Peleg, hacen que este modelo se pueda emplear para describir el proceso de obtención de metabolitos secundarios a partir de matrices vegetales, así como también se ha reportado el excelente ajuste que presentan los modelos empíricos para modelar la extracción de compuestos fenólicos (Bucić-Kojić et al., 2007; Chan et al., 2014; Gerke et al., 2018).

Tabla 3.11. ANOVA multifactorial para el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y la capacidad antioxidante (CA) de los extractos de residuos agroindustriales de frutilla obtenidos por maceración (RF).

Fuente de variación	Suma de cuadrados		
	GL	TPC	CA
S	1	1699.1***	0.3779***
T	1	3622.11***	0.00014**
S:L	2	35.7537***	0.00856***
tm	12	4733.72***	0.01256***
St.T	1	801.633***	7.7003E-7 ^{ns}
St.S:L	2	18.5432***	0.0049***
St.tm	12	931.442***	0.0076***
T.S:L	2	54.1174***	0.0051***
T.tm	12	42.2342***	0.00027 ^{ns}
S:L.tm	24	59.955***	0.00113***
St.T.S:L	2	319.822***	0.00652***
St.T.tm	12	95.9891***	0.00025 ^{ns}
St.S:L.tm	24	45.0234***	0.00062 ^{ns}
T.S:L.tm	24	21.8934***	0.00098***
Residuos	180	63.684	0.0030
Total	311	27846.5	0.4297

S: Solvente, T: Temperatura de extracción, S:L: Relación de extracción, tm: Tiempo de extracción, GL: Grados de libertad. TPC: contenido de compuestos fenólicos totales, CA: Capacidad antioxidante por DPPH, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: $p > 0.05$.

3.4.1.1. Modelado de la cinética de extracción por maceración de compuestos fenólicos de RF

En la tabla 3.12 se muestran los resultados obtenidos luego de aplicar la ecuación 2.2 para el modelo de Peleg modificado (MI), y la ecuación 2.3 para el modelado de extracción empírico (MII), sobre los datos experimentales obtenidos. Los valores de las distintas constantes corresponden al efecto de la temperatura de extracción (20-70°C), el uso de 2 tipos de solventes (agua y etanol 80%) y tres relaciones de extracción (1:20, 1:30 y 1:40 p/v), sobre la velocidad máxima de extracción, como a su vez sobre los rendimientos máximos de extracción para la obtención de compuestos fenólicos a partir de subproductos del acondicionamiento industrial de frutilla (RF).

La Figura 3.6 (a-b) ilustran la variación en el rendimiento de extracción en función del tiempo, en la extracción de compuestos fenólicos a partir del subproducto agroindustrial de frutilla (RF). Los valores de las distintas constantes cinéticas corresponden al efecto de la temperatura de extracción, el tipo de disolvente y la relación de extracción sobre la velocidad máxima de extracción (K_1 para MI; K_w y K_d para MII), así como sobre los rendimientos máximos de extracción para la obtención de compuestos fenólicos de frutilla (RF) (K_2 para MI; C_d+C_w para MII). La Figura 3.6 muestra que la velocidad de extracción es alta hasta los 30 min, luego la velocidad de extracción se ralentiza, hasta un valor constante cuando se obtiene el equilibrio en las concentraciones soluto-disolvente (Chan et al., 2014). El MI para los extractos de RF, mostró un buen ajuste del modelo con respecto a los datos experimentales (R^2 -Adj 0.8881- 0.9881; RMSE 0.4179- 0.9470) y para el modelo empírico (MII) (R^2 -Adj 0.9044-0.9936; RMSE 0.2499-0.7548). La temperatura, la relación de extracción y el tipo de solvente tuvieron un impacto significativo en los parámetros cinéticos evaluados. Para los extractos con W a 20°C, la relación de extracción 1:30 p/v presentó la constante de velocidad más alta (K_1 : 1.01 min⁻¹), así como la constante de capacidad máxima de extracción (K_2 : 14.02g AGE Kg⁻¹) (Modelo de Peleg MI). Para 20°C en los extractos con agua 100% (W) los rendimientos aumentan en función del tiempo, pero no siguen un aumento lineal respecto a la relación de extracción, viendo que para la relación 1:30 se tienen los mayores rendimientos (13.54 g AGE Kg⁻¹RF) además los rendimientos para las 3 relaciones de extracción se estabilizan a partir del minuto 90-120 al no observar variaciones significativas en el contenido de fenoles totales. Al realizar la extracción con 70°C se observa una influencia positiva en las constantes de las cinéticas de extracción para todas las relaciones de extracción estudiadas, principalmente en la extracción con S:L 1:40 donde mostró una K_1 de 8.6 min⁻¹ y una constante de capacidad K_2 de 15 g AGE Kg⁻¹siendo un 6.5% mayor en comparación con los extractos obtenidos a 20°C. Similar a lo reportado por (Bucić-Kojić et al., 2007) para la cinética de extracción de compuestos fenólicos a partir de semillas de uva usando etanol al 50% y S:L 1:40, donde

emplearon el modelo de Peleg para describir el fenómeno de extracción (R^2 -Adj 0.9944-0.9985; RMSE 0.3841- 1.7490). Para el modelo empírico, propuesto por So & Macdonald (1986) en la etapa de lavado (C_w) se obtuvieron las mayores velocidades de extracción (K_w) en comparación con la etapa de difusión (C_d y K_d). No obstante, para el caso de la extracción con W a 20°C, 1:30 la concentración de TPC en la etapa de difusión C_d (28.46 g AGE Kg⁻¹) fue mayor que la concentración en la etapa de lavado C_w (10.13 g AGE Kg⁻¹). A pesar de tener mayor coeficiente de velocidad, el proceso de difusión es un proceso lento que según estos resultados es independiente de la relación de extracción, ya que lo mismo ocurrió con la extracción a 70°C para las relaciones de extracción 1:20 y 1:30, no obstante, con 1:40 C_w (10.13 g AGE Kg⁻¹) fue mayor a C_d (4.84 g AGE Kg⁻¹). Aunque todos los factores estudiados y sus interacciones mostraron una influencia altamente significativa sobre los TPC, el tiempo y la temperatura son las variables que más influyen en este proceso de extracción (mayor suma de cuadrados, Tabla 3.11). Además, se puede observar que, los rendimientos de TPC en las 3 relaciones de extracción no presentan cambios significativos a partir de los 90-120 min (Figura 3.6 a).

Los ensayos de extracción realizados a 70°C, mejoraron las constantes cinéticas de extracción MI para todas las relaciones de extracción estudiadas, principalmente para S:L 1:40 con W, con un K_1 de 8.6 g min⁻¹ (835% superior al K_1 a 20°C), y un K_2 (constante de capacidad) de 15 g AGE Kg⁻¹, siendo un 41% superior al K_2 a 20°C. Estos resultados coinciden con lo reportado por Bucić-Kojić et al. (2007) para la extracción de compuestos fenólicos de semillas de uva utilizando etanol al 50% y S:L 1:40, empleando el modelo de Peleg (MI) para describir el fenómeno de extracción, con un fuerte ajuste (valores R^2 -Adj 0,9944-0,9985; valores RMSE 0,3841-1,7490). Además, los compuestos fenólicos extraídos de la RF con W a 70°C y S:L 1:40 también se ajustaron al modelo empírico (MII) (R^2 -Adj 0.9044- 0.9839; RMSE 0.3178- 0.6734), incluso mejor que al MI. Las extracciones con agua a 70°C, aumentaron la tasa de extracción hasta 20 veces para S:L 1:40. La mayor temperatura de extracción facilita el proceso de difusión porque la viscosidad del disolvente de extracción es menor, así como permite la ruptura de algunas interacciones entre los compuestos fenólicos y la matriz vegetal (Huaman-Castilla et al., 2019).

Tabla 3.12. Valores de las constantes de los modelos de Peleg (MI) y del modelo empírico (MII) para la cinética de extracción de compuestos fenólicos totales a partir de los residuos agroindustriales de frutilla obtenidos por maceración.

S	T (°C)	S:L	MI				MII					
			K1 _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹ min ⁻¹)	K2 _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹)	R ² -Adj	RMSE	Cw _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹)	Kw _{TPC} (min ⁻¹)	Cd _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹)	Kd _{TPC} (min ⁻¹)	R ² -Adj	RMSE
W	20	1:20	0.8691	12.8257	0.96	0.85	11.0407	0.0657	0.0020	0.0002	0.96	0.44
	20	1:30	1.0125	14.0189	0.93	0.95	10.1339	0.0986	28.4624	0.0005	0.94	0.60
	20	1:40	0.9183	10.0353	0.91	0.75	3.2554	0.2856	7.2894	0.0226	0.98	0.32
	70	1:20	2.3307	14.9107	0.94	0.82	3.7829	0.2453	9.8534	0.0945	0.94	0.46
	70	1:30	1.7958	14.3222	0.99	0.47	3.4779	2.9898	9.9474	0.0569	0.91	0.67
	70	1:40	8.5837	15.0048	0.89	0.42	10.1357	5.7300	4.8416	0.0607	0.91	0.31
EtOH	20	1:20	3.0123	22.5264	0.96	1.13	11.4993	0.2502	12.0642	0.0190	0.997	0.25
	20	1:30	3.2287	25.1281	0.97	1.23	14.8326	0.1825	12.0816	0.0131	0.99	0.51
	20	1:40	4.2192	27.1252	0.92	1.62	13.9484	0.3124	14.6918	0.0199	0.98	0.56
	70	1:20	6.0757	37.4222	0.98	0.99	29.4680	0.1599	9.9901	0.0061	0.99	0.61
	70	1:30	5.3919	37.6701	0.99	1.28	25.8773	0.1657	13.9826	0.0103	0.98	0.75
	70	1:40	4.9779	36.3728	0.99	1.04	25.9529	0.1712	11.8476	0.0148	0.99	0.44

S: Solvente de extracción. W: agua 100%. EtOH: Etanol 80%. T: Temperatura (°C). S:L : Relación de extracción sólido-líquido. K1: Constante de velocidad del modelo de Peleg. K2: Constante de capacidad del modelo de Peleg. Cw: Constante de capacidad en la etapa de lavado. Kw: Constante de velocidad en la etapa de lavado. Cd: Constante de capacidad en la etapa de difusión. Kd: Constante de velocidad en la etapa de difusión. R²-Adj: Coeficiente de correlación ajustado. RMSE: Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

Para las extracciones realizadas utilizando etanol (EtOH) tanto a 20°C como a 70°C, las constantes de velocidad K1 mostraron un aumento de hasta 4.6 veces para S:L 1:40 a 20°C en comparación con las determinadas para extractos de agua (W) con S:L 1:40 a la misma temperatura (MI, Tabla 3.12). Del mismo modo, la constante de capacidad (K2) aumentó, siendo mayor para la extracción con EtOH a 70°C (36.37 – 37.6 g AGE kg⁻¹), no siendo afectada significativamente por las relaciones de extracción. Este resultado difiere del comunicado por Charpe & Rathod (2016) para la extracción de wedelolactona (metabolito característico de dos géneros *Eclipta* y *Wedelia*, de la familia *Asteraceae*) utilizando metanol, reportando la mayor tasa de extracción (K1) y capacidad (K2) a una relación de extracción de 1:20 y 30°C. En el caso de la MII aplicada a extracciones con EtOH a ambas temperaturas, la etapa de lavado presentó mayores tasas de extracción (Kw) que la etapa de difusión (Kd), como se determinó para las extracciones con W. Entre las extracciones de EtOH a 20°C, la relación de extracción 1:40 produjo las velocidades de extracción más elevadas (Kw 0.3124 min⁻¹; Kd 0.0199 min⁻¹). No obstante, las constantes de capacidad (Cw y Cd) a 20°C fueron similares para cualquier relación de extracción, y la extracción en la relación S:L 1:40 tuvo la mayor concentración de equilibrio (Ce = Cw+Cd =28.6402 g AGE Kg⁻¹). Las constantes de velocidad cinética de la MII no aumentaron con la temperatura, pero la constante de capacidad (Cw) se incrementó hasta en un 156% para

S:L 1:20. Por lo demás, no hubo un aumento significativo del Cd, debido al aumento de la temperatura de extracción de 20°C a 70°C. El mayor Ce se alcanzó para las relaciones de extracción 1:30 y 1:20 (39.86 y 39.46 g AGE Kg⁻¹, respectivamente), produciéndose la mayor concentración en la etapa de lavado. El uso de EtOH a 70°C mejoró significativamente los rendimientos hasta en un 62.4% en comparación con la extracción W para la relación 1:20 a 20°C. El aumento de la temperatura de extracción incrementó significativamente los rendimientos de extracción en un 17.4% para 1:20, un 9.2% para 1:30 y un 31.9% para 1:40. Varios estudios señalan que un aumento de la temperatura de extracción favorece la obtención de compuestos fenólicos, ya que la mayoría de ellos son termoestables a temperaturas inferiores a 100°C (Setyaningsih et al., 2016).

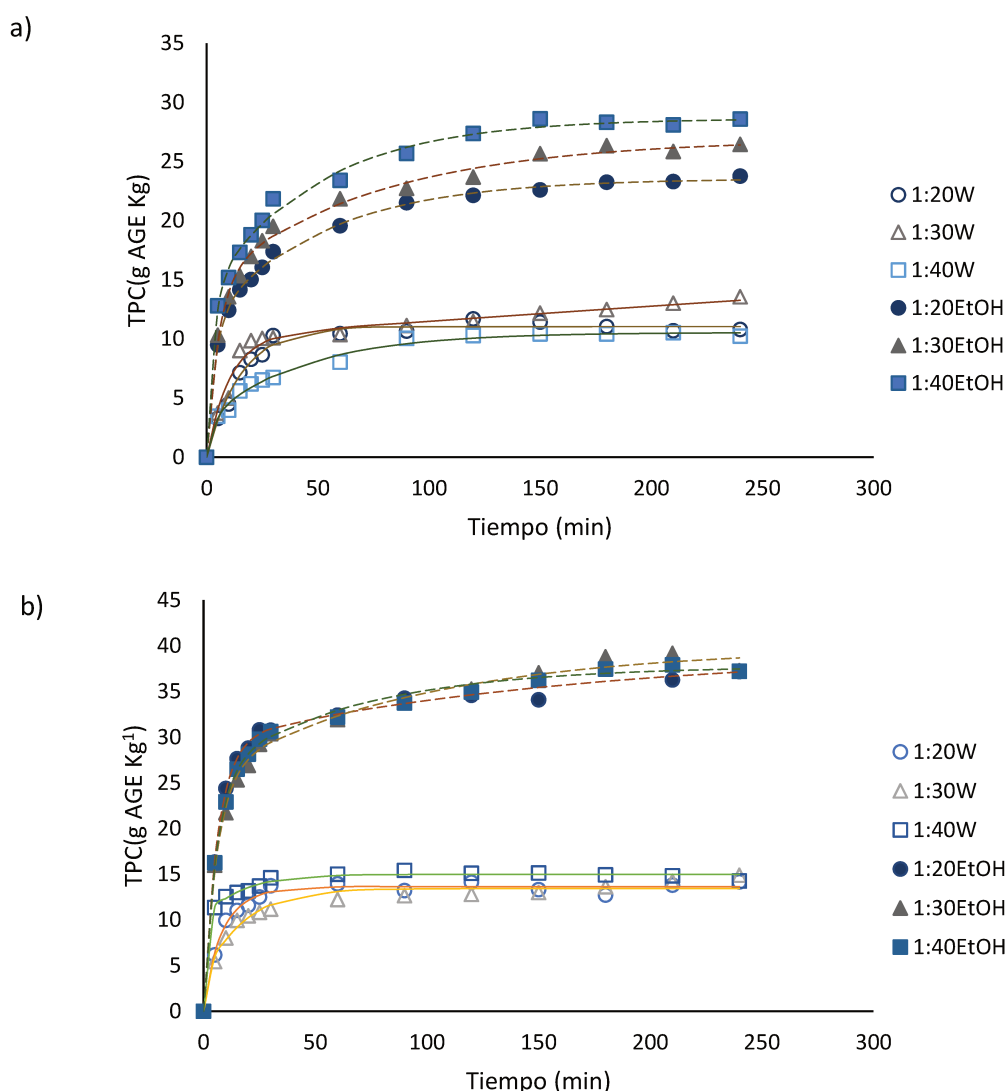


Figura 3.6. Cinética de extracción de compuestos fenólicos (TPC) a partir de residuos agroindustriales de frutilla para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20 °C; (b) a 70 °C.

Los puntos representan los valores experimentales y las líneas el modelo empírico (MII).

Por otro lado, aportar energía térmica al sistema de extracción facilita la ruptura de la estructura de la matriz vegetal, favoreciendo en consecuencia la ruptura de las fuerzas intermoleculares y de algunos enlaces, aumentando así la extractabilidad de gran parte de los compuestos fenólicos (Harbourne et al., 2013; Jurinjak Tušek et al., 2016). Los rendimientos de extracción utilizando EtOH, aumentaron con el incremento de la relación sólido-líquido, donde con 1:40 se obtuvo aproximadamente 28.5 g AGE Kg⁻¹, seguido de 1:30 con 26.4 g AGE Kg⁻¹ y 1:20 con 11.7 g AGE Kg⁻¹. Tras 90 minutos de extracción, los rendimientos permanecen constantes para cualquier relación de extracción (Figura 3.6). El aumento del rendimiento con la relación de extracción se debe al gradiente de concentración, la fuerza motriz en la transferencia de masa, por lo que el aumento de la relación de extracción aumenta la velocidad de difusión de los compuestos fenólicos en el solvente de extracción y evita la saturación temprana del solvente de extracción (Safdar et al., 2017; Sant'Anna et al., 2012). Los rendimientos de extracción obtenidos para la extracción de compuestos fenólicos a partir de subproductos agroindustriales de frutilla, en todos los casos estudiados, fueron superiores a los reportados por Guiné et al. (2020) para frutos de frutilla (2.7 g AGE Kg⁻¹), extraídos con acetona:agua 60:40 y una relación de extracción de 1:20 a temperatura ambiente. Por lo tanto, el subproducto de frutilla, formado por el sépalo, el pedúnculo y los restos del fruto, tiene un contenido potencialmente mayor de compuestos fenólicos que el fruto entero, incluso cuando se obtiene con disolventes próticos polares verdes. El contenido de compuestos fenólicos en los ensayos de extracción con EtOH a 70°C fue similar al extracto foliar de frutilla 'Alba' obtenido con metanol acidificado por maceración durante una hora (38.22 g AGE Kg⁻¹) (Fotirić Akšić et al., 2019). Estas diferencias mostraron la gran variabilidad entre las diferentes partes de la planta de frutilla, y que la técnica de extracción y las variables del proceso tienen un impacto significativo en los rendimientos de extracción.

3.4.1.2. Modelado de la capacidad antioxidante de los extractos de RF obtenidos por maceración

Los compuestos antioxidantes, se pueden definir como aquellas sustancias, presentes en los alimentos en concentraciones bajas, las cuales tienen la capacidad de retrasar, inhibir o controlar las reacciones de la oxidación de los demás componentes de la matriz alimentaria, de esta forma prologando su vida útil (Zeb, 2020). Los subproductos de la industria de frutas y vegetales son una interesante fuente de compuestos antioxidantes naturales, promoviendo así su revalorización de una forma sostenible (Barba et al., 2020).

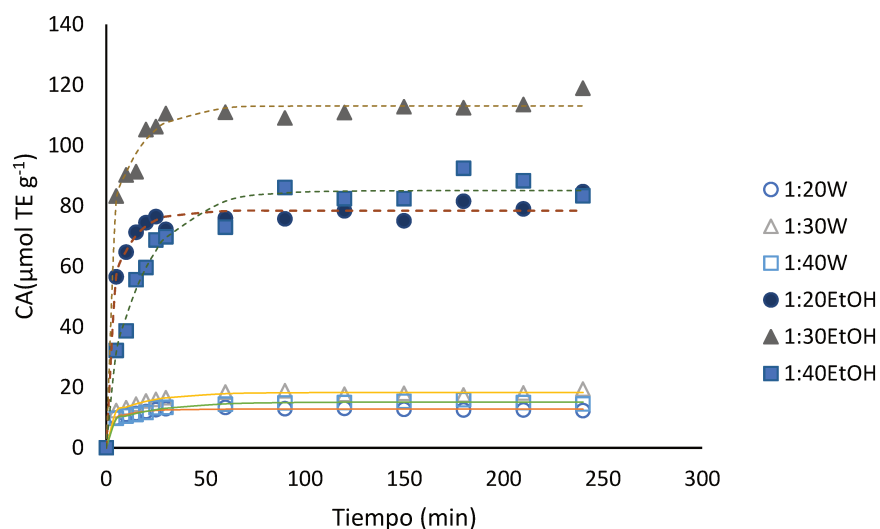
La variación de la capacidad antioxidante de los distintos extractos obtenidos en el tiempo permitió ajustar los datos a los modelos propuestos en la tabla 3.13. Para el modelo de Peleg (Ecuación 2.2) y el modelo empírico (Ecuación 2.3). De acuerdo con la tabla 3.11,

la variación de los diferentes factores estudiados afectó significativamente ($p \leq 0.001$), no obstante, los distintos solventes mostraron una mayor ponderación en el análisis de varianza. En los extractos obtenidos con W, el MI (R^2 -Adj 0.6927- 0.9169) (RMSE 0.3848-1.1786), se determinó que a 20°C la extracción con S:L 1:40 obtuvo la menor velocidad de variación en la capacidad antioxidante por DPPH ($4.5936 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), sin embargo, mostró la mayor capacidad antioxidante en el equilibrio (K_2 $14.8574 \mu\text{mol TE g}^{-1}$). No obstante, al aumentar la temperatura de extracción, se aumentó la K_1 en los extractos con S:L 1:30 y 1:40 (8.8800 - $7.7431 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) siendo 37 y 69% superiores en comparación con la extracción a 20°C.

En la Figura 3.7, se evidenció que CA no varía significativamente luego de 25-30 min de extracción. Los extractos de RF obtenidos a 20°C con W mostraron que con la S:L 1:30 se obtuvo la mayor CA con $19.4 \mu\text{mol TE/g}$, seguido por los extractos de 1:40 ($15.9 \mu\text{mol TE g}^{-1}$), y por último, los extractos con 1:20 ($13 \mu\text{mol TE g}^{-1}$). Los extractos realizados a 70°C y 1:30 mostraron la mayor CA en el equilibrio ($20.4149 \mu\text{mol TE g}^{-1}$). El MII para W mostró mejores coeficientes de ajuste (R^2 -Adj 0.8867- 0.9480) (RMSE 0.2964- 0.5960) respecto a MI, por otro lado, se puede observar que para la extracción a 20°C y las tres relaciones de extracción estudiadas, la constante $C_w > C_d$, indicando así, que en la etapa de lavado se tienen las mayores capacidades antioxidantes, donde la velocidad de variación de esa capacidad antioxidante fue mayor en el extracto de 1:30 (K_w 2.5646 min^{-1}). No obstante, el aumento de la temperatura a 70°C disminuyó las constantes de velocidad K_w y K_d , siendo mayor en la extracción con S:L 1:40 (K_w 0.5855 - K_d 0.0496 min^{-1}), siendo K_w hasta 4 veces menor que los extractos obtenidos con W a 20°C. Sin embargo, la extracción a 70°C permitió una mayor capacidad antioxidante donde el extracto de 1:30 obtuvo la mayor CA en el equilibrio ($22.7398 \mu\text{mol TE g}^{-1}$)

El uso de EtOH a 20°C mejoró significativamente la CA de los extractos, de forma similar a lo ocurrido con TPC, aunque la extracción a 1:40 fue la que presentó los mayores rendimientos de extracción de TPC, mientras que los extractos a 1:30 mostraron la CA más alta obtenida para todos los sistemas de extracción estudiados ($118 \mu\text{mol TE g}^{-1}$). Para EtOH y S:L 1:30 a 20°C, la constante de velocidad K_1 de Peleg fue 8.4 veces superior a la obtenida con W a 20°C. La constante de capacidad K_2 fue también 6.2 y 5.6 veces superior a los valores determinados para los extractos acuosos 1:30 y 1:40 a 20 y 70°C, respectivamente (Tabla 3.13). En cuanto a la MII con EtOH, se produjo un aumento significativo de las constantes de capacidad en comparación con los extractos W, con el valor más alto de CA para el extracto 1:30 a 20°C ($113.0732 \mu\text{mol TE g}^{-1}$), un 397% superior al extracto W con 1:30 a 70°C ($22.7398 \mu\text{mol TE g}^{-1}$).

a)



b)

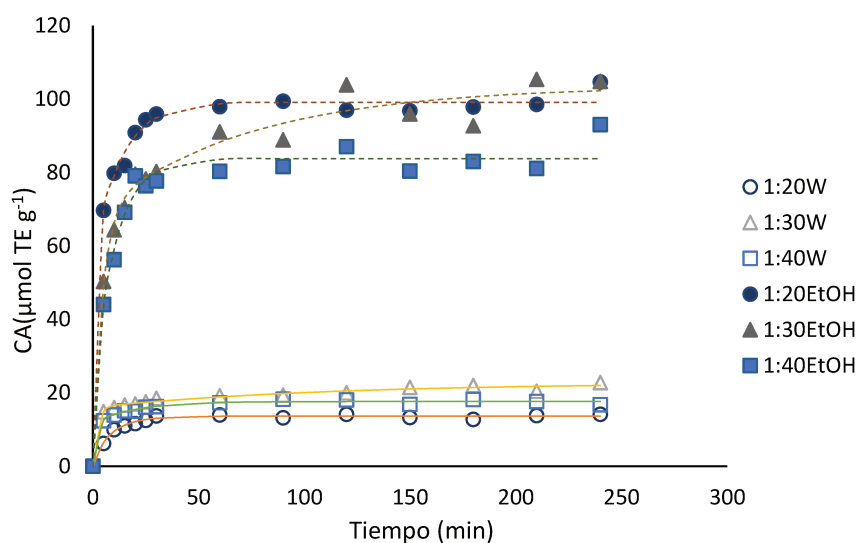


Figura 3.7. Variación de la capacidad antioxidante (CA) de los extractos obtenidos a partir de los residuos agroindustriales de frutilla para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20°C; (b) a 70°C.

Los puntos representan los valores experimentales y las líneas el modelo empírico (MII).

Además, la velocidad de cambio de la capacidad antioxidante fue siempre superior en la fase de lavado ($K_w > K_d$). Resultados similares fueron reportados por Carciochi et al. (2018) para los subproductos de la industria cervecera, en las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos (72% de etanol y S:L de 1:30 a 80°C), con el modelo de Peleg (R^2 0.993). La CA mostrada por los extractos de RF con W fue similar a la reportada para diferentes genotipos de madroño (*Arbutus unedo*) (fruta altamente

consumida en la dieta mediterránea) con 18.01-33.41 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (Colak, 2019), y con mayor actividad en los extractos obtenidos con EtOH. Estos resultados fueron similares a los reportados por Buřičová et al. (2011) para hojas de fresa con 106.2 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ extraídas con agua a 98°C.

Tabla 3.13. Valores de las constantes del modelo de Peleg (MI) y del modelo empírico (MII) para la cinética de la CA de los extractos de RF.

S	T (°C)	S:L	MI				MII					
			K1 _{CA} ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$ min^{-1})	K2 _{CA} ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	R ² - adj	RMSE	Cw _{CA} ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	Kw _{CA} (min^{-1})	Cd _{CA} ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$)	Kd _{CA} (min^{-1})	R ² - Adj	RMSE
W	20	1:20	7.8956	12.9730	0.88	0.38	7.8298	1.6600	4.9643	0.0973	0.89	0.29
	20	1:30	6.5000	18.1952	0.87	0.75	103099	2.5646	7.9802	0.0502	0.93	0.49
	20	1:40	4.5936	14.8574	0.84	0.73	8.2237	1.8032	6.9094	0.0405	0.95	0.38
	70	1:20	7.4995	11.6996	0.70	0.55	7.7056	0.2861	10.4852	0.0020	0.94	0.46
	70	1:30	8.8800	20.4149	0.77	1.17	16.0428	0.4599	6.6970	0.0092	0.91	0.59
	70	1:40	7.7431	17.6521	0.92	0.54	11.7610	0.5855	5.8601	0.0496	0.91	0.43
EtOH	20	1:20	38.051	80.0518	0.91	2.46	43.2485	1.3922	35.1595	0.0967	0.87	2.71
	20	1:30	54.7177	113.833	0.87	3.57	68.5912	2.5408	44.4820	0.0693	0.90	3.00
	20	1:40	9.3092	89.308	0.95	3.87	16.3668	2.6641	68.7068	0.0495	0.94	3.95
	70	1:20	42.9954	100.606	0.94	2.51	55.0657	2.4936	44.0368	0.0783	0.93	2.16
	70	1:30	19.4346	98.9746	0.96	4.84	68.9280	0.2252	34.6759	0.0136	0.92	3.01
	70	1:40	17.7814	88.7594	0.95	4.03	17.9745	8.6000	65.7742	0.0975	0.89	3.62

S: Solvente de extracción. W: agua 100%. EtOH: Etanol 80%. T: Temperatura (°C). S:L : Relación de extracción sólido-líquido. K1: Constante de velocidad del modelo de Peleg. K2: Constante de capacidad del modelo de Peleg. Cw: Constante de capacidad en la etapa de lavado. Kw: Constante de velocidad en la etapa de lavado. Cd: Constante de capacidad en la etapa de difusión. Kd: Constante de velocidad en la etapa de difusión. R²-Adj: Coeficiente de correlación ajustado. RMSE: Raíz cuadrada del error medio.

3.4.1.3. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos por maceración de subproductos de frutillas

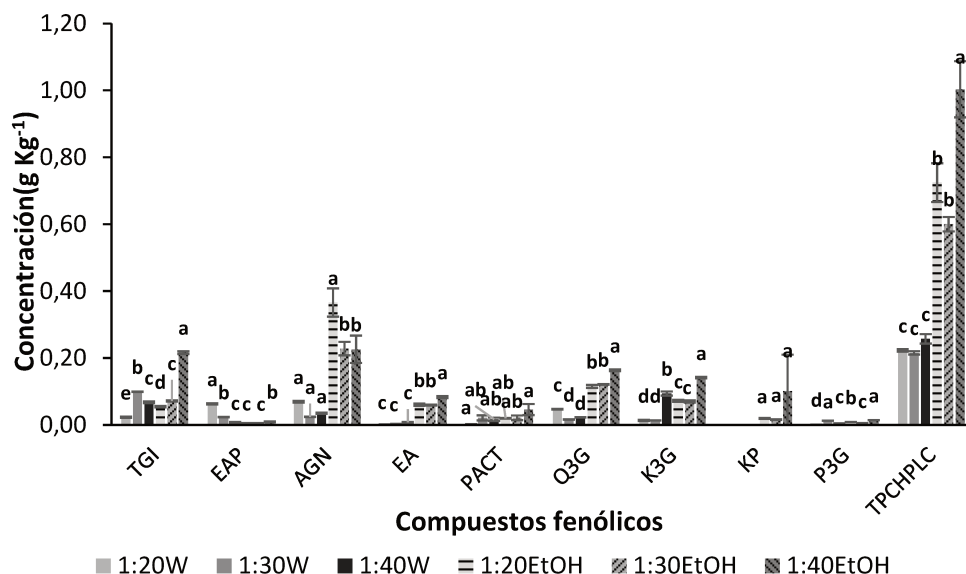
La Figura 3.8 muestra el perfil de compuestos fenólicos de los diferentes extractos obtenidos de RF. Para los extractos finales de cada condición de extracción estudiada se determinó el perfil y el contenido de compuestos fenólicos, donde se logró la identificación tentativa de los siguientes compuestos: Tetragaloil glucosa isómero (TGI), Ácido elágico pentóxido (EAP), Agrimoniin (AGN), Ácido elágico libre (EA), Procianidina tetramero (PACT), Quercetina-3-o-glucuronido (Q3G), Kaempferol-3-o-glucuronido (K3G), Kaempferol pentóxido (KP), Pelargonidin-3-o-glucuronido.

Los elagitaninos fueron la clase de compuestos fenólicos mayoritarios en los extractos de RF, para TGI la extracción a 20°C mostró que el uso de EtOH con S:L 1:40 logró la mayor recuperación de este compuesto con 0.212 g/Kg, seguido por la extracción con W a 1:30 con 0.09 g Kg⁻¹. No obstante, al aumentar la temperatura de extracción a 70°C aumentaron significativamente los rendimientos de extracción de este compuesto con

el solvente EtOH logrando el mayor contenido de TGI con S:L 1:40 (0.25 g Kg^{-1}), siendo superior a lo reportado por (Van de Velde et al., 2019a) para zarzamora con un contenido de TGI de 0.12 g Kg^{-1} . El compuesto EAP mostró la mayor recuperación con la extracción 1:40 a 70°C con EtOH con un contenido de 0.135 g Kg^{-1} , siendo hasta 3.6 veces mayor al contenido obtenido con W; 1:40 a 70°C . En estudios previos se ha reportado al compuesto AGN como compuestos mayoritario y taxonómico de las distintas partes de la planta de frutilla, donde su bioactividad ha despertado gran interés en el mercado de los nutraceuticos (Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010; Villamil-Galindo et al., 2020). Para la extracción de compuestos fenólicos por maceración de RF las condiciones de extracción que permitieron la mayor recuperación de AGN fue con EtOH 1:20 a 70°C con 0.487 g Kg^{-1} , seguido de la extracción a 20°C con esta misma relación de extracción (0.366 g Kg^{-1}) logrando un contenido superior a lo encontrado en trabajos previos en residuos de frutilla cv 'Camino Real' donde el AGN fue 0.386 g Kg^{-1} obtenido con metanol al 80% (Villamil-Galindo et al., 2021). De igual forma, para el ácido elágico libre (EA) los extractos con S:L 1:20 EtOH a 70°C presentaron un contenido de 0.106 g Kg^{-1} llegando a ser 53 veces superior a lo obtenido con la extracción con W; 1:20 a 20°C (0.002 g Kg^{-1}). Las *berries* son una buena fuente de elagitaninos y derivados del ácido elágico cuyo consumo se ha venido incrementando, gracias a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y prebióticas, ya que es un precursor de urolitin al ser metabolizado por la microbiota intestinal (Landete, 2011).

En RF también se encontraron taninos condensados como la PACT (Figura 3.8) donde el EtOH 1:40 mostró los mayores rendimientos a 20°C con 0.046 g Kg^{-1} seguido de la extracción a 70°C 0.035 g Kg^{-1} . Para el caso de los Flavonoles glicosilados presentes en RF, la glicosilación de estos compuestos los hace un poco más hidrofílicos, además que el uso de temperatura (70°C) mejoró su extracción, ya que con el uso de W; 1:40 a 70°C se obtuvo el mayor rendimiento de QPN con 0.249 g Kg^{-1} , siendo 51.8% superior al extracto obtenido con EtOH; 1:40 a 20°C . Para el Kaempferol la mayor recuperación se logró con el EtOH; 1:40 a 20°C , tanto para K3G (0.141 g Kg^{-1}) como para KP (0.102 g Kg^{-1}).

a)



b)

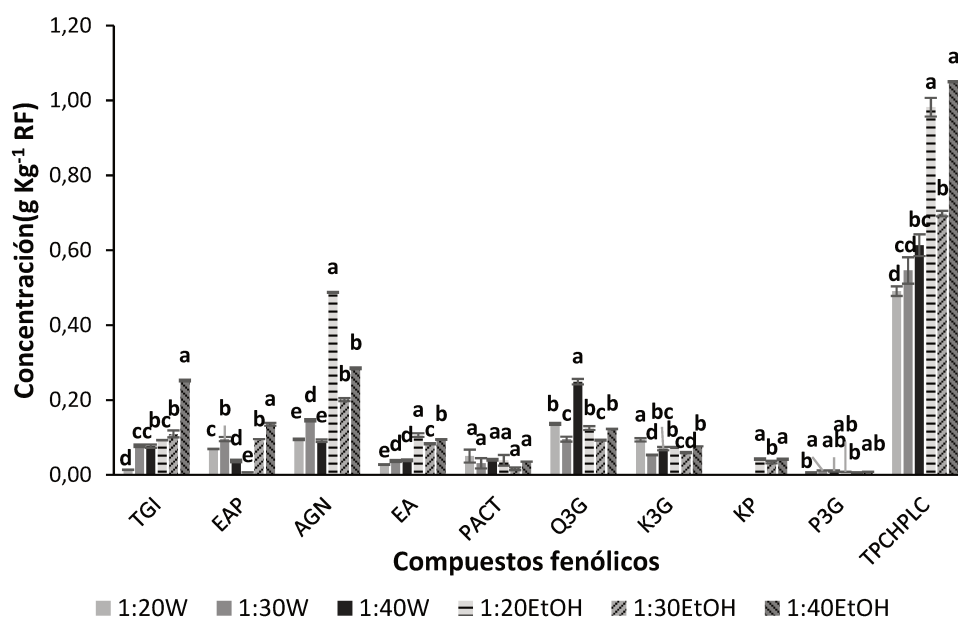


Figura 3.8. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos de residuos agroindustriales de frutilla. a) obtenidos a 20° C. b) obtenidos a 70° C.

TGI: Tetragalolil glucosa isómero. EAP: Ácido elágico pentóxido. AGN: Agrimoniin. EA: ácido elágico. PACT: Procianidina tetrámero. Q3G: Quercetina-3-o-glucuronido. K3G: Kaempferol-3-o-glucuronido. KP: Kaempferol pentóxido. P3G: Pelargonidin-3-o-glucuronido. TPC_{HPLC}: Compuestos fenólicos totales determinados por HPLC. 1.20W: Relación de extracción 1:20 con Agua 100%. 1.30W: Relación de extracción 1:30 con Agua 100%. 1.40W: Relación de extracción 1:40 con Agua 100%. 1.20EtOH: Relación de extracción 1:20 con Etanol 80%. 1.30EtOH: Relación de extracción 1:30 con Etanol 80%. 1.40EtOH: Relación de extracción 1:40 con Etanol 80%.

Dentro de los residuos agroindustriales de frutilla se encuentran restos de fruta, los cuales aportan principalmente antocianinas como la P3G, que es el compuesto mayoritario de la fruta entera (Van De Velde et al., 2013). En RF, la extracción con EtOH 20°C; 1:40 mostró el mayor contenido de P3G con 0.014 g Kg⁻¹, viéndose afectada por la temperatura

en estas mismas condiciones de extracción ya que a 70°C se obtuvo un contenido de 0.008 g Kg⁻¹. Al realizar la cuantificación de los compuestos fenólicos en RF, la mayor concentración se obtuvo con el uso de EtOH como solvente de extracción con una relación sólido:líquido de 1:40, donde no se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre TPC_{HPLC} a 20°C (1.004 g Kg⁻¹) y 70°C (1.05 g Kg⁻¹). Con esto se muestra que la naturaleza de la mayoría de los compuestos fenólicos solubles presentes en RF son de polaridad media alta, ya que fueron afines al solvente etanol 80%, el cual presenta un coeficiente de Reichard de 0.69 (Krygowski et al., 1985). Esto es de gran importancia ya que se deben tener en cuenta las interacciones soluto-soluto y soluto-solvente para poder controlar y optimizar el proceso de obtención de compuestos fenólicos.

3.4.2. Extracción de compuestos fenólicos por maceración a partir de cáscara de manzana (GS)

El uso de agua (W) y etanol al 80% (EtOH) como solventes de extracción, la variación de la temperatura de extracción entre 20 y 70°C, la variación de la relación de extracción y del tiempo de extracción a una agitación constante (400 RPM), mostraron un impacto altamente significativo ($p\leq 0.01$) en la recuperación de los compuestos fenólicos totales de GS (Tabla 3.14). Además de que cada factor estudiado y sus interacciones influyeron en los TPC, según la suma de cuadrados, el tipo de solvente tuvo una ponderación mayor en la obtención de compuestos fenólicos, usando la maceración como tecnología de extracción.

3.4.2.1. Modelado de la cinética de extracción de compuestos fenólicos por maceración de la cáscara de manzana

Respecto a la cinética de extracción de TPC a partir de la cáscara de manzana GS, la tabla 3.15 muestra los parámetros cinéticos determinados a partir de los modelos de Peleg (MI) y el modelo empírico (MII), donde se puede apreciar que ambos modelos tuvieron un buen ajuste con los datos experimentales obtenidos (R^2 -Adj 0.86- 0.99; RMSE 0.10- 1.86). Considerando el MI para los extractos de GS obtenidos a partir de W a 20°C, la relación de extracción 1:40 presentó tanto la velocidad de extracción K1 (0.4726 g AGE Kg⁻¹ min⁻¹), como la capacidad de extracción K2 (5.5922 g AGE Kg⁻¹) más alta. La Figura 3.9, muestra la extracción de compuestos fenólicos a partir de la cáscara de manzana 'Granny Smith', observándose que los rendimientos de extracción fueron aumentando con el tiempo de proceso, y donde se obtuvieron los mayores rendimientos con el uso de W a 20°C y la relación de extracción 1:40 (6.3 g AGE Kg⁻¹). Aumentando la temperatura de extracción a 70°C, ambas constantes de Peleg aumentaron, excepto K1 para S:L 1:30. A 70°C con W, la velocidad de extracción fue de 0.5189 min⁻¹, y la capacidad máxima de extracción (K2) fue 2.4 veces superior (13.5347 g GAE Kg⁻¹) a la obtenida a 20°C. El MII

mostró coeficientes de correlación más altos y valores de error cuadrático medio más bajos que el MI (Tabla 3.15). De forma similar a los resultados obtenidos para los extractos RF, la etapa de lavado presentó las mayores tasas de extracción Kw (0.0294-0.0961 min⁻¹) para W, y la temperatura de extracción de 70°C mejoró significativamente la tasa de extracción en la etapa de lavado (Kw) de 0.0323 min⁻¹ a 20°C a 0.0769 min⁻¹ a 70°C. La mayor concentración de equilibrio (Ce) se obtuvo para la extracción con S:L 1:40 a 20°C (15.133 g AGE kg⁻¹). Además, los extractos de GS obtenidos con W mostraron un mayor contenido de compuestos fenólicos que los reportados para manzanas rojas (1.25 g AGE Kg⁻¹) y amarillas (0.997 g AGE Kg⁻¹) (Nollet & Gutieerez-Urbe, 2017).

Tabla 3.14. ANOVA multifactorial para el contenido de fenoles totales (TPC) y la capacidad antioxidante (CA) de los extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith'.

Fuente de variación	Suma de cuadrados		
	GL	TPC	CA
S	1	1944.17***	0.0015***
T	1	128.59***	0.00015***
S:L	2	422.91***	0.0039***
tm	12	493.17***	0.0017***
St.T	1	3.002***	0.0031***
St.S:L	2	137.28***	0.00027***
St.tm	12	2.904**	0.000026***
T.S:L	2	12.137***	0.00031***
T.tm	12	14.93***	0.000048***
S:L.tm	24	14.91***	0.000087***
St.T.S:L	2	143.822***	0.00066***
St.T.tm	12	4.0644***	0.000013*
St.S:L.tm	24	16.793***	0.00005***
T.S:L.tm	24	8.6276***	0.000062***
Residues	180	16.18	0.00009
Total	311	3363.5	0.0092

S: Solvente, T: Temperatura de extracción, S:L: Relación de extracción, tm: Tiempo de extracción, GL: Grados de libertad, TPC: Contenido de fenoles totales, CA: Capacidad antioxidante, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: $p > 0.05$.

Las velocidades de extracción, según el modelo de Peleg (MI), para extracciones con etanol al 80% fueron hasta 12 veces superiores a las realizadas con agua (S:L 1:40) a 20°C. Se obtuvieron resultados similares para el modelo empírico (MII). La velocidad de extracción en la etapa de lavado (Kw) aumentó al utilizar EtOH. A su vez, la capacidad de extracción en la etapa de difusión (Cd) mostró diferencias entre las extracciones con agua y etanol. Para las extracciones con agua a ambas temperaturas, los valores oscilaron entre 0.001 y 6.9094 g AGE Kg⁻¹. En cambio, con etanol, Cd mostró un rango de capacidad de 2.4165 a 5.7257. Esta tendencia de Cw>Cd se mantuvo en general, excepto para los extractos a 70°C con la relación S:L de 1:40 utilizando etanol, donde Cw<Cd. Estos

resultados fueron similares a lo reportado por Xi et al. (2015) donde $C_w > C_d$ para la extracción de compuestos fenólicos del té verde utilizando etanol al 50%.

El EtOH mejoró significativamente los rendimientos de extracción a 20°C en comparación con los extractos de agua (W), con rendimientos de extracción de 8.4 y 8.6 g AGE Kg⁻¹, para relaciones S:L de 1:20 y 1:30, respectivamente ($p > 0.05$) (Figura 3.9a). La extracción con EtOH a una relación S:L de 1:40 y a 20°C mostró la mayor recuperación de compuestos fenólicos de la GS, con 10.9 g AGE Kg⁻¹. En general, los rendimientos de compuestos fenólicos totales (TPC) para EtOH se estabilizaron a partir de 60 min de extracción.

Las extracciones realizadas con W y S:L 1:30 a 70°C tuvieron resultados similares a las realizadas a 20°C ($p > 0.05$, Figura 3.9). Sin embargo, para las relaciones de extracción de 1:20 y 1:40, el aumento de la temperatura de extracción mejoró los rendimientos de TPC en un 15.3% y un 37.3%, respectivamente. Coincidiendo con lo comunicado por Galván D'Alessandro et al. (2014), quienes reportaron que para la extracción de compuestos fenólicos de residuos Aronia negra con agua, el uso de una temperatura de extracción de 70°C mejoró la recuperación de compuestos fenólicos por encima del 60%, obteniéndose el mayor contenido de TPC con EtOH a 70°C con 1:30 (12.2 g AGE Kg⁻¹) seguido por 1:40 con 11.3 g AGE Kg⁻¹.

Tabla 3.15. Valores de las constantes del modelo de Peleg (MI) y del modelo empírico (MII) para la cinética de extracción de TPC a partir de cascara de manzana 'Granny Smith'.

S	T (°C)	S:L	MI				MII					
			K1 _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹ min ⁻¹)	K2 _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹)	R ² -Adj	RMSE	Cw _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹)	Kw _{TPC} min ⁻¹	Cd _{TPC} (g AGE Kg ⁻¹)	Kd _{TPC} min ⁻¹	R ² -Adj	RMSE
W	20	1:20	0.1155	5.2870	0.96	0.36	3.1179	0.0323	0.7065	0.0337	0.97	0.17
	20	1:30	0.0858	3.1174	0.90	0.30	2.7858	0.0294	0.0010	0.0289	0.93	0.21
	20	1:40	0.4726	5.5922	0.86	0.49	4.1140	0.0736	3.7266	0.0034	0.96	0.27
	70	1:20	0.2255	5.9907	0.92	0.54	2.6054	0.0961	1.8988	0.0211	0.97	0.17
	70	1:30	0.0775	5.3093	0.96	0.77	2.5962	0.0454	0.1736	0.0444	0.94	0.18
	70	1:40	0.5189	13.5347	0.90	1.86	9.1592	0.0769	0.1181	0.0090	0.93	0.52
EtOH	20	1:20	2.6361	8.2542	0.87	0.40	5.7095	0.4123	2.8067	0.0229	0.91	0.29
	20	1:30	2.1041	8.2375	0.97	0.20	5.8943	0.2770	2.4909	0.0193	0.99	0.10
	20	1:40	5.7954	10.4729	0.95	0.39	8.0154	0.3963	2.7802	0.0287	0.96	0.18
	70	1:20	2.0219	9.4030	0.98	0.24	7.3731	0.2042	2.4165	0.0090	0.98	0.16
	70	1:30	2.3702	11.9405	0.98	0.37	7.4451	0.0714	3.9935	0.5477	0.92	0.43
	70	1:40	2.4274	10.8787	0.96	0.17	4.8745	0.4592	5.7257	0.0581	0.89	0.45

S: Solvente de extracción. W: agua 100%. EtOH: Etanol 80%. T: Temperatura (°C). S:L : Relación de extracción sólido-líquido. K1: Constante de velocidad del modelo de Peleg. K2: Constante de capacidad del modelo de Peleg. Cw: Constante de capacidad en la

etapa de lavado. Kw: Constante de velocidad en la etapa de lavado. Cd: Constante de capacidad en la etapa de difusión. Kd: Constante de velocidad en la etapa de difusión. R²-Adj: Coeficiente de correlación ajustado. RMSE: Raíz cuadrada del error medio.

Las diferencias en los rendimientos de extracción de TPC entre ambos solventes, en este caso, agua y etanol al 80%, se deben a que los compuestos fenólicos de las plantas varían en polaridad en función de su estructura química y de la matriz en la que están contenidos; por tanto, las interacciones moleculares solvente-solvente y solvente-soluto predominantes permitirán una mayor o menor extracción de estos compuestos (Waszkowiak et al., 2015). Aunque el agua y el etanol son disolventes próticos polares con capacidad de donar enlaces de hidrógeno, ambos presentan diferencias en sus parámetros solvatocrómicos de Reichard. Para el agua es de 1.00 y para el etanol al 80% es de 0.69 (Krygowski et al., 1985), lo que significa que las interacciones intermoleculares de la mezcla 80:20 etanol-agua tienen una mayor afinidad por la mayoría de los compuestos fenólicos que tienen una polaridad media (Huaman-Castilla et al., 2019). Los resultados obtenidos en la presente tesis fueron similares e incluso superiores a los reportados para orujo de manzana de sidra, con 9.12 g Kg⁻¹ de compuestos fenólicos obtenidos con ultrasonido a 34°C y 50% de etanol (Viot et al., 2010). La extracción con W a 20°C con relación de extracción 1:40 (6.3 g AGE Kg⁻¹) tuvo rendimientos similares a los extractos de orujo de manzana obtenidos con fluidos supercríticos utilizando etanol al 5% como cosolvente (6.08 g GAE Kg⁻¹) (Ferrentino et al., 2018); y los extraídos con agua a 40°C utilizando extracción asistida por ultrasonidos (5.55 g GAE Kg⁻¹) (Pingret et al., 2012), siendo la metodología de extracción con maceración utilizando agua a 20°C una alternativa competitiva de bajo costo, con proyección a escala industrial comparable a tecnologías alternativas que presentan mayores costos de instalación, uso y complejidad en la operación de los equipos de extracción.

3.4.2.2. Modelado de la capacidad antioxidante de los extractos de GS obtenidos por maceración

La Figura 3.9, muestra el comportamiento de la CA en los extractos obtenidos a partir de GS para la extracción con W y EtOH a 20°C (a) y 70°C (b). La capacidad antioxidante del extracto se vio altamente afectada ($p < 0.001$) por las variables de extracción estudiadas (Tabla 3.14). Los cambios en la capacidad antioxidante con el tiempo, mostrados por los diferentes extractos de GS obtenidos, se ajustan a los modelos MI y MII (Tabla 3.16). Las relaciones de extracción influyeron significativamente en la constante de velocidad cinética de MI en las extracciones con W a 20°C, variando de 2.0977 min⁻¹ para S:L 1:20 a 10.044 min⁻¹ para S:L 1:40, debido al amplio gradiente de concentración presentado en las extracciones a 1:40. La mayor capacidad antioxidante (15.2 µmol TE g⁻¹) a 20°C con W se obtuvo para el S:L 1:40, siendo un 27 % superior a la CA del extracto obtenido a 1:30 (11.07 µmol TE g⁻¹) y un 30 % superior a la del extracto a

1:20 ($10.5 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) (Figura 3.10). La extracción a 70°C aumentó significativamente la CA de los extractos W, con un incremento del 40% para el S:L 1:40 (de 15.02 a $24.9 \mu\text{mol TE g}^{-1}$), y del 27% para los extractos EtOH con S:L 1:30 (de 15.4 a $21.02 \mu\text{mol TE g}^{-1}$). Contrariamente al extracto RF, para la cual la extracción a 20°C mostró mejores propiedades antirradicalarias que los extractos a 70°C , quizás debido al mayor tiempo a temperaturas superiores a 60°C , que inicia procesos de degradación fenólica consistentes en autooxidación y epimerización de los compuestos de mayor peso molecular como los elagitaninos, muy presentes en la frutilla (De Taeye et al., 2014; Setyaningsih et al., 2016).

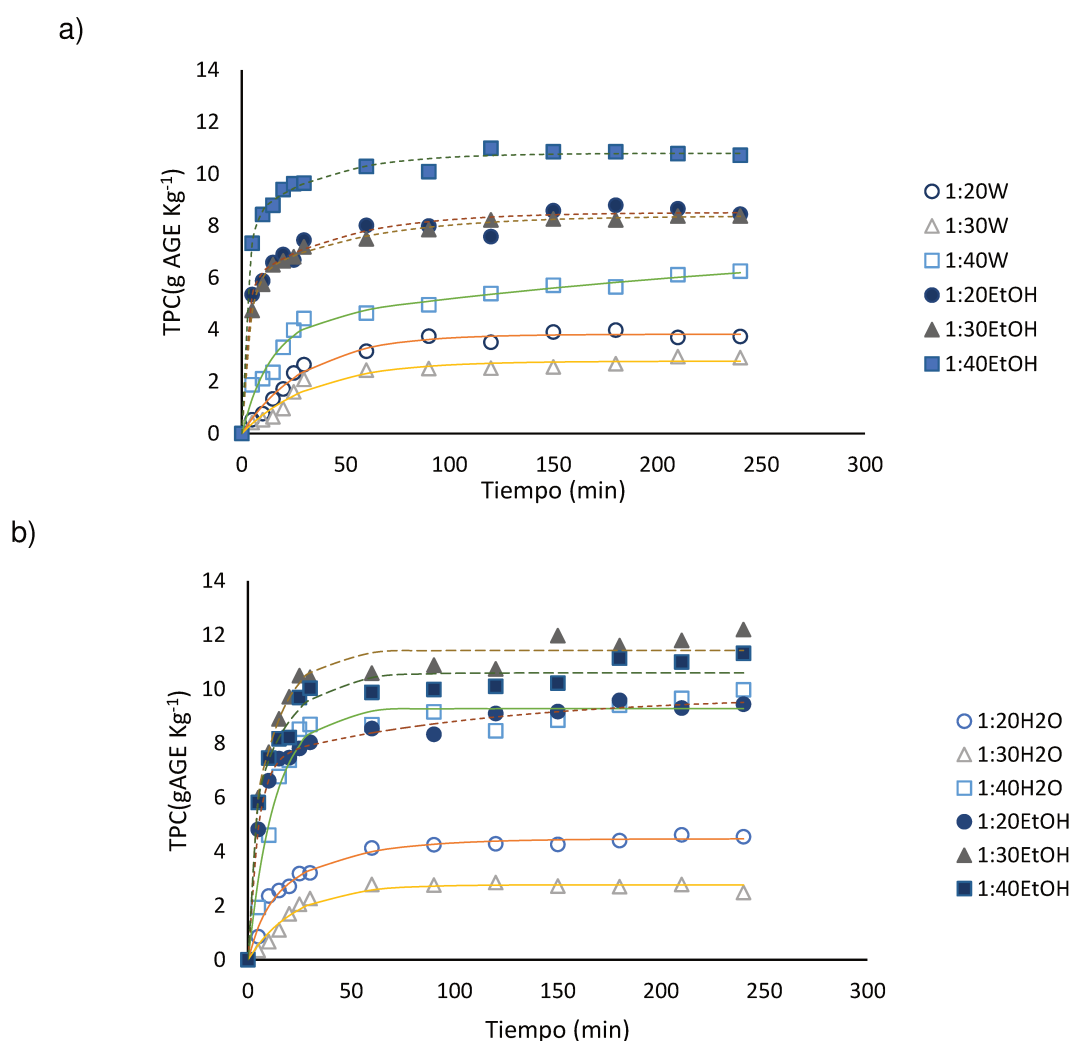


Figura 3.9. Cinética de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20°C ; (b) a 70°C . Los puntos representan los valores experimentales y las líneas el modelo empírico (MII).

En el caso de MII a CA, los extractos obtenidos a 70°C sólo aumentaron la constante de velocidad en la etapa de lavado (K_w) para ambos disolventes de extracción, alcanzando valores hasta 3.5 veces superiores para S:L 1:40 con agua (W). Además, K_w superó sistemáticamente a K_d para las condiciones estudiadas. Este hecho contrastó con C_d , que fue superior al obtenido en la fase de lavado (C_w) para la capacidad antioxidante. A pesar de que la fase de difusión es más lenta, la transferencia de compuestos fenólicos desde las células de la matriz permitió la extracción de metabolitos de menor peso molecular, como los ácidos fenólicos, que tienen una alta capacidad para neutralizar radicales libres (Castro-López et al., 2017). La CA de los extractos obtenidos con etanol al 80% se ajustaron al MI (R^2 -Adj 0.8657-0.9870; RMSE 0.3673- 0.8934) y MII (R^2 -Adj 0.9070- 0.9809; RMSE 0.3299- 0.9250). Los extractos EtOH obtenidos a 20°C, especialmente con S:L 1:40, aumentaron K_1 y K_2 del modelo de Peleg para CA en un 6.9 y 37.4%, respectivamente (Tabla 3.16). La extracción con etanol mejoró significativamente la CA, con S:L 1:40 a 20°C alcanzando una actividad antioxidante de 25.3 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$, siendo la mayor actividad antirradicalaria entre los extractos de 'Granny Smith' (GS) (Figura 3.10). Para las extracciones con EtOH a 20°C y las tres relaciones de extracción estudiadas, las constantes del MII C_w y K_w fueron superiores a C_d y K_w , lo que indica una mayor tasa de incremento de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir del tejido residual de la piel de manzana. La relación de extracción óptima para alcanzar la mayor CA en equilibrio es 1:40 con etanol a 20°C o agua a 70°C (Figura 3.10).

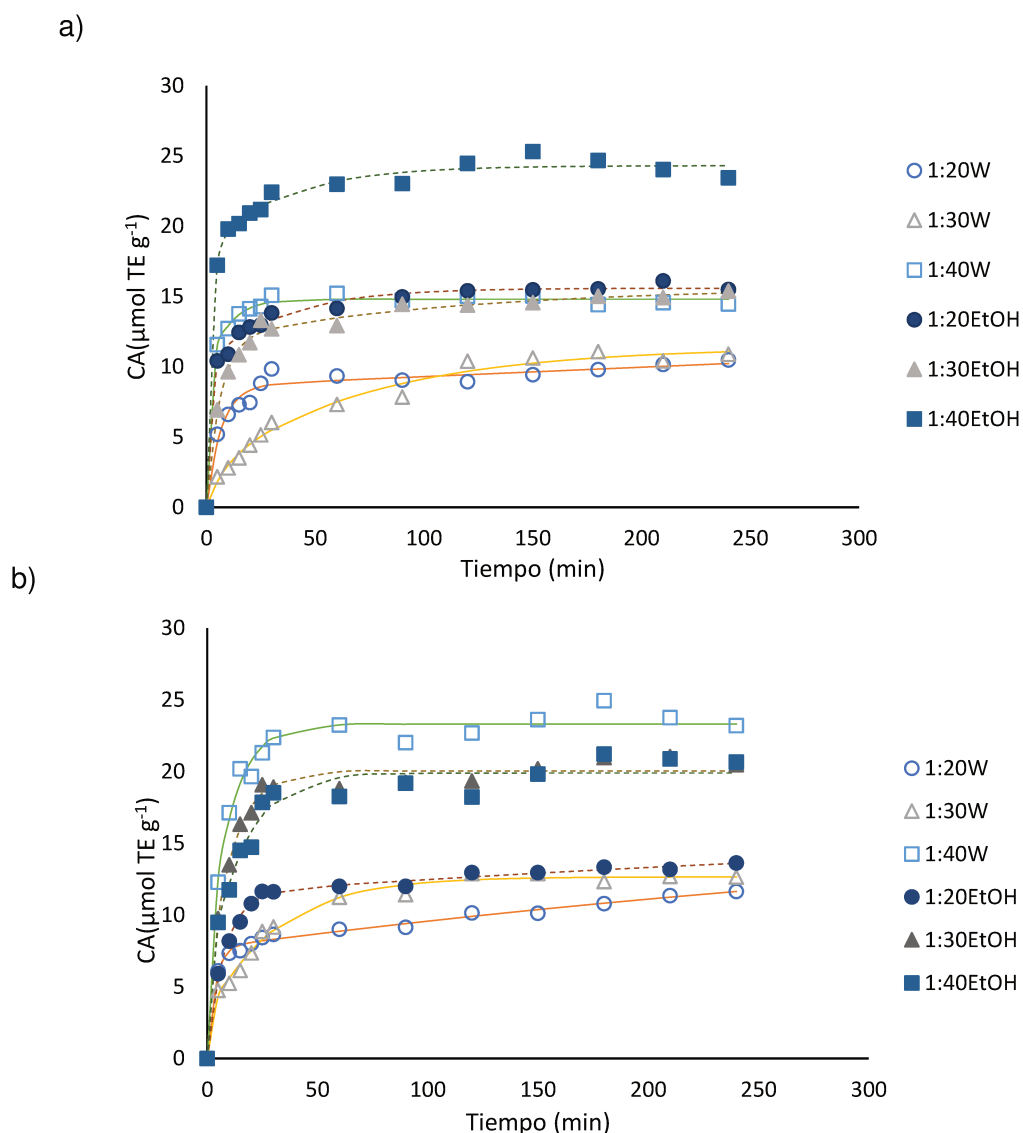


Figura 3.10. Variación de la capacidad antioxidante (CA) de los extractos obtenidos a partir de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ para diferentes relaciones de extracción, solventes (W: agua; EtOH: etanol 80%) y temperatura: (a) a 20°C; (b) a 70°C.

Los puntos representan los valores experimentales y las líneas el modelo empírico (MII).

Estos resultados indican cómo el proceso de extracción presenta una dependencia con la temperatura de extracción, donde no a todos los compuestos fenólicos favorece su extracción y estabilidad, ya que compuestos como el kaempferol presentan una degradación a partir de los 60°C (Setyaningsih et al., 2016). Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Muzolf-Panek et al. (2021), quienes modelaron la extracción de TPC y CA de extractos de té negro y verde mediante el modelo de Peleg ($R^2\text{-adj}$ 0.986) encontrando que temperaturas menores a 70°C favorecen la actividad antioxidante de los extractos. Los extractos de GS tuvieron una CA similar a la actividad antirradicalaria reportada para extractos metanólicos de cáscara de manzana ‘Golden Delicious’ 29.2 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (Vasile et al., 2021). Los extractos ricos en compuestos fenólicos de la cáscara de

manzana han demostrado su potencial como fuente de antioxidantes naturales, para su aplicación en matrices lipídicas y proteicas (Arshad et al., 2018; Bitalebi et al., 2019), incluso el extracto de orujo de manzana ‘Granny Smith’ ha mostrado eficacia *in-vitro* como agente anticancerígeno y antiinflamatorio (Savatović et al., 2008). Los tejidos vegetales desechados de la industria de la manzana ocupan un lugar importante dentro de la industria que más residuos genera a nivel mundial, aunque son de los más utilizados en la obtención de otros compuestos como la pectina (Güzel & Akpınar, 2019).

Tabla 3.16. Valores de las constantes del modelo de Peleg (I) y del modelo empírico (II) para la cinética de la CA de los extractos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

S	T (°C)	S:L	MI				MII					
			K1 _{CA} (μmol TE g ⁻¹ min ⁻¹)	K2 _{CA} (μmol TE g ⁻¹)	R ² -Adj	RMSE	Cw _{CA} (μmol TE g ⁻¹)	Kw _{CA} (min ⁻¹)	Cd _{CA} (μmol TE g ⁻¹)	Kd _{CA} (min ⁻¹)	R ² -Adj	RMSE
W	20	1:20	2.0977	9.9908	0.93	0.27	8.6102	0.1495	33.0762	0.0002	0.85	0.49
	20	1:30	0.4662	9.9768	0.94	1.32	2.6065	0.1269	8.8010	0.0135	0.96	0.45
	20	1:40	10.044	15.0367	0.90	0.13	9.0929	1.2256	5.7112	0.1098	0.93	0.90
	70	1:20	2.6929	10.2024	0.85	0.73	7.7056	0.2861	10.4852	0.0020	0.98	0.21
	70	1:30	1.2804	12.0761	0.87	0.99	2.9193	2.9900	9.7381	0.0319	0.90	0.37
	70	1:40	5.1742	24.7077	0.97	0.84	6.0773	5.7000	17.2283	0.0956	0.94	0.77
EtOH	20	1:20	5.4522	15.2289	0.87	0.36	10.2033	0.5638	5.3856	0.0292	0.96	0.32
	20	1:30	2.5474	15.3165	0.99	0.41	11.9299	0.1562	3.7748	0.0088	0.97	0.35
	20	1:40	11.2217	24.0225	0.91	0.54	18.4932	0.4444	5.8166	0.0275	0.93	0.51
	70	1:20	1.9846	14.5540	0.99	0.38	11.4219	0.1292	5.3719	0.0022	0.98	0.26
	70	1:30	3.6998	21.5172	0.97	0.77	3.4460	2.9897	16.5916	0.0951	0.95	0.63
	70	1:40	3.3105	20.703	0.96	0.90	5.2630	5.7300	14.6358	0.0637	0.91	0.92

S: Solvente de extracción. W: agua 100%. EtOH: Etanol 80%. T: Temperatura (°C). S:L : Relación de extracción sólido-líquido. K1: Constante de velocidad del modelo de Peleg. K2: Constante de capacidad del modelo de Peleg. Cw: Constante de capacidad en la etapa de lavado. Kw: Constante de velocidad en la etapa de lavado. Cd: Constante de capacidad en la etapa de difusión. Kd: Constante de velocidad en la etapa de difusión. R²-Adj: Coeficiente de correlación ajustado. RMSE: Raíz cuadrada del error medio.

3.4.2.3. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos por maceración de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ (GS)

Para los residuos de cáscara de manzana GS, se logró la identificación tentativa de 9 compuestos. (+) Catequina ((+) CTQN), Procianidina B2 (PACB2), (-) Epicatequina; ((-) EPQN), Procianidina tetrámero (PACT), Ácido clorogénico (ACL), Quercetina-3-o-glucuronido (Q3G), Quercetina pentóxido (QPN), Quercetina Hexóxido (QHSX) y Kaempferol-3-o-glucuronido (K3G) (Figura 3.11). Los flavan-3-ols son un tipo de flavonoides muy comunes en las manzanas (Montero et al., 2013), para el caso de GS la extracción por maceración permitió la obtención de (+) CTQN un compuesto de suma importancia ya que se ha reportado su actividad en la prevención del Alzheimer y estrés oxidativo celular (Colizzi, 2019). El mayor contenido de este metabolito se logró con la

extracción con EtOH; S:L 1:20 a 20 °C y 1:40 a 70°C (0.023 g Kg⁻¹), contenido similar a lo reportado por Guyot et al (2002) (0.04 g Kg⁻¹) para cáscara de manzana ‘Granny Smith’. La mayor concentración de PACB2 se obtuvo con la extracción con W; 1:40 tanto a 20°C (0.025 g Kg⁻¹) como a 70°C (0.027 g Kg⁻¹), sin diferencias significativas con la variación de la temperatura. Para (-)EPQN se obtuvo la mayor concentración (0.026 g Kg⁻¹) con EtOH; 1:30 a 70°C siendo hasta 160% superior al extracto con W; 1:20 a 20°C. De manera similar, el mayor contenido de PACT fue de 0.026 g Kg⁻¹ usando W; 1:40 tanto a 20 y 70°C ($p>0.05$). La mayor concentración de (-)EPQN (0.026 g Kg⁻¹) se obtuvo con EtOH, 1:30 a 70°C, siendo hasta un 160% superior al extracto W; 1:20 a 20°C (Figura 3.11). Del mismo modo, el mayor contenido de PACT se determinó en los extractos W; 1:40 a 20 o 70°C (0.026 g Kg⁻¹, $p>0.05$). Se ha reportado el ACL como compuesto fenólico principal de la manzana ‘Granny Smith’, específicamente en la pulpa, con un contenido medio de 1.13 g Kg⁻¹ (Feliciano et al., 2010; Łata et al., 2009), no obstante, para la cáscara su contenido disminuye considerablemente, en los extractos de GS, el mayor contenido de ACL se obtuvo con EtOH como solvente y S:L 1:40 a 20°C, con un contenido de 0.055 gKg⁻¹ siendo 18 veces superior al contenido de ACL obtenido a 70°C con EtOH y 1:40 (0.03 g Kg⁻¹). Dentro de la clase de compuestos fenólicos mayoritarios en GS se encontró a los flavonoles glicosilados. Para la Q3G, la mayor relación de extracción S:L 1:40 obtuvo los mayores rendimientos de este compuesto obtenido con EtOH a 20°C (0.104 g Kg⁻¹). De manera similar para QPN, el cual fue el compuesto mayoritario en los extractos fenólicos de GS obtenidos por maceración, donde el aumento de la relación de extracción tuvo en efecto lineal con el aumento del contenido de QPN usando EtOH como solvente, en el cual se evidenció el mayor contenido con EtOH; 1:40 a 20°C (0.226 g Kg⁻¹) y a 70°C (0.205 g Kg⁻¹) sin diferencias significativas ($p>0.05$) entre ambas temperaturas de extracción. Notablemente, GS tiene un contenido superior de derivados de quercetina de acuerdo con lo reportado por Kim et al. (2019) para cáscara de manzana ‘Fuji’ con 0.04-0.3 g Kg⁻¹, mostrando a GS como una fuente importante de Flavonoles glicosilados. La relación de extracción 1:30 con EtOH permitió la mayor recuperación de QHSX a 20 °C (0.087 g Kg⁻¹) y K3G a 70°C (0.148 g Kg⁻¹). Para los TPC_{HPLC}, se puede observar en la Figura 3.11 que el mayor contenido se obtuvo con EtOH; 1:40 a 20 °C con 0.570 g Kg⁻¹, y sin diferencias significativas ($p>0.05$) para con la extracción a 70°C con S:L 1:30 con una concentración de 0.506 g Kg⁻¹ de TPC_{HPLC}. Sin embargo, la industria de la manzana es una de las mayores generadoras de subproductos en todo el mundo, y los tejidos vegetales desechados ocupan un lugar importante. Por ello el uso de técnicas sencilla como la maceración con solventes de bajo costo y respetuosos con el medio ambiente, como el agua y el etanol permiten la posible revalorización de los residuos agroindustriales de manzana GS.

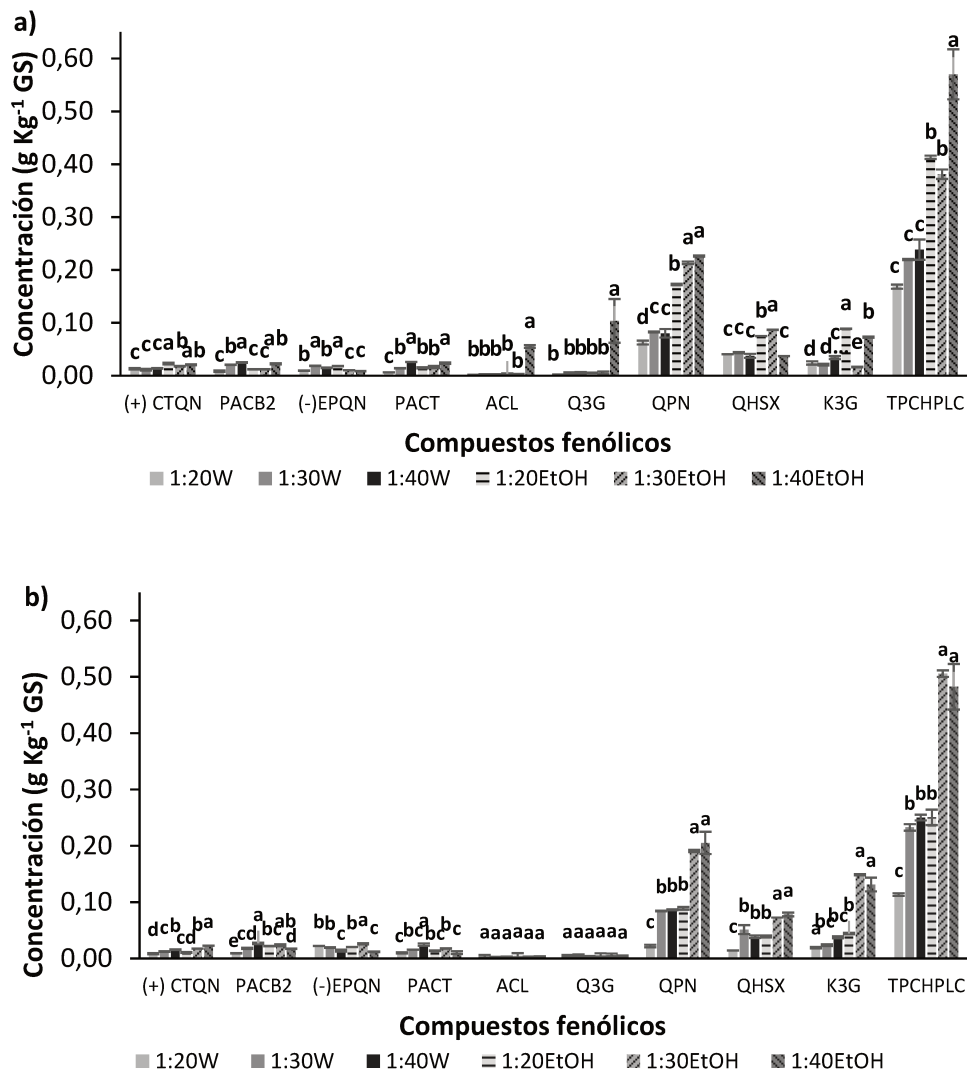


Figura 3.11. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos de cáscara de manzana 'Granny Smith'. a) obtenidos a 20°C. b) obtenidos a 70°C.

(+) CTQN: (+) Catequina. PACB2: Procianidina B2. Epicatequina. PACT: Procianidina tetrámero. ACL: Ácido clorogénico. Q3G: Quercetina-3-o-glucuronido. QPN: Quercetina pentóxido. QHSX: Quercetina Hexóxido. K3G: Kaempferol-3-o-glucuronido. TPC_{HPLC}: Compuestos fenólicos totales determinados por HPLC. 1.20W: Relación de extracción 1:20 con Agua 100%. 1.30W: Relación de extracción 1:30 con Agua 100%. 1.40W: Relación de extracción 1:40 con Agua 100%. 1.20EtOH: Relación de extracción 1:20 con Etanol 80%. 1.30EtOH: Relación de extracción 1:30 con Etanol 80%. 1.40EtOH: Relación de extracción 1:40 con Etanol 80%.

3.5. Estrategias de biofortificación con compuestos fenólicos en subproductos de frutilla y cáscara de manzana.

3.5.1. Efecto de la dosis de radiación UV-A, el tiempo y la temperatura de almacenamiento en el proceso de biofortificación de subproductos de frutilla.

Con el objetivo de incrementar el contenido natural de compuestos fenólicos de los subproductos de frutillas, se estudió el efecto de la aplicación de estreses abióticos como estrategia de biofortificación a través de un diseño experimental de superficie de respuesta. Esto permitió modelar cada una de las respuestas en función de las variables del proceso a través de ecuaciones de segundo orden y de esta manera estudiar el efecto de la dosis de radiación UV-A, la temperatura de almacenamiento (ST) y el tiempo de almacenamiento (TM) sobre la actividad enzimática de PAL y PPO, el contenido de compuestos fenólicos (TPC y TPC_{HPLC}) y el perfil de compuestos fenólicos de los subproductos agroindustriales de frutilla (RF) (Tabla 3.17, Ec. 3.1 a 3.5).

Tabla 3.17. ANOVA del efecto de la aplicación de estreses abióticos sobre la actividad de las enzimas fenilalanina amoníaco liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), el contenido de fenoles totales (TPC), el contenido de fenoles totales por HPLC (TPC_{HPLC}) y el contenido de agrimoniin (AGN) de residuos agroindustriales de frutilla.

Fuente de variación	GL	PAL	PPO	TPC	TPC _{HPLC}	AGN
UVA	1	***	**	ns	***	***
ST	1	**	*	ns	***	ns
TM	1	***	***	***	**	***
UVA x ST	1	ns	ns	ns	ns	ns
UVA x TM	1	ns	***	ns	ns	**
ST x TM	1	ns	ns	ns	**	**
UVA ²	1	*	ns	ns	ns	*
ST ²	1	ns	**	ns	ns	ns
TM ²	1	**	ns	***	***	***
UVA x ST x TM	1	ns	ns	ns	ns	ns
UVA ² x ST	1	ns	ns	ns	ns	ns
UVA ² x TM	1	ns	ns	ns	ns	ns
UVA x ST ²	1	ns	ns	ns	ns	*
UVA x TM ²	1	ns	*	*	ns	ns
ST ² x TM	1	*	ns	ns	ns	ns
ST x TM ²	1	ns	ns	ns	ns	ns
R ²	-	0.74	0.62	0.77	0.89	0.85
Falta de ajuste	38	ns	ns	ns	ns	ns

UVA: Dosis de radiación UVA. ST: Temperatura de almacenamiento, TM: Tiempo de almacenamiento, GL: Grados de libertad. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. ns: $p > 0.05$.

Según los coeficientes de determinación (R^2 0.62-0.89) y la prueba de falta de ajuste (p-valor 0.10-0.52), el modelo cuadrático propuesto describió adecuadamente el comportamiento de las diferentes variables estudiadas en el proceso de biofortificación de RF mediante el uso de radiación UV-A (Tabla 3.17).

3.5.1.1. Efecto de la biofortificación de RF sobre la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)

La enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) es una enzima ubicua en las plantas; la cual se caracteriza por catalizar el primer paso en el metabolismo de los fenilpropanoides dentro del metabolismo de las plantas, permitiendo la acumulación de compuestos fenólicos antioxidantes en los tejidos vegetales para suplir los requerimientos de la planta. El uso de elicitores como la radiación UVA para generar un estrés abiótico, con el fin de aumentar la producción de ROS en los subproductos agroindustriales de la frutilla (RF) desempeña un papel importante en la activación de la enzima PAL (Gyula et al., 2003), ya que nos indica que el tejido vegetal está respondiendo de manera positiva ante el factor de estrés al activar su metabolismo secundario. La actividad PAL se vio afectada principalmente por UVA ($p < 0.001$), ST ($p < 0.01$) y TM ($p < 0.001$), y los factores cuadráticos UVA^2 ($p < 0.05$) y TM^2 ($p < 0.01$) (Tabla 3.16). Inicialmente, el tejido RF mostró una actividad PAL media de 0.04 $\Delta A/h$ mg (Figura 3.12), que es un 57% superior a la registrada para el fruto entero de frutilla con 0.017 $\Delta A/h$ mg (Van de Velde et al., 2018).

Al aplicar los tratamientos con radiación UVA, se observó un efecto inmediato en la actividad PAL, la cual presentó el mayor incremento (304%) para el tratamiento UVA-HIGH, seguido de UVA-MEDIUM (236%). Por lo demás, no hubo diferencias ($p > 0.05$) en la actividad PAL inicial con UVA-LOW. La respuesta fisiológica de las plantas a la radiación UVA varía significativamente, y los mecanismos de respuesta no están completamente claros. Lo que sí está dilucidado es que la absorción y efecto de las diferentes dosis de UVA está mediada a través de fotorreceptores presentes en diferentes partes de la planta de frutilla, receptores de citocromo (CRY), y receptores de fototropina (PHOT) (Rabelo et al., 2020; Verdaguer et al., 2017). Cuando los fotorreceptores UVA se saturan, se generan ROS como primera señal, induciendo la transcripción de genes reguladores, dando lugar a la expresión de enzimas de la vía fenilpropanoide como PAL, desencadenando un aumento de la respiración mitocondrial, acelerando el metabolismo del tejido vegetal (Verdaguer et al., 2017). Es probable que estos eventos fisiológicos estén ocurriendo en el residuo agroindustrial de la frutilla, que responde inicialmente en función de la intensidad de la dosis de UVA.

Durante los diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento, la actividad PAL varió significativamente (Figura 3.20) mostrando una ligera disminución de la PAL para las

muestras UVA-MEDIUM y UVA-HIGH después de 24 h a 5°C ($p<0.05$). Sin embargo, después de 48 h de almacenamiento, los mayores incrementos de PAL se determinaron a 15°C, en orden creciente para el control sin radiación UVA (RF-N, 290%), UVA-MEDIUM (297%), UVA-LOW (373%) y UVA-HIGH (427%), en comparación con la actividad PAL inicial de la muestra RF control (RF-N, TM=0). Estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente para la lechuga tratada con una intensidad UVA de 19 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, donde el almacenamiento a 16°C indujo un aumento del 300% en la actividad PAL (Y. Chen et al., 2021).

Las muestras RF almacenadas a 10°C mostraron menos actividad PAL que las almacenadas a 5°C. Sin embargo, los mayores incrementos de PAL se obtuvieron entre las 24 h y las 48 h de almacenamiento, con las muestras RF-N y UVA-LOW mostrando incrementos similares ($p>0.05$) de 200% y 117%, respectivamente, seguidas de UVA-MEDIUM (260%). Sin embargo, el mayor incremento fue del 322% con 0.12 $\Delta\text{A h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ a 10°C con UVA-HIGH. La RF-E con UVA-HIGH a 15°C mostró incrementos de PAL entre el 192% y el 285% a las 72 h de almacenamiento (0.08-0.11 $\Delta\text{A h}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Estos resultados no concuerdan con el aumento esperado de la actividad enzimática con la temperatura. La temperatura óptima para la actividad PAL es 37°C, y ya se ha informado de su actividad enzimática dependiente de la temperatura (Kong, 2015). Sin embargo, la enzima PAL está codificada por una familia multigénica que genera varias isoformas de la enzima, lo que puede dar lugar a variabilidad en cada tejido vegetal. Estos resultados concuerdan con los reportados por Formica-Oliveira et al. (2016) donde los incrementos más significativos de PAL en tejidos estresados se generan después de 24-48 horas de almacenamiento, seguido de la acumulación de compuestos fenólicos en 48-72 horas con un aumento moderado de la actividad PAL.

De acuerdo con lo tabla 3.17 los datos experimentales de la PAL de RF se justaron adecuadamente al modelo cuadrático como se muestra a continuación en la ecuación 3.1 (modelo reducido):

$$\begin{aligned}
 PAL = & 0.013127 + 0.014635 * UVA + 2.63253E - 003 * ST + 1.48128E - 003 * TM \\
 & - 1.03376E - 003 * UVA * ST - 5.61545E - 004 * UVA * TM - 4.97877E \\
 & - 004 * ST * TM + 6.49115E - 003 * UVA^2 - 1.82129E - 005 * ST^2 \\
 & + 1.05613E - 004 * TM^2 + 4.00685E - 005 * UVA * ST * ST + 1.15440E \\
 & - 005 * ST^2 * TM + 2.56038E - 006 * ST * TM^2
 \end{aligned}
 \tag{Ec 3.1.}$$

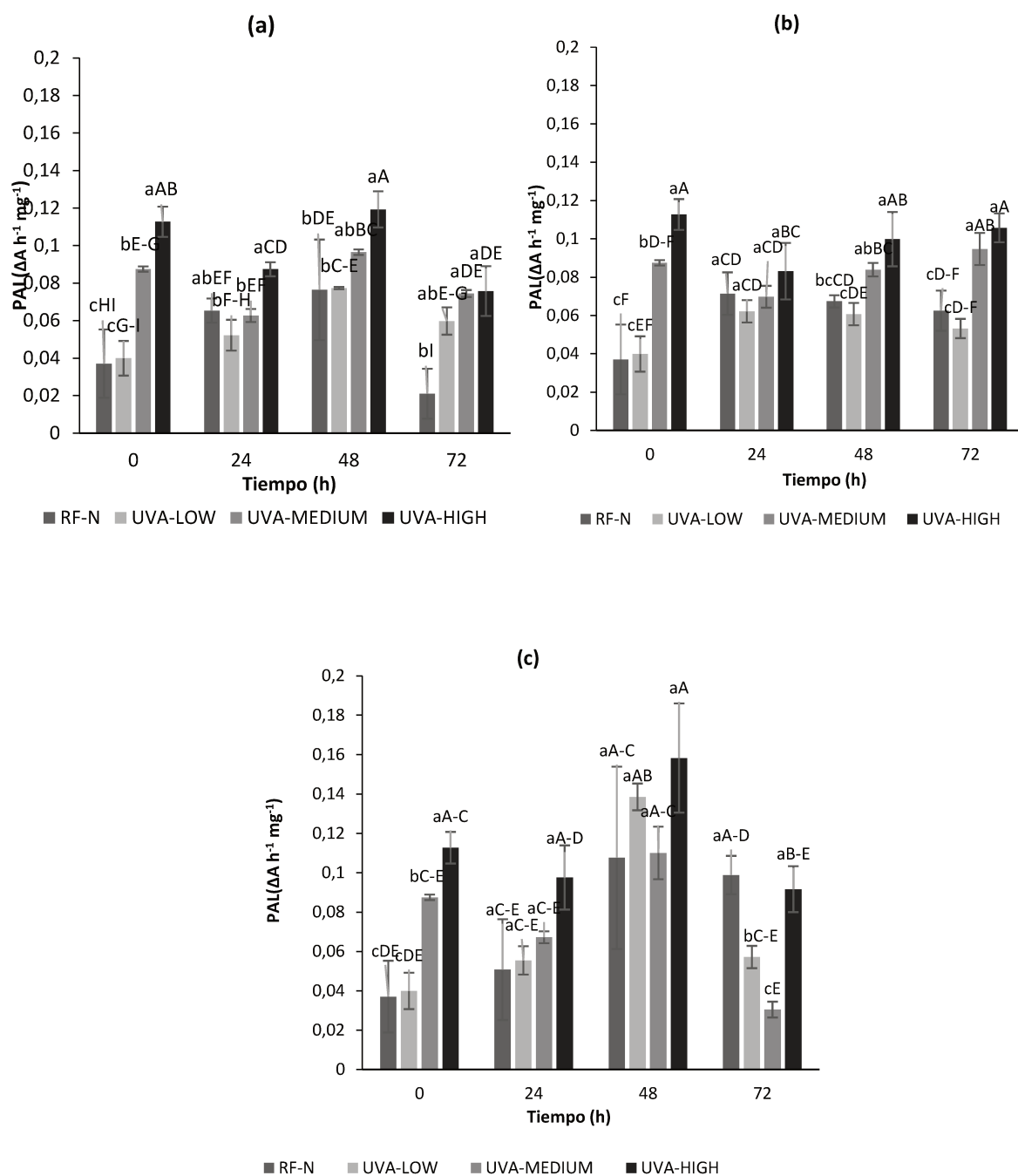


Figura 3.12. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) de subproductos de frutilla tratados con UVA durante su almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C y (c) 15°C.

Letras minúsculas distintas significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos en el mismo tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre distintos tiempos de almacenamiento.

3.5.1.2. Efecto de la biofortificación de RF sobre la enzima polifenol oxidasa (PPO).

El acondicionamiento industrial de la frutilla para su posterior procesamiento involucra el proceso de despallado, que es donde se generan los residuos no evitables del procesamiento de la frutilla. El despallado, consiste la acción mecánica de retirar la parte no comestible del fruto como sépalo, pedúnculo, hojas y la base de la fruta. Esta acción al romper la integridad de la célula vegetal libera los compuestos fenólicos almacenados en las vacuolas de la célula vegetal dejándolos expuestos a la oxidación catalizada por la enzima Polifenol oxidasa que está principalmente ubicada en los cloroplastos de la célula (Araji et al., 2014). Por otro lado, la radiación UVA, al saturar los fotoreceptores del tejido vegetal produce una situación de estrés adicional al proceso de despallado en sí, generando una activación de la enzima PPO. En RF, la radiación UVA ($p<0.01$), ST ($p<0.05$), y TM ($p<0.001$) afectaron significativamente a la actividad PPO. Además, la interacción de los factores UVAxTM fue significativa ($p<0.001$) sobre la PPO (Tabla 3.17), lo que significa que el efecto de la dosis de UVA depende del valor de TM. En la Figura 3.13 se muestra la influencia de diferentes dosis de radiación UVA sobre la PPO. El tratamiento UVA-LOW no ejerció cambios significativos en la actividad de PPO en comparación con el control ($0.18 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Inicialmente, el tratamiento UVA-MEDIUM incrementó la actividad PPO en un 236%, mientras que la muestra UVA-HIGH mostró un incremento de la PPO del 181%. El menor aumento de la actividad PPO observado en las muestras UVA-HIGH podría explicarse en términos de una desnaturalización potencial de la proteína, ya que el exceso de energía de la radiación absorbida por el tejido podría generar una desnaturalización parcial de la enzima. El acondicionamiento industrial de la frutilla para su posterior procesamiento involucra el proceso de despallado, que como se mencionó anteriormente, es donde se generan los residuos no evitables del procesamiento de frutilla.

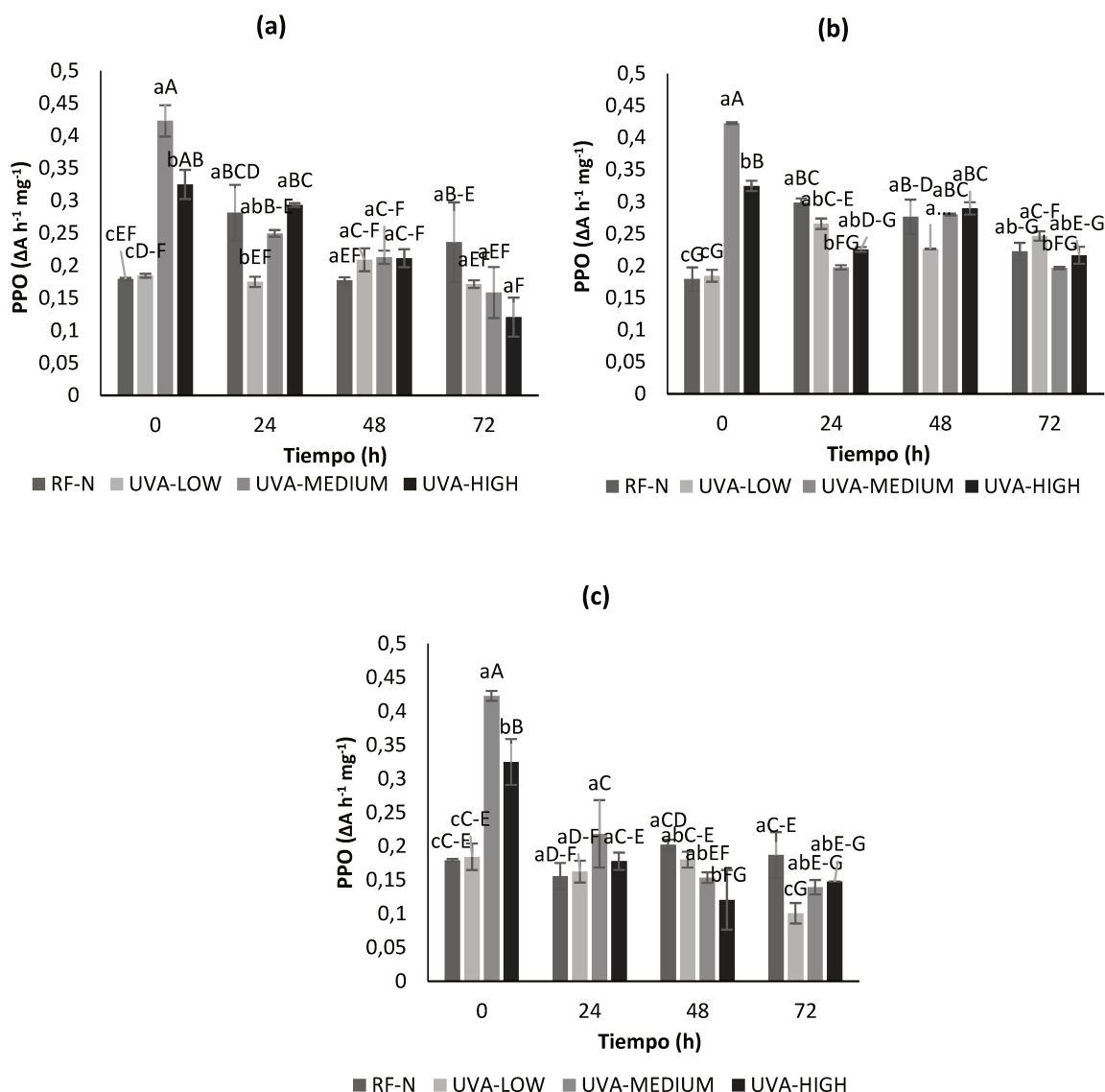


Figura 3.13. Actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de subproductos de frutilla tratados con UVA durante el almacenamiento a (a): 5°C, (b): 10°C, (c): 15°C.

Letras minúsculas distintas significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos en el mismo tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre distintos tiempos de almacenamiento.

Adicionalmente, tras 24 h de almacenamiento (5°C), la actividad PPO de RF-N aumentó un 57%, manteniéndose relativamente constante hasta las 72 h. Las muestras UVA-LOW mantuvieron su actividad PPO constante hasta las 72 h. Para RF-E UVA-MEDIUM y HIGH tras 72 h, se observó una disminución de la PPO, llegando a ser hasta un 33% inferior a la PPO de la RF-N inicial. A 10°C y 24 h, RF-N y UVA-LOW mostraron incrementos en la actividad PPO entre 66-48%, respectivamente. Por el contrario, la tendencia fue hacia una disminución de la PPO en comparación con el tiempo de tratamiento inicial para UVA-MEDIUM y UV-HIGH a 10°C y 24 h (Figura 3.13b)

Para las muestras almacenadas a 15°C, se determinó una reducción en la actividad de PPO para todos los tratamientos, especialmente en el tratamiento UVA-HIGH, que tuvo una actividad inicial de 0.32 $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, y, se redujo a 0.12 $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ después de 48 h de almacenamiento. Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que la enzima PPO de la frutilla tiene un pH y temperatura óptimos medios de 6.2 y 35°C (Panadare & Rathod, 2018). En el caso de las frutillas, el pH medio se sitúa entre 3.4-3.5, lo que puede tener un efecto sinérgico con las diferentes temperaturas de almacenamiento y dosis de radiación, controlando la actividad de la PPO al reducir la oxidación de los compuestos fenólicos de *novo* sintetizados (Van de Velde et al., 2018). Del mismo modo, Teoh et al. (2016) mostraron un efecto sinérgico de pH bajo con las altas dosis de radiación UVC en el control de la actividad PPO de rodajas de papa. Por otra parte, Ding & Ling (2014) informan que dosis de UVC de 0.04 KJ m⁻² aplicadas sobre cáscara de plátano indujeron pardeamiento enzimático. Por otro lado, los tejidos vegetales mantienen un equilibrio entre la síntesis de *novo* y la utilización de compuestos fenólicos, lo que se correlaciona con un aumento de la actividad de la PPO (Torres-Contreras et al., 2014). La PPO tuvo aumentos muy leves para RF-E, incluso después de 72 h a 15°C la actividad de la PPO de las muestras RF-E fue inferior a la de las muestras de control (RF-N) para todas las dosis de UVA (Figura 3.13 c). Similarmente, Chen et al. (2019) informaron de este comportamiento en tejidos vegetales, donde la actividad PPO de lechuga irradiada a dosis bajas (10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) disminuyó casi un 40%. En la ecuación 3.2 se muestra el modelo cuadrático reducido para la variación de la PPO en función de la dosis de UVA, la temperatura y tiempo de almacenamiento de los RF.

$$\begin{aligned}
 PPO = & 0.078182 - 0.064746 * UVA + 0.029295 * ST + 2.53073E - 003 * TM - 3.72425E \\
 & - 003 * UVA * TM + 0.14114 * UVA^2 - 1.65425E - 003 * ST^2 - 2.64451E \\
 & - 005 * TM^2 + 4.66215E - 004 * UVA^2 * TM + 2.0455E - 005 * UVA \\
 & * TM^2
 \end{aligned}$$

Ec 3.2.

3.5.1.3. Efecto de la biofortificación de RF sobre el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC).

El efecto de la radiación UV en diferentes tejidos vegetales varía ampliamente, dependiendo de factores como el estado de madurez de la planta o fruto, cultivar, tipo de cultivo, disponibilidad de fuente de carbono en la planta (azúcares y aminoácidos), y tipo y dosis de radiación (Villamil-Galindo et al., 2021). Para RF, el TPC fue significativamente afectado ($p < 0.01$) por TM y TM². El término de interacción UVAxTM² también afectó el TPC ($p < 0.05$) (Tabla 3.16). El contenido inicial de compuestos fenólicos solubles totales de RF-N fue de 5.8 g AGE Kg⁻¹ RF. En TM=0, el tratamiento UVA-LOW no cambió el TPC (Figura 3.14. Sin embargo, el efecto elicitor puede evidenciarse con el tratamiento UVA-MEDIO

con TPC 6.8 g AGE Kg⁻¹. Asimismo, siguiendo un comportamiento dosis-dependiente, con UVA-HIGH se alcanzó un incremento del 46% en el TPC (8.4 g AGE Kg⁻¹), correlacionando con lo mostrado en la actividad PAL (Figura. 3.12), e indicando que el estrés UVA genera la modulación del metabolismo secundario en el tejido de RF a través de la síntesis de nuevos compuestos fenólicos.

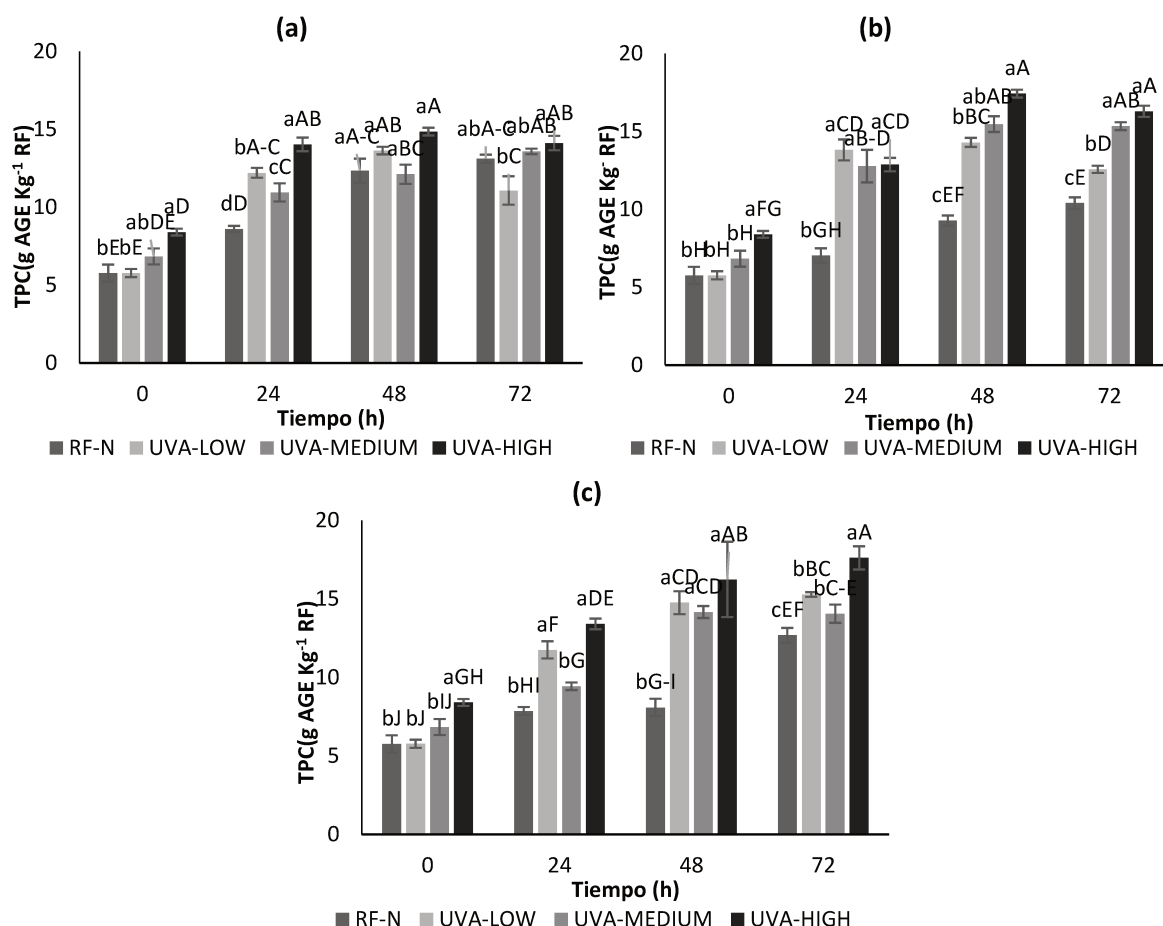


Figura 3.14. Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) de los subproductos de frutilla tratados con UVA durante su almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C, y (c) 15°C.

Letra minúscula diferente, significa diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los distintos tratamientos en el mismo tiempo de almacenamiento. Letra mayúscula distinta, significa diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los distintos tiempos de almacenamiento.

De acuerdo con el TPC obtenido a 5°C, el metabolismo de los fenilpropanoides permaneció activo en la biosíntesis de compuestos fenólicos, observándose los incrementos más significativos tras 48 h, alcanzándose hasta un 158% más de compuestos fenólicos para la RF con UVA-HIGH (14.9 g AGE Kg⁻¹) en comparación con el valor inicial del control. Sin embargo, el incremento más significativo se determinó tras almacenar las muestras UVA-HIGH a 10°C durante 48 h, obteniéndose un TPC de 17.4 g AGE Kg⁻¹, un 142% superior al control (9.3 g AGE Kg⁻¹) tras 48 h de almacenamiento; correlacionando positivamente con el incremento del 322% en PAL para el mismo periodo. Se alcanzó un aumento similar con el tratamiento UVA-HIGH tras 72 h a 15°C (17.6 g AGE Kg⁻¹), lo que demuestra que el aumento del TPC no se vio afectado por la temperatura de

almacenamiento ($p>0.05$). La radiación UVA es el principal componente del espectro UV solar, 95% UVA (315-380nm) y UVB (280-315 nm), a pesar de ser menos dañina que la radiación UVB y UVC. La radiación UVA puede actuar sobre el tejido vegetal, generando respuestas fisiológicas para controlar la condición de estrés, como se observa en el tejido de RF a diferentes dosis y posterior almacenamiento (Morales et al., 2010). A continuación, se muestra el ajuste de los datos experimentales de los TPC de RF sometidos al proceso de biofortificación, al modelo cuadrático (Ecuación 3.3, modelo reducido).

$$\begin{aligned} TPC = & 5.27341 + 4.16250 * UVA + 0.016903 * ST + 0.17214 * TM - 0.048111 * UVA * ST \\ & + 0.027279 * UVA * TM - 2.9420E - 003 * ST * TM - 2.78729 * UVA^2 \\ & - 7.826669E - 004 * TM^2 + 2.75507E - 003 * UVA * ST * TM - 6.1445E \\ & - 004 * UVA * TM^2 \end{aligned} \quad Ec. 3.3.$$

3.5.1.4. Efecto de la biofortificación de RF sobre el perfil de compuestos fenólicos totales.

El uso de la radiación UVA como elicitador ha sido poco estudiado. La biofortificación fenólica con radiación UVA ha sido reportada en algunos tejidos vegetales como *Rosa hybrida* y *Fuchsia hybrida* (Helsper et al., 2003), *Betula pendula* (Morales et al., 2010), *Daucus carota* (Surjadinata et al., 2017), *Brassica oleracea* (Moreira-Rodríguez et al., 2017), *Vaccinium* section. *Cyanococcus* cv 'Duke' (Nguyen et al., 2014) y *Glycine max* sprout (Lim et al., 2021). La radiación UVA ha mostrado en estos casos una activación del metabolismo secundario de estas plantas, además de aumentar la acumulación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante *in-vitro*. Se ha reportado que la radiación UVA puede afectar el proceso de fotosíntesis en los tejidos vegetales y modular la síntesis de compuestos fenólicos específicos (Jacobo-Velázquez et al., 2022). Con respecto a los subproductos vegetales, la información relacionada es aún menor, Formica-Oliveira et al. (2017) estudiaron el efecto de la radiación UVB y UVC en subproductos de brócoli; y Sánchez-Rangel et al. (2021) estudiaron el efecto de la UVC en la biosíntesis de compuestos fenólicos en bagazo de zanahoria.

El perfil de compuestos fenólicos obtenido mediante HPLC-DAD permitió la cuantificación e identificación de 8 compuestos fenólicos individuales (Tabla 3.18), siendo los taninos hidrolizables los compuestos principales presentes en RF, como lo es el isómero tetragalailglucosa (TGI) y el agrimoniin (AGN) como compuesto taxonómico de la familia de las *Rosaceae* y mayoritario en los RF. Además, de los derivados del ácido elágico como el pentóxido de ácido elágico (EAP) y el ácido elágico libre (EA) y flavonoides como el tetrámero de procianidina (PACT), el 3-O-glucurónido de quercetina (Q3G) y el 3-o-glucurónido de kaempferol (K3G). Los efectos de UVA, ST y TM sobre los compuestos fenólicos individuales se muestran en la Tabla 3.18. Además, el total de los compuestos fenólicos identificados (TPC_{HPLC}) se ajustó a un modelo de segundo orden con UVA

($p < 0.001$), ST ($p < 0.001$) y TM ($p < 0.01$) como variables independientes (ecuación. 3.4). La variación TPC_{HPLC} fue afectada por los 3 factores estudiados, UVA, ST, y TM, y la interacción de los factores STxTM ($p < 0.01$) (Tabla 3.16). El compuesto principal, AGN, es de gran interés porque varios autores han reportado las múltiples bioactividades con aplicaciones en la industria nutracéutica (Grochowski et al., 2017; Wang & Jin, 2011). Por esta razón, también se modeló y se incluyó en la optimización de respuesta múltiple (Ecuación 3.5). Según los resultados obtenidos, la UVA y el TM afectaron ($p < 0.01$) al contenido de AGN.

En la tabla 3.18 se muestran los resultados de las concentraciones determinadas por HPLC-DAD de los compuestos fenólicos característicos en los RF, en cada uno de los tratamientos de biofortificación con compuestos fenólicos estudiados. Para el TGI las condiciones de biofortificación estudiadas tuvieron un efecto negativo en la concentración de este compuesto ya que se redujo en un 42% inmediatamente después de las tres dosis de radiación estudiadas (LOW, MEDIUM, HIGH), siendo menor hasta en un 62% durante el almacenamiento al pasar de una concentración inicial de 0.26 g Kg^{-1} a 0.10 g Kg^{-1} (tabla 3.17). Esto se puede asociar a que este compuesto polimérico se esté hidrolizando y generando subunidades de derivados del ácido elágico, durante el tratamiento con UVA y el posterior almacenamiento, ya que es un derivado condensado del ácido elágico (Ky et al., 2016). Tal como se puede observar para el compuesto EAP se evidenció un incremento inmediato significativo ($p < 0.05$) del 36% al aplicar UVA-HIGH (0.33 g Kg^{-1}), y durante el almacenamiento alcanzó una concentración máxima de 0.40 g/Kg a las 72 h con UVA-HIGH a 15°C . A su vez, el EA libre mostró un efecto inmediato al pasar de una concentración de 0.05 g Kg^{-1} a 0.08 , 0.09 y 0.11 g Kg^{-1} para UV-LOW, MEDIUM y HIGH, respectivamente. Continuando con su acumulación en RF durante el almacenamiento hasta 220% superior a la inicial con 0.16 g Kg^{-1} con UVA-HIGH a las 48 h de almacenamiento a 10°C de RF.

Tabla 3.18. Cambios en la concentración de compuestos fenólicos individuales de residuos agroindustriales de frutilla.

UVA	ST (°C)	TM (h)	TGI (g Kg ⁻¹)	EAP (g Kg ⁻¹)	AGN (g Kg ⁻¹)	EA (g Kg ⁻¹)
RF-N	5	0	0.26 ± 0.04a	0.21 ± 0.01m-p	0.60 ± 0.01q	0.05 ± 0.003m
		24	0.14 ± 0.01d-g	0.20 ± 0.001n-p	0.90 ± 0.19n-p	0.09 ± 0.03 e-l
		48	0.13 ± 0.02e-h	0.24 ± 0.01i-n	0.93 ± 0.25 n-p	0.07 ± 0.01i-m
		72	0.13 ± 0.001e-i	0.25 ± 0.05i-n	0.77 ± 0.18pq	0.07 ± 0.003i-m
	10	0	0.26 ± 0.01a	0.21 ± 0.01m-p	0.60 ± 0.01q	0.05 ± 0.003 m
		24	0.10 ± 0.01h-k	0.23 ± 0.03k-p	1.25 ± 0.26 i-l	0.09 ± 0.02 e-j
		48	0.11 ± 0.01f-j	0.21 ± 0.01m-p	1.08 ± 0.02l-n	0.11 ± 0.003 b-f
		72	0.11 ± 0.02f-j	0.14 ± 0.02 q	0.79 ± 0.03pq	0.06 ± 0.002k-m
	15	0	0.26 ± 0.04a	0.21 ± 0.04m-p	0.60 ± 0.01q	0.05 ± 0.003m
		24	0.13 ± 0.001e-i	0.22 ± 0.01j-o	0.82 ± 0.19p	0.07 ± 0.01i-m
		48	0.14 ± 0.001d-f	0.21 ± 0.01m-p	1.33 ± 0.18 g-k	0.06 ± 0.01j-m
		72	0.13 ± 0.02d-h	0.23 ± 0.06 k-p	1.32 ± 0.07g-k	0.07 ± 0.04i-m
LOW	5	0	0.15 ± 0.01c-e	0.23 ± 0.02k-p	0.84 ± 0.05op	0.08 ± 0.02f-l
		24	0.15 ± 0.02c-e	0.30 ± 0.01c-i	1.25 ± 0.03i-m	0.10 ± 0.03 b-h
		48	0.16 ± 0.02c-e	0.31 ± 0.04c-h	1.62 ± 0.05c-f	0.11 ± 0.01b-e
		72	0.09 ± 0.02jk	0.24 ± 0.02k-p	1.04 ± 0.07m-o	0.06 ± 0.02lm
	10	0	0.15 ± 0.01c-e	0.23 ± 0.02k-p	0.84 ± 0.05op	0.08 ± 0.02f-l
		24	0.08 ± 0.002k	0.23 ± 0.04k-p	1.08 ± 0.06l-n	0.07 ± 0.01h-m
		48	0.10 ± 0.001i-k	0.24 ± 0.01i-n	1.39 ± 0.01f-k	0.08 ± 0.01f-l
		72	0.11 ± 0.003f-j	0.31 ± 0.01c-g	1.51 ± 0.08c-h	0.10 ± 0.01b-g
	15	0	0.15 ± 0.01c-e	0.23 ± 0.02k-p	0.84 ± 0.05op	0.08 ± 0.02f-l
		24	0.13 ± 0.001d-h	0.23 ± 0.01k-p	0.94 ± 0.03n-p	0.07 ± 0.01i-m
		48	0.11 ± 0.0003g-k	0.34 ± 0.01a-c	1.41 ± 0.07f-j	0.11 ± 0.01a-e
		72	0.11 ± 0.01f-j	0.38 ± 0.003ab	1.25 ± 0.28i-m	0.12 ± 0.01a-d
MEDIUM	5	0	0.15 ± 0.01c-e	0.28 ± 0.01d-k	1.11 ± 0.04l-n	0.09 ± 0.01c-i
		24	0.13 ± 0.01d-h	0.22 ± 0.005l-p	1.24 ± 0.12j-m	0.07 ± 0.01i-m
		48	0.16 ± 0.005b-d	0.25 ± 0.005h-n	1.46 ± 0.07e-h	0.11 ± 0.0001b-f
		72	0.15 ± 0.003c-e	0.26 ± 0.01g-n	0.91 ± 0.01n-p	0.08 ± 0.01g-l
	10	0	0.15 ± 0.01c-e	0.28 ± 0.01d-k	1.11 ± 0.04l-n	0.09 ± 0.01c-i
		24	0.09 ± 0.004jk	0.25 ± 0.001i-n	1.18 ± 0.05k-m	0.10 ± 0.001b-g
		48	0.11 ± 0.004f-j	0.32 ± 0.02c-f	1.42 ± 0.07 e-j	0.10 ± 0.01b-g
		72	0.12 ± 0.01f-j	0.18 ± 0.02pq	0.96 ± 0.07n-p	0.08 ± 0.02f-l
	15	0	0.15 ± 0.01c-e	0.28 ± 0.01d-k	1.11 ± 0.04l-n	0.09 ± 0.01c-i
		24	0.09 ± 0.004jk	0.27 ± 0.002f-l	1.37 ± 0.04f-k	0.09 ± 0.005e-j
		48	0.12 ± 0.007f-j	0.19 ± 0.01o-q	1.92 ± 0.04ab	0.07 ± 0.002j-m
		72	0.10 ± 0.01jk	0.23 ± 0.01k-p	1.40 ± 0.11f-j	0.09 ± 0.01d-j
HIGH	5	0	0.18 ± 0.01bc	0.33 ± 0.02b-d	1.70 ± 0.11c-e	0.11 ± 0.02a-e
		24	0.12 ± 0.004f-j	0.26 ± 0.01g-m	1.46 ± 0.16e-i	0.07 ± 0.003i-m
		48	0.15 ± 0.01de	0.27 ± 0.005f-l	1.58 ± 0.07c-g	0.11 ± 0.01a-e
		72	0.11 ± 0.02f-j	0.30 ± 0.01c-j	1.25 ± 0.10h-l	0.09 ± 0.01e-k
	10	0	0.18 ± 0.04bc	0.33 ± 0.02b-d	1.70 ± 0.11c-e	0.11 ± 0.023a-e
		24	0.15 ± 0.01de	0.28 ± 0.005e-k	1.71 ± 0.10b-d	0.10 ± 0.01b-f
		48	0.10 ± 0.0004jk	0.28 ± 0.07d-k	2.05 ± 0.07a	0.16 ± 0.003a
		72	0.12 ± 0.02f-j	0.26 ± 0.02g-n	1.63 ± 0.03c-f	0.13 ± 0.001ab
	15	0	0.18 ± 0.01bc	0.33 ± 0.01b-d	1.70 ± 0.11c-e	0.11 ± 0.02a-e
		24	0.13 ± 0.003d-h	0.33 ± 0.005b-e	1.49 ± 0.08d-h	0.09 ± 0.01e-j
		48	0.16 ± 0.01b-e	0.38 ± 0.01ab	1.99 ± 0.04a	0.12 ± 0.01abc
		72	0.19 ± 0.001b	0.40 ± 0.004a	1.77 ± 0.06 bc	0.14 ± 0.001ab

Promedio g Kg⁻¹ ± desviación estándar (n=3). TGI: isómero tetragalailglucosa (TGI), EAP: pentóxido de ácido elágico, AGN: agrimoniin, EA: ácido elágico libre. Una letra diferente en una columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tiempos y temperaturas de cada tratamiento con UV.

Continuación tabla 3.18

UVA	ST (°C)	TM (h)	PACT (g Kg ⁻¹)	Q3G (g Kg ⁻¹)	K3G (g Kg ⁻¹)	KP (g Kg ⁻¹)	TPC _{HPLC} (g Kg ⁻¹)
RF-N	5	0	0.19 ± 0.01a	0.18 ± 0.01j-n	0.10 ± 0.01f-h	0.01 ± 0.003h-l	1.71 ± 0.10o-q
		24	0.10 ± 0.0001i-q	0.18 ± 0.03k-o	0.11 ± 0.02d-f	0.01 ± 0.003 j-l	1.76 ± 0.32o-q
		48	0.12 ± 0.05 f-p	0.20 ± 0.005e-k	0.11 ± 0.004c-f	0.01 ± 0.001e-j	1.88 ± 0.32m-p
		72	0.10 ± 0.001j-q	0.19 ± 0.04 h-m	0.10 ± 0.02f-j	0.01 ± 0.004h-l	1.66 ± 0.06pq
	10	0	0.19 ± 0.01a	0.18 ± 0.01j-n	0.10 ± 0.01f-h	0.01 ± 0.004i-l	1.71 ± 0.10o-q
		24	0.12 ± 0.01f-o	0.19 ± 0.03 h-m	0.11 ± 0.02d-f	0.01 ± 0.002kl	2.16 ± 0.38j-m
		48	0.11 ± 0.003 h-p	0.17 ± 0.002 k-o	0.11 ± 0.004c-f	0.01 ± 0.002j-l	1.97 ± 0.04k-o
		72	0.12 ± 0.004 f-o	0.16 ± 0.0002m-o	0.08 ± 0.01ij	0.002 ± 0.0001m	1.53 ± 0.21q
	15	0	0.19 ± 0.01a	0.18 ± 0.01j-n	0.10 ± 0.01f-h	0.01 ± 0.0004h-l	1.71 ± 0.10o-q
		24	0.12 ± 0.003f-n	0.16 ± 0.005 l-o	0.08 ± 0.01 h-j	0.01 ± 0.0001l	1.69 ± 0.18o-q
		48	0.14 ± 0.02d-i	0.19 ± 0.001h-n	0.10 ± 0.002 f-h	0.01 ± 0.0004h-l	2.26 ± 0.17g-k
		72	0.09 ± 0.03k-q	0.18 ± 0.05j-n	0.10 ± 0.03f-i	0.01 ± 0.004i-l	2.21 ± 0.31h-k
LOW	5	0	0.13 ± 0.03e-k	0.18 ± 0.01i-n	0.10 ± 0.01f-h	0.01 ± 0.001g-l	1.80 ± 0.10o-q
		24	0.12 ± 0.04f-n	0.21 ± 0.004d-j	0.11 ± 0.004d-f	0.02 ± 0.001d-i	2.33 ± 0.05f-j
		48	0.06 ± 0.001qr	0.20 ± 0.02e-k	0.11 ± 0.01d-f	0.02 ± 0.002c-g	2.65 ± 0.13c-e
		72	0.09 ± 0.04m-r	0.09 ± 0.020g-m	0.10 ± 0.01f-h	0.01 ± 0.001i-l	1.86 ± 0.16 n-p
	10	0	0.13 ± 0.03e-k	0.18 ± 0.01i-n	0.10 ± 0.01f-h	0.01 ± 0.001g-l	1.80 ± 0.10o-q
		24	0.08 ± 0.03o-r	0.14 ± 0.06o	0.07 ± 0.03j	0.01 ± 0.004l	1.81 ± 0.25 o-q
		48	0.14 ± 0.003c-g	0.16 ± 0.001m-o	0.07 ± 0.02j	0.01 ± 0.0002i-l	2.25 ± 0.03g-k
		72	0.05 ± 0.003r	0.14 ± 0.0004o	0.09 ± 0.001g-j	0.01 ± 0.001l	2.37 ± 0.07e-j
	15	0	0.13 ± 0.03e-k	0.18 ± 0.01i-n	0.10 ± 0.01f-h	0.01 ± 0.001g-l	1.80 ± 0.10o-q
		24	0.13 ± 0.01e-k	0.18 ± 0.02h-n	0.09 ± 0.01f-j	0.01 ± 0.002l	1.84 ± 0.02n-p
		48	0.11 ± 0.05g-p	0.26 ± 0.005a-c	0.13 ± 0.001b-e	0.02 ± 0.003a-c	2.53 ± 0.14d-g
		72	0.12 ± 0.01f-m	0.29 ± 0.001a	0.15 ± 0.003ab	0.02 ± 0.0002ab	2.53 ± 0.31d-g
MEDIUM	5	0	0.17 ± 0.0001a-d	0.20 ± 0.01f-k	0.11 ± 0.01e-g	0.01 ± 0.004d-i	2.21 ± 0.05h-k
		24	0.13 ± 0.01f-l	0.18 ± 0.001j-n	0.09 ± 0.002 f-j	0.01 ± 0.0003l	2.14 ± 0.14 j-n
		48	0.13 ± 0.0001e-k	0.22 ± 0.01d-h	0.13 ± 0.02a-d	0.01 ± 0.0002h-l	2.53 ± 0.09d-g
		72	0.13 ± 0.03f-k	0.19 ± 0.01g-l	0.10 ± 0.0001f-i	0.01 ± 0.002g-l	1.90 ± 0.07l-p
	10	0	0.17 ± 0.0001a-d	0.20 ± 0.01f-k	0.11 ± 0.01e-g	0.02 ± 0.004d-i	2.21 ± 0.05h-k
		24	0.18 ± 0.002a-c	0.18 ± 0.02h-n	0.10 ± 0.001f-i	0.01 ± 0.006l	2.18 ± 0.05i-l
		48	0.11 ± 0.03h-p	0.22 ± 0.012c-g	0.13 ± 0.01b-e	0.02 ± 0.006 b-f	2.49 ± 0.15 d-h
		72	0.09 ± 0.01n-r	0.21 ± 0.02d-j	0.10 ± 0.01f-i	0.01 ± 0.001kl	1.80 ± 0.12o-q
	15	0	0.17 ± 0.0001a-d	0.20 ± 0.01f-k	0.11 ± 0.01e-g	0.02 ± 0.005d-i	2.21 ± 0.05h-k
		24	0.08 ± 0.002p-r	0.17 ± 0.01k-o	0.10 ± 0.004f-j	0.01 ± 0.0001f-k	2.24 ± 0.06g-k
		48	0.12 ± 0.001g-p	0.15 ± 0.01no	0.08 ± 0.02g-j	0.01 ± 0.005j-l	2.71 ± 0.09cd
		72	0.13 ± 0.01d-j	0.18 ± 0.01j-n	0.14 ± 0.005ab	0.01 ± 0.001j-l	2.33 ± 0.04f-j
HIGH	5	0	0.14 ± 0.02c-h	0.24 ± 0.001b-d	0.13 ± 0.01a-c	0.01 ± 0.003 a-d	2.91 ± 0.17bc
		24	0.17 ± 0.0004a-d	0.19 ± 0.003 h-m	0.10 ± 0.004f-i	0.01 ± 0.001f-k	2.47 ± 0.16d-i
		48	0.19 ± 0.01ab	0.20 ± 0.14 f-k	0.14 ± 0.0003ab	0.002 ± 0.001a-d	2.74 ± 0.09cd
		72	0.17 ± 0.01a-e	0.24 ± 0.14 b-e	0.14 ± 0.005 a-c	0.02 ± 0.0015c-g	2.37 ± 0.08e-j
	10	0	0.14 ± 0.01c-h	0.24 ± 0.001b-d	0.13 ± 0.01a-c	0.02 ± 0.003 a-d	2.91 ± 0.17bc
		24	0.13 ± 0.003c-h	0.18 ± 0.01k-o	0.15 ± 0.01a	0.01 ± 0.0003f-k	2.76 ± 0.09cd
		48	0.19 ± 0.003ab	0.22 ± 0.01c-g	0.11 ± 0.02e-g	0.02 ± 0.001a-d	3.21 ± 0.01a
		72	0.12 ± 0.02l-r	0.22 ± 0.01d-i	0.11 ± 0.02e-g	0.02 ± 0.0001a-e	2.62 ± 0.06 c-f
	15	0	0.14 ± 0.02c-h	0.24 ± 0.001b-d	0.13 ± 0.01a-c	0.02 ± 0.0003 a-d	2.91 ± 0.2bc
		24	0.10 ± 0.003i-q	0.23 ± 0.005c-f	0.14 ± 0.01ab	0.02 ± 0.0001c-h	2.57 ± 0.08d-f
		48	0.16 ± 0.003b-f	0.24 ± 0.005b-d	0.15 ± 0.01ab	0.02 ± 0.001a	3.30 ± 0.06a
		72	0.15 ± 0.01c-g	0.27 ± 0.002ab	0.13 ± 0.01a-e	0.02 ± 0.001ab	3.10 ± 0.07ab

promedio g Kg⁻¹ ± desviación estándar (n=3). PACT: tetrámero de procianidina, Q3: 3-o-glucurónido de quercetina, K3G: 3-o-glucurónido de kaempferol; TPC_{HPLC}: compuestos fenólicos totales determinados por HPLC. Una letra diferente en una columna indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tiempos y temperaturas de cada tratamiento con UVA.

Por otro lado, para compuestos como la PACT no se evidenciaron cambios significativos ($p>0.05$) en la concentración causados por el tratamiento de biofortificación con compuestos fenólicos de RF. Para los flavonoles, la Q3G mostró una acumulación máxima significativa del 50% (0.27 g Kg^{-1}) con UVA-HIGH a las 72 horas a 15°C . De manera similar la K3G incrementó su concentración en un 50% pero a las 24 horas del almacenamiento a 10°C . Para el KP no se observaron cambios en su concentración durante el tratamiento de RF. Como se puede apreciar en la tabla 3.18 cada uno de los compuestos fenólicos identificados en RF respondieron de manera diferente al estrés abiótico inducido por la radiación UVA y su posterior almacenamiento.

Estos resultados permiten explorar las condiciones adecuadas de biofortificación para modular ciertos compuestos en específicos, utilizando estos tejidos residuales como biofábricas de compuestos fenólicos determinados (Torres-Contreras et al., 2014). Tal es el caso del compuesto mayoritario en RF, el AGN. La Figura 3.15 ilustra el efecto positivo de la UVA en la biofortificación de subproductos agroindustriales de frutilla con AGN. La acumulación inicial de AGN fue proporcional a la dosis de UVA siendo $\text{UVA-LOW} < \text{UVA-MEDIUM} < \text{UVA-HIGH}$, alcanzando un incremento del 184% (1.7 g Kg^{-1}) comparado con el control (0.6 g Kg^{-1}). Se alcanzó una acumulación máxima de AGN (2.0 g Kg^{-1}) durante el almacenamiento a 10°C durante 48 h, obteniendo un incremento superior al obtenido por Moreira-Rodríguez et al. (2017) en brotes de brócoli aplicando radiación UVA (3.16 W m^{-2} durante 120 min), alcanzando un incremento máximo del compuesto ácido 5-sinapoyl-quínico (121%). Estos resultados se ajustaron al modelo cuadrático presentado en la ecuación 3.4, que permite predecir la concentración de este importante compuesto bajo diferentes condiciones de tratamiento de biofortificación. Como se ha descrito anteriormente, aunque el mecanismo por el cual la radiación UVA modula la biosíntesis de compuestos fenólicos no está totalmente dilucidado, estos resultados muestran al AGN como el compuesto con mayor acumulación en RF, lo que contrasta con informes previos para frutos sometidos a radiación UVB previo a la cosecha, donde se incrementan principalmente las antocianinas y los flavonoles (Warner et al., 2021).

$$\begin{aligned} \text{AGN} = & 0.96636 + 0.15784 * \text{UVA} - 0.096122 * \text{ST} - 1.4479\text{E} - 003 * \text{TM} + 0.045193 \\ & * \text{UVA} * \text{ST} - 2.39936\text{E} - 003 * \text{UVA} * \text{TM} - 4.02024\text{E} - 004 * \text{ST} * \text{TM} \\ & - 0.052114 * \text{UVA}^2 + 6.00997\text{E} - 003 * \text{ST}^2 + 6.29268\text{E} - 004 * \text{TM}^2 \\ & + 0.010156 * \text{UVA}^2 * \text{ST} - 3.91748\text{E} - 003 * \text{UVA} * \text{ST}^2 + 1.36979\text{E} - 005 \\ & * \text{ST} * \text{TM}^2 \quad \text{Ec 3.4.} \end{aligned}$$

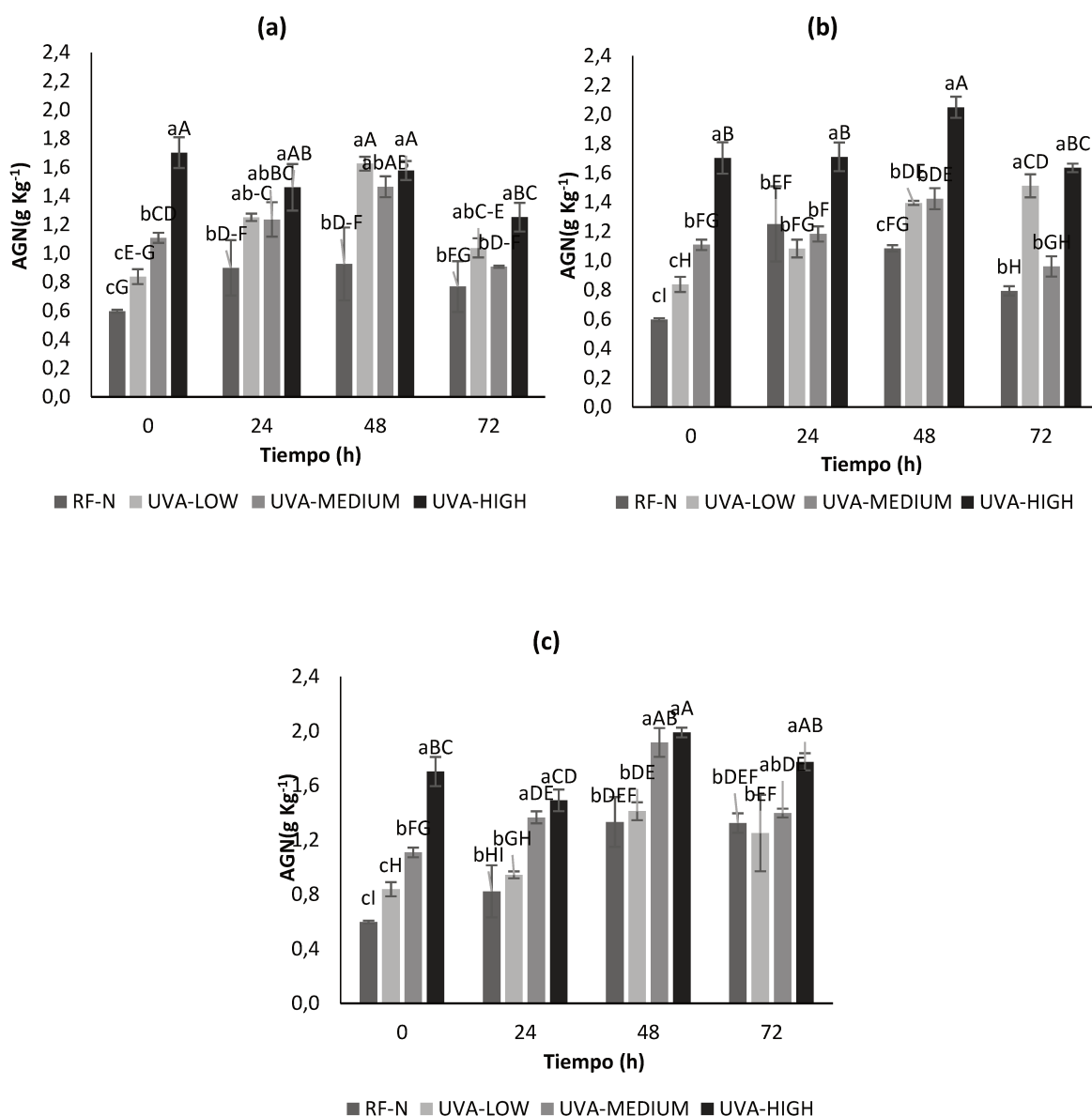


Figura 3.15. Concentración de agrimoniin (AGN) de los subproductos de frutilla tratados con UVA durante el almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 15°C.

Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos en el mismo tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre distintos tiempos de almacenamiento.

Tras la exposición de los RF a las diferentes dosis de UVA, los TPC_{HPLC} cambiaron de forma similar al TPC determinado por el método de Folin-Ciocalteu, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras control y UVA-LOW (1.7-1.8 g Kg⁻¹). Sin embargo, para UVA-MEDIUM, los compuestos fenólicos aumentaron un 29%, y el aumento más significativo se observó en el tratamiento UVA-HIGH (2.9 g Kg⁻¹), que fue un 70% superior

al control RF. Para el almacenamiento a 5°C, los mayores incrementos se produjeron después de 24-48 h, con un contenido medio de 2.5 g Kg⁻¹ (Figura 3.16). No hubo diferencias significativas entre los TPC_{HPLC} de las muestras RF-E tras 24-48 h a 5°C, siendo hasta un 54% superior al control para el mismo periodo, y similar a lo reportado por Surjadinata et al. (2017), quienes aplicaron UVA 12.7 W m⁻² durante 6 h sobre zanahorias cortadas, consiguiendo un incremento del 100% en fenoles totales y de hasta un 300% en ácido clorogénico. A 10°C, los mayores incrementos se determinaron tras 24-48 h con un contenido medio de 2.5 g Kg⁻¹. Sin embargo, la mayor acumulación de compuestos fenólicos se obtuvo tras 48 h a 15°C (3.3 g Kg⁻¹ RF), un 104% superior al control (Figura 3.16). Resultados similares a los obtenidos para subproductos de brócoli utilizando UVB y UVC 10 KJ m⁻², tras 48 h a 15°C, mostrando un incremento del 88% de compuestos fenólicos (Formica-Oliveira et al., 2017). El efecto de la dosis de UVA, ST y TM sobre el total de los compuestos individuales (TPC_{HPLC}) también fue modelada a través del modelo cuadrático presentado en la ecuación 3.5.

$$TPC_{HPLC} = 1.83114 + 0.16807 * UVA - 0.013167 * ST - 0.023120 * TM + 1.00621E - 003 * ST * TM + 0.040032 * UVA^2 + 9.4535E - 004 * TM^2 \quad Ec\ 3.5.$$

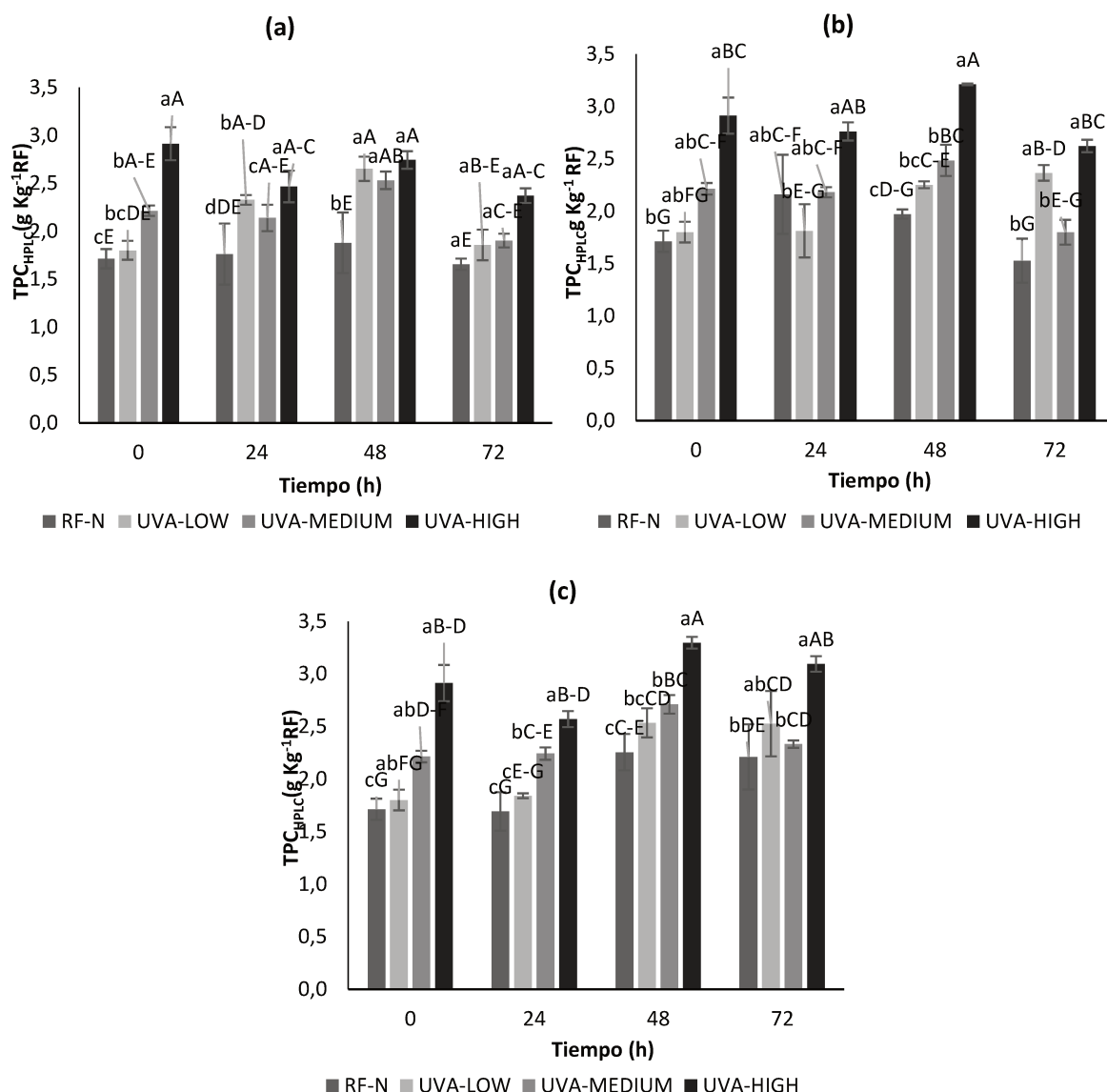


Figura 3.16. Contenido fenólico total determinado por HPLC (TPC_{HPLC}) de subproductos de frutilla tratados con UVA durante su almacenamiento a (a) 5°C, (b) 10°C, y (c) 15°C. Letras minúsculas diferentes, significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los distintos tratamientos en el mismo tiempo de almacenamiento. Letras mayúsculas distintas, significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre distintos tiempos de almacenamiento.

3.5.1.5. Determinación de las condiciones óptimas del proceso de biofortificación del subproducto de frutilla y validación de los modelos obtenidos

El uso de la radiación UVA como elicitador en el metabolismo secundario de las plantas, específicamente en los RF, involucra varios mecanismos de acción metabólica dentro de la célula vegetal de acuerdo a factores como la intensidad del estrés, tiempo estado de desarrollo del tejido y posterior manipulación (Darré et al., 2022; Vogt, 2010). Probablemente en RF, los fotorreceptores presentes en diferentes partes del tejido, como los citocromo (CRY), y los Locus de resistencia a los rayos UV (UVR8) se saturan al absorber la radiación UVA generando una expresión en las enzimas COP1 E3 ubiquitina

ligasa (COP1), el receptor t de la proteasa-activada (PAR1), el hipocótilo alargado-5 (HY5), siendo este último el que expresa la enzima de la PAL y otros genes relacionados con la respuesta a los estímulos de la radiación UVA, como la generación de clorofila (Figura 3.17) (Rabelo et al., 2020; Verdaguer et al., 2017).

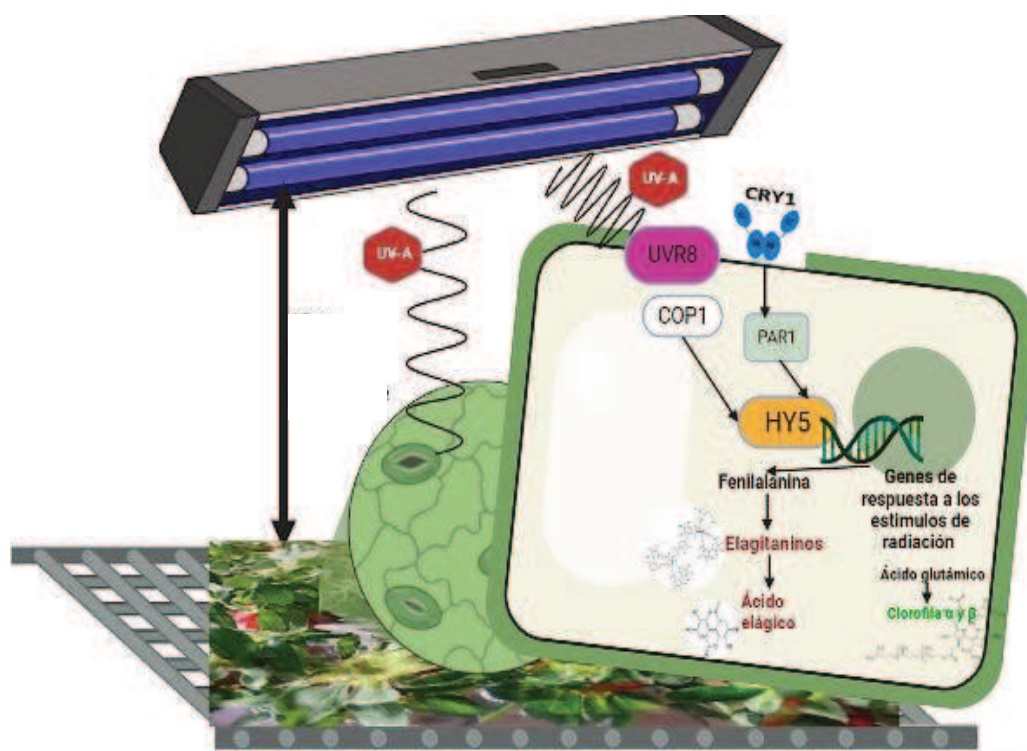


Figura 3.17. Diagrama del efecto de la radiación UVA sobre los residuos agroindustriales de frutilla (RF).

Se aplicó el procedimiento de optimización de respuestas múltiples, basado en la función de deseabilidad de Derringer, para determinar las condiciones experimentales óptimas de la biofortificación en compuestos fenólicos de la RF, a través de la optimización individual de los modelos obtenidos para cada respuesta, como primera etapa (Ecuaciones 3.1-3.5).

La Tabla 3.19 muestra los resultados de la optimización simultánea y la validación de los modelos. Las condiciones óptimas del proceso de biofortificación para aumentar la acumulación de fenoles en los subproductos de frutilla fueron la dosis UVA-HIGH (86.4 KJ m⁻²), ST=15°C, y TM=46 h. Finalmente, el proceso de biofortificación se llevó a cabo en las condiciones óptimas para validar los modelos predictivos desarrollados, y para determinar las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los compuestos fenólicos luego de la biofortificación inducida por UVA. Los valores experimentales obtenidos para TPC, TPC_{HPLC} y AGN fueron similares ($p>0.05$) a los valores predichos, lo que indica la adecuación de los modelos. Sin embargo, los valores experimentales de PAL fueron superiores (23%) a los valores predichos, mientras que los valores experimentales de PPO fueron inferiores (25%) a los valores predichos.

Tabla 3.19. Tratamiento óptimo de biofortificación de subproductos de frutilla (RF) y sus valores de respuesta experimentales y predichos.

Variables			Respuestas	PAL ($\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)	PPO ($\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)	TPC (g AGE Kg ⁻¹)	TPC _{HPLC} (g AGE Kg ⁻¹)	AGN (g Kg ⁻¹)
UVA	ST (°C)	TM (h)						
HIGH	15	46	<i>Predichas</i>	0.13b	0.16a	16.7a	3.1a	1.9a
HIGH	15	46	<i>Experimental</i>	0.16a	0.12b	15.9a	2.9a	1.7a

UVA: dosis de radiación UVA, ST: temperatura de almacenamiento, TM: tiempo de almacenamiento. PAL: Actividad fenilalanina amoniaco liasa. PPO: actividad polifenol oxidasa. TPC: Contenido fenólico total. TPC_{HPLC}: Contenido fenólico total por HPLC. AGN: Agrimoniin. Una letra diferente indica diferencias significativas entre los valores predichos y los experimentales $p<0.05$ prueba t.

3.5.1.6. Estabilidad de los compuestos fenólicos de los subproductos de frutilla durante el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*

Los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos fenólicos dependen no solo del perfil o la cantidad de compuestos, sino también de la liberación y transformación durante los procesos fisiológicos de la digestión. Sin embargo, la baja bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos ha sido ampliamente reportada debido a las biotransformaciones que sufren durante el proceso digestivo (Van de Velde et al., 2018). Dado que los RF son una fuente importante de compuestos fenólicos, es importante conocer su comportamiento y estabilidad durante el proceso gástrico, ya que estos subproductos pueden ser revalorizados mediante la obtención de suplementos dietéticos, y es necesario garantizar una bioaccesibilidad adecuada y segura de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos individuales se cuantificaron en las diferentes etapas de la prueba de digestión *in-vitro*. Los resultados se muestran en la Tabla 3.20, donde se comparó la bioaccesibilidad fenólica RF-N y RF-E. Las diferentes fases mostraron un efecto significativo ($p<0.05$) en la

concentración de compuestos fenólicos individuales (EAP, EA, Q3G y K3G) para RF-N y RF-E (EAP, AGN, EA, Q3G, K3G, TPC_{HPLC}). El elagitanino AGN fue el compuesto mayoritario en todas las fases intestinales tanto para RF-N como para RF-E, mostrando una disminución en la concentración inicial de 1.35 g kg^{-1} en RF-N a 0.13 g kg^{-1} en el FI, teniendo una bioaccesibilidad promedio del 9.8%. En RF-E mostró una concentración inicial de 1.79 g kg^{-1} , y el proceso digestivo la redujo a 0.45 g kg^{-1} en la FI (25.1%). Estos resultados concuerdan con otros informes relativos a la estabilidad digestiva de compuestos fenólicos procedentes de diferentes matrices vegetales (Antunes-Ricardo et al., 2017; Azzini et al., 2010; Van de Velde, Pirovani, et al., 2018).

En cuanto a la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de las frutilla, se ha informado de que las antocianinas, su principal grupo de compuestos fenólicos, presentan una baja bioaccesibilidad (1% promedio) (Sandhu et al., 2016; Van de Velde, Pirovani, et al., 2018). Ariza et al. (2018) informaron de la bioaccesibilidad de los aquenios de frutilla, que fueron los mayoritarios y los más bioaccesibles, con 0.0297 g kg^{-1} de taninos hidrolizables en la fase intestinal. Por otra parte, el compuesto PACT presentó la mayor bioaccesibilidad en la fase intestinal, con un 79.2% para RF-N y un 59.7% para RF-E.

Tabla 3.20. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de los subproductos de frutilla (RF).

Muestra	Compuesto	Concentración (g kg ⁻¹)			Bioaccesibilidad (%)	
		Fluido saliva (FS)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)
RF-N	TGI	0.10 ± 0.003a	0.05 ± 0.001b	0.07 ± 0.001ab*	49.8	71.8*
	EAP	0.34 ± 0.005a	0.04 ± 0.001b	0.02 ± 0.001c	11.8	7.1
	AGN	1.35 ± 0.06a	0.15 ± 0.01b	0.13 ± 0.004b	10.9	9.80
	EA	0.13 ± 0.003a	0.03 ± 0.005b	0.01 ± 0.0001c	19.9	9.1
	PACT	0.14 ± 0.01a	0.11 ± 0.002b	0.11 ± 0.01b	79.2	79.2
	Q3G	0.23 ± 0.01a	0.05 ± 0.001b	0.02 ± 0.001c	19.9	10.0
	K3G	0.23 ± 0.01a	0.04 ± 0.002b	0.02 ± 0.001c	16.2	6.8
	KP	0.02 ± 0.001	n.d	n.d	n.d	n.d
	TPC _{HPLC}				18.0	15.3
RF-E	TGI	0.15 ± 0.004a*	0.08 ± 0.03b	0.05 ± 0.003b	51.4	36.1
	EAP	0.36 ± 0.002a*	0.10 ± 0.02b*	0.04 ± 0.004c*	27.2*	11.1*
	AGN	1.79 ± 0.03a*	0.51 ± 0.01b*	0.45 ± 0.01c*	28.4*	25.1*
	EA	0.15 ± 0.004a*	0.04 ± 0.002b*	0.03 ± 0.002c*	28.1*	17.9*
	PACT	0.17 ± 0.01a*	0.12 ± 0.003b*	0.10 ± 0.01b	71.7*	59.7
	Q3G	0.26 ± 0.01a*	0.07 ± 0.004b*	0.03 ± 0.001c*	27.2*	11.9*
	K3G	0.28 ± 0.01a*	0.05 ± 0.002b*	0.02 ± 0.005c	19.0*	5.7
	KP	0.04 ± 0.001*	n.d	n.d	n.d	n.d
	TPC _{HPLC}				30.3*	22.2*

RF-N: Subproducto de frutilla control, RF-E: Subproducto de frutilla en condiciones óptimas de biofortificación TGI: tetragalloil glucosa isómero (TGI), EAP: ácido elágico pentóxido, AGN: agrimoniin, EA: ácido elágico libre. PCT: procianidina tetrámero, Q3G: quercetina-3-o-glucurónido, K3G: kaempferol-3-o-glucurónido, TPC_{HPLC}: contenido fenólico total por HPLC. n.d: No detectado. Letras minúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). *: Diferencias de medias ($p < 0.05$) entre el mismo compuesto de las muestras RF-N y RF-E.

Estos resultados se alinean con los reportados para la bioaccesibilidad de epicatequina en cereza dulce con un 40% y los reportados para procianidinas de cacao con un rango de 68.5-70.9% (Giltekin-Özgiven et al., 2016; Gonçalves et al., 2019), mostrando así la importancia de las procianidinas como fuente de compuestos bioactivos con alta bioaccesibilidad. Le siguió el TGI con 71.8 y 36.1%, respectivamente, indicando que el proceso de biofortificación con UVA redujo la bioaccesibilidad de este compuesto. K3G fue el compuesto con menor bioaccesibilidad en RF-N (6.8%) y RF-E (5.7%). Los compuestos fenólicos de las distintas partes de las frutillas no son muy estables al pH básico típico de la fase gástrica. Sin embargo, compuestos como el ácido elágico en RF-E mostraron una bioaccesibilidad del 24% en la fase gástrica y del 17.9% en la fase intestinal, similar a la reportada para la mora con un 14% (Van de Velde et al., 2018). La quercetina y los glucósidos de kaempferol fueron los compuestos más afectados por el proceso digestivo, ya que el pH gástrico genera la biotransformación de estos compuestos en

agliconas que son más inestables. Estas observaciones ya han sido reportadas en la bioaccesibilidad de frutillas enteras (Azzini et al., 2010). En cuanto a los TPC_{HPLC} , continúa la tendencia de disminución del contenido en las diferentes etapas de la digestión, inicialmente con un contenido de 2.5 y 3.2 g kg⁻¹ para RF-N y RF-E, respectivamente; alcanzaron la fase intestinal con 0.39 y 0.71 g kg⁻¹, respectivamente. Según Olivero-David et al. (2018), alrededor del 95% de los compuestos fenólicos que alcanzan la fase intestinal pasan directamente al intestino grueso sin ser absorbidos, interactuando con la microbiota, y a través de sus complejos enzimáticos se obtienen nuevos metabolitos con diferentes bioactividades. También se observó que el proceso de biofortificación mediante radiación UVA y posterior almacenamiento a 15°C durante 46 h mejoró significativamente el contenido de compuestos fenólicos que alcanzaron la fase intestinal (EAP, AGN, PACT, Q3G y TPC_{HPLC}).

3.5.2. Efecto del tipo de corte, la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la cáscara de manzana (GS)

Las diferentes corridas experimentales del diseño factorial general, empleado para la biofortificación con compuestos fenólicos de GS mediante el estrés abiótico por corte, se muestran en las Figuras 3.18-3.22, estas figuras, permiten visualizar y analizar los efectos del tipo de corte (Ct), la temperatura de almacenamiento (ST) y el tiempo de almacenamiento (TM) sobre las actividades enzimáticas de PAL y PPO, así como el contenido total de compuestos fenólicos (TPC y TPC_{HPLC}), y la procianidina B2 (PACB2) como compuesto fenólico significativo presente en la GS, determinado previamente en el ensayo de la secuencia de extracción de pectina y compuestos fenólicos a partir de GS. El modelo cuadrático proporcionó un buen ajuste con los datos experimentales, como lo demuestran los coeficientes de determinación (R^2 0.60-0.82), que describieron con precisión los cambios observados en las diferentes respuestas estudiadas (Tabla 3.21).

Tabla 3.21. ANOVA para la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), compuestos fenólicos totales (TPC), contenido fenólico total por HPLC (TPC_{HPLC}) para el ensayo de biofortificación de GS

Fuente de variación	GL	PAL	PPO	TPC	PACB2	TPC _{HPLC}
Ct	2	***	***	***	*	***
ST	1	***	***	***	*	***
TM	1	***	***	***	**	**
Ct x ST	1	ns	ns	ns	ns	ns
Ct x TM	1	ns	ns	*	**	ns
ST x TM	1	***	**	ns	ns	ns
Ct ²	1	ns	ns	ns	ns	ns
ST ²	1	***	**	ns	**	**
TM ²	1	***	ns	***	*	***
Ct x ST x TM	1	ns	ns	ns	ns	ns
Ct ² x ST	1	ns	ns	ns	ns	ns
Ct ² x TM	1	ns	ns	ns	ns	ns
Ct x ST ²	1	ns	ns	ns	ns	ns
Ct x TM ²	1	ns	*	ns	ns	ns
ST ² x TM	1	ns	ns	ns	ns	ns
ST x TM ²	1	ns	ns	ns	ns	ns
R ²	-	0.84	0.62	0.78	0.60	0.70
Falta de ajuste	53	ns	ns	ns	ns	ns

C: Tipo de corte, ST: Temperatura de almacenamiento TM: Tiempo de almacenamiento, GL: Grados de libertad. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. ns: $p > 0.05$.

3.5.2.1. Efecto del estrés por corte sobre la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa de cáscara de manzana 'Granny Smith'.

La Figura 3.18 muestra la variación de la actividad PAL con diferentes tipos de corte (Ct), temperaturas de almacenamiento (ST) y tiempos de almacenamiento (TM). El análisis reveló que los tres factores afectaron significativamente a la actividad PAL ($p<0.001$), al igual que la interacción entre ST y TM, así como los factores cuadráticos ST^2 y TM^2 ($p<0.001$) (Tabla 3.21).

La aplicación de daños por corte de diferente intensidad como elicitador de la biofortificación con compuestos fenólicos dio lugar a una activación inmediata de la actividad PAL. Los diferentes tipos de corte desencadenaron una serie de señales que se activaron como mecanismo de defensa del GS. El daño por corte de mayor intensidad (C3 1.5 mm) aumentó significativamente ($p<0.05$) la actividad PAL en un 133% en comparación con la cáscara de manzana inicial. Le siguió C2 (5 mm), que mostró un aumento de hasta el 13.3%. Estos resultados son consistentes con hallazgos previos de Reyes & Cisneros-Zevallos. (2003) en pulpa y cáscara de patata utilizando estrés por corte, que lograron incrementos de hasta 73% y 14%, respectivamente, en la actividad PAL. La aplicación de estrés por corte puede perturbar la integridad celular, lo que a su vez desencadena una cascada de moléculas de señalización como el ácido salicílico, el ácido jasmónico, el etileno y las especies reactivas del oxígeno (ROS). Cuando estas moléculas alcanzan los receptores del tejido vegetal, inducen cambios metabólicos activando diversos genes de defensa. La expresión de los genes PAL implicados en la actividad PAL puede variar en función del tejido vegetal. Por lo general, los genes PAL1, PAL2 y PAL3 están presentes y pueden modular la síntesis de metabolitos secundarios que ayudan en la reparación del tejido dañado (Babaoglu Aydaş et al., 2013; Ibanez et al., 2019). Durante el almacenamiento, el metabolismo celular de GS se mantuvo activo, como se muestra en la Figura 3.18. Dentro de las primeras 12 horas de almacenamiento, se observó un aumento significativo en PAL para todas las temperaturas de almacenamiento, con el mayor aumento ocurriendo a ST 20°C, que osciló entre 327-599%. La mayor actividad PAL a 20°C se observó en C3 ($0.1 \Delta A h^{-1} mg^{-1}$), manteniendo la tendencia de mayor actividad a mayor intensidad de daño por corte. En todos los experimentos, los valores máximos de actividad PAL se observaron en el intervalo de 48-72 horas de almacenamiento de las muestras GS, sin embargo, a 15°C ST, C3 presentó la mayor actividad a las 48 horas de almacenamiento ($0.131 \Delta A h^{-1} mg^{-1}$). Este valor fue un 1200% superior a la actividad PAL inicial de GS con C1 a tiempo cero ($0.01 \Delta A h^{-1} mg^{-1}$), y un 457% superior a la de C3 a tiempo cero ($0.02 \Delta A h^{-1} mg^{-1}$).

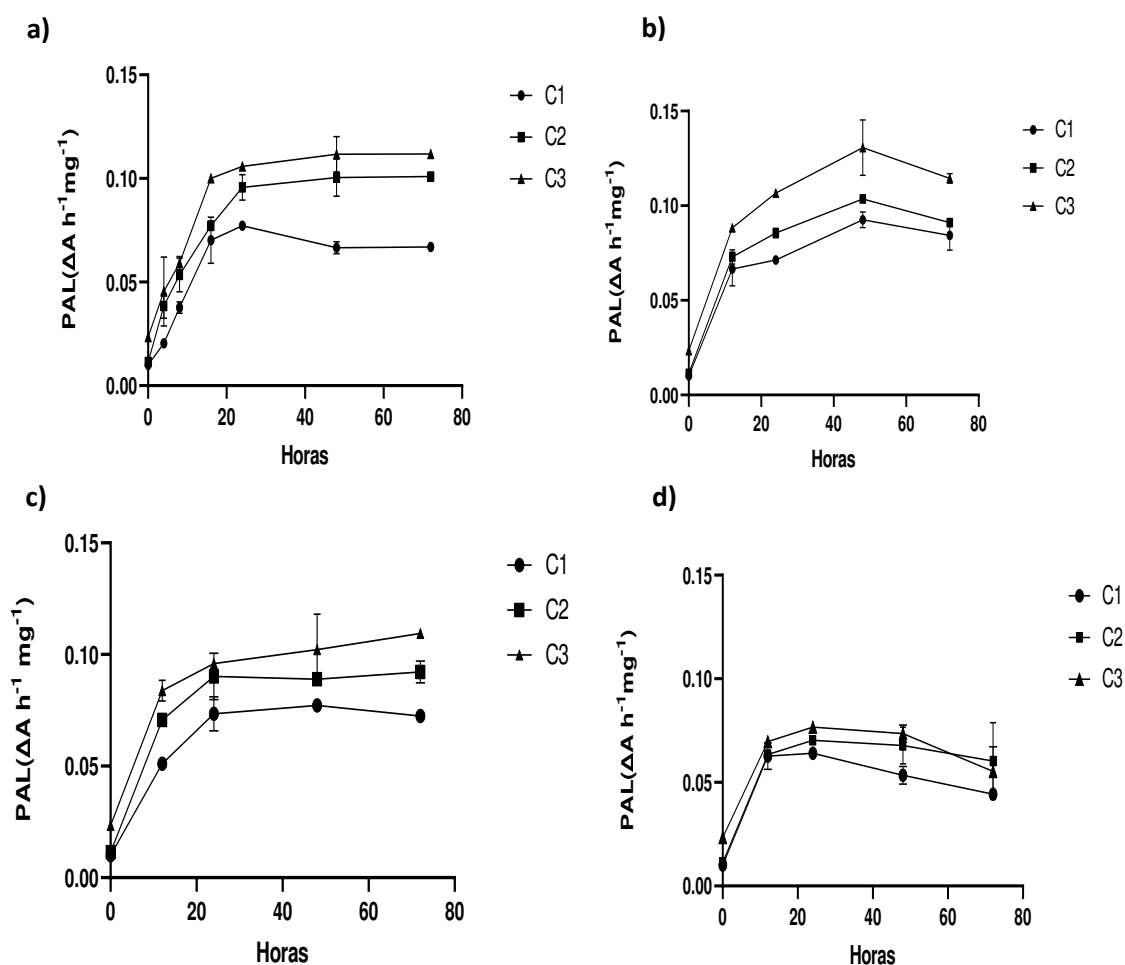


Figura 3.18. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa a diferentes temperaturas de almacenamiento de cáscara de manzana ‘Granny Smith’. a: 20°C. b: 15°C. c: 10°C. d: 5°C.

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). C1: GS entero. C2: GS cortado 6 mm, C3: GS cortado 1.5 mm.

La actividad PAL de C3 a las 48 h fue significativamente ($p < 0.05$) superior a la de C2 ($0.1 \Delta\text{AA h}^{-1} \text{mg}^{-1}$) y C1 ($0.09 \Delta\text{AA h}^{-1} \text{mg}^{-1}$) a 15 y 20°C (Figura 3.18a-b), no mostrando estas últimas diferencias significativas entre sus valores medios ($p > 0.05$). La disminución de la temperatura de almacenamiento (ST) provocó una disminución de la tasa de incremento de la actividad enzimática PAL, observándose la mayor actividad a las 48 horas de almacenamiento a 15°C. Tanto a 10 como a 5°C, se observaron variaciones en la actividad PAL para los distintos tipos de corte. Para todo el subproducto de cáscara de manzana (C1), el incremento máximo de la actividad PAL fue del 669% a las 48 horas de almacenamiento a 10°C. En cambio, para los tipos de corte C2 y C3, los aumentos máximos de la actividad PAL se observaron a las 72 horas de almacenamiento, con incrementos del 818% y el 989%, respectivamente (Figura 3.18 c). En la GS almacenada a 5°C, se evidenciaron incrementos significativos durante las primeras 12 horas con un

valor de $0.07 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ sin diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los distintos Ct, mostrándose constante durante el resto del almacenamiento. El metabolismo secundario del GS permanece activo incluso a bajas temperaturas; sin embargo, los incrementos en la actividad PAL son menores comparados con los observados a temperaturas más altas ($20\text{-}15^{\circ}\text{C}$). Este hallazgo es importante ya que indica que la modulación del metabolismo secundario del GS para la acumulación de compuestos fenólicos requiere temperaturas superiores a 10°C . Al disminuir la temperatura de almacenamiento, se reduce el requerimiento de energía para el proceso. La expresión de PAL y sus isoformas (SmPAL1, 2, 3) está regulada por genes individuales que varían en diferentes partes de una planta y responden de manera diferente a factores de estrés biótico y abiótico. Generalmente, su mayor actividad se produce alrededor de 37°C (Kong, 2015; Z. Xu et al., 2016). Por lo tanto, es probable que los GS con diferentes cortes y almacenados a bajas temperaturas ($10\text{-}5^{\circ}\text{C}$) muestren menos variación de la PAL con el tiempo. Cabe señalar que la actividad PAL no se ve afectada únicamente por la temperatura, sino también por el equilibrio entre la tasa de síntesis y oxidación de los compuestos fenólicos. Esta tasa dependerá de diversos factores, como el material vegetal, su disposición genética, el tipo de elicitor utilizado y las condiciones de almacenamiento del tejido (Santana-Gálvez et al., 2019).

De lo anterior se desprende que la activación de la enzima PAL en GS reveló un comportamiento dependiente de la intensidad correspondiente al tipo de estrés provocado por el daño por corte aplicado. Estos resultados fueron similares a los documentados para la calabaza expuesta a estrés abiótico por corte, donde se observó un aumento acumulativo superior al 100% en la actividad de la enzima PAL con una mayor intensidad de corte después de 168 h de almacenamiento a 4°C (Hu et al., 2023). Los valores experimentales de la enzima PAL en GS mostraron un buen ajuste con el modelo cuadrático, el cual permite modelar el comportamiento de PAL en GS dentro del espacio experimental propuesto en este estudio. Cada tipo de corte permitió un ajuste adecuado, mostrando la máxima actividad en el corte de 1.5 mm (C3), cuyo modelo reducido se muestra en la ecuación 3.6.

$$PAL_{C3} = 0.032192 + 5.48813E - 003 * ST + 1.59295E - 003 * ST + 5.04383E - 005 * ST * TM - 2.41975E - 004 * ST^2 - 2.34368E - 005 * ST^2 \quad Ec. 3.6.$$

3.5.2.2. Efecto del estrés por corte sobre la actividad polifenol oxidasa (PPO) de GS.

. Para el proceso de biofortificación con compuestos fenólicos de GS, tanto el Ct, TM como la ST afectaron significativamente la actividad de la PPO ($p < 0.001$). Además, hubo una interacción significativa entre ST y TM que afectó al comportamiento de la enzima ($p < 0.01$) (Tabla 3.21). La Figura 3.19 muestra que el efecto inmediato del estrés por corte

en GS no mostró un cambio estadísticamente significativo ($p>0.05$) en la actividad de PPO ($0.06\text{-}0.09 \Delta A \text{ h}^{-1}\text{mg}^{-1}$), y que estos valores fueron inferiores a los valores de PPO reportados para la pulpa de manzana 'Granny Smith' (aproximadamente $0.15 \Delta A \text{ h}^{-1}\text{mg}^{-1}$), donde la enzima es más prevalente (Serra et al., 2021). Estudios genómicos recientes han revelado que la PPO está implicada en varios mecanismos de defensa de las plantas (Araji et al., 2014). El proceso agroindustrial de las manzanas 'Granny Smith' frescas cortadas implica un proceso de eliminación mecánica de la piel, lo que provoca una alteración de la integridad de la célula vegetal, haciéndola más susceptible a la acción de la enzima PPO

Sin embargo, durante el almacenamiento de GS, la actividad PPO varió significativamente con el factor TM, desde una actividad PPO inicial de $0.06 \Delta A \text{ h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ en la cáscara entera (C1 TM=0) aumentando significativamente en las primeras 12 h en todas las ST. Para el GS almacenado a 20°C , la PPO incrementó su actividad en el siguiente orden C1 ($0.12 \Delta A \text{ h}^{-1}\text{mg}^{-1}$) < C2 ($0.13 \Delta A \text{ h}^{-1}\text{mg}^{-1}$) < C3 ($0.14 \Delta A \text{ h}^{-1}\text{mg}^{-1}$), luego de las primeras 12 h.

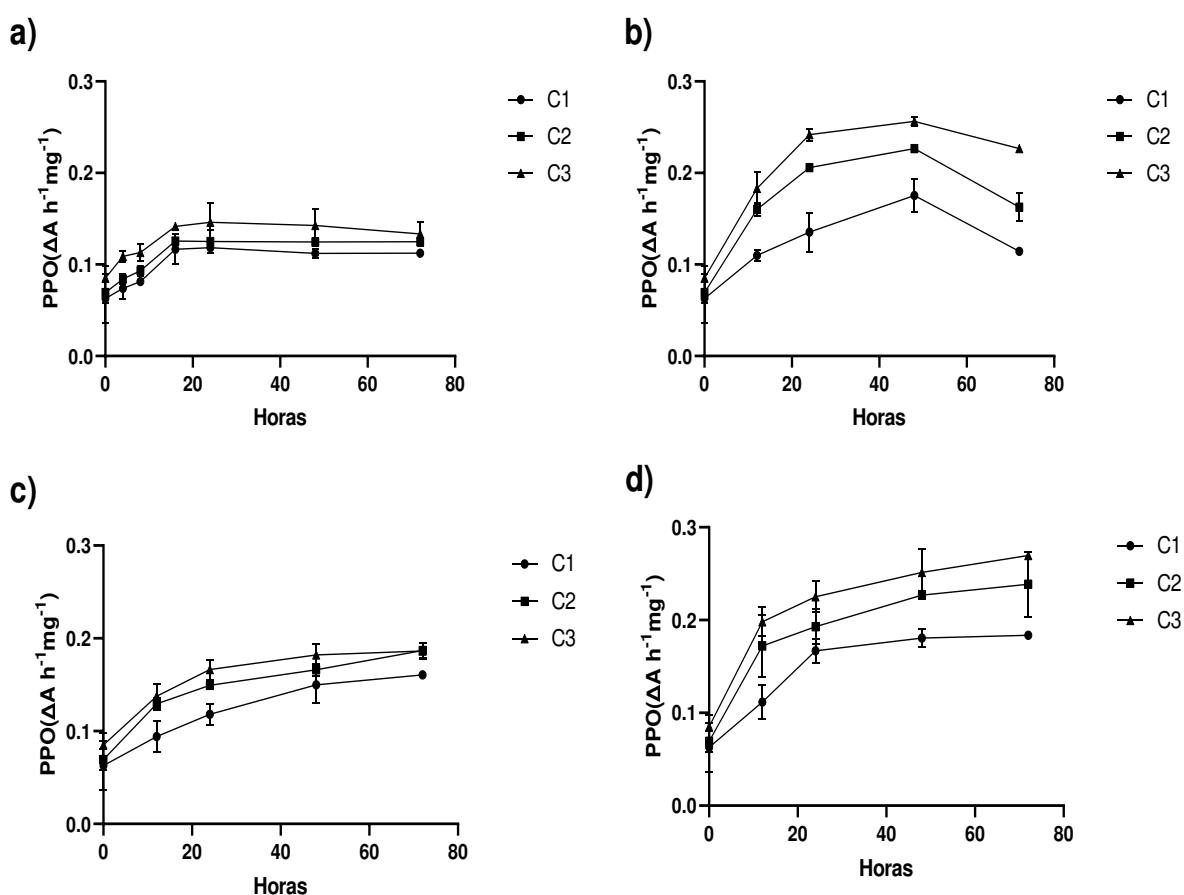


Figura 3.19. Actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de cáscara de manzana 'Granny Smith' durante el almacenamiento a diferentes temperaturas: a) 20°C , b) 15°C , c) 10°C , y d) 5°C .

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). C1: GS entero. C2: GS cortado 6 mm, C3: GS cortado 1.5 mm.

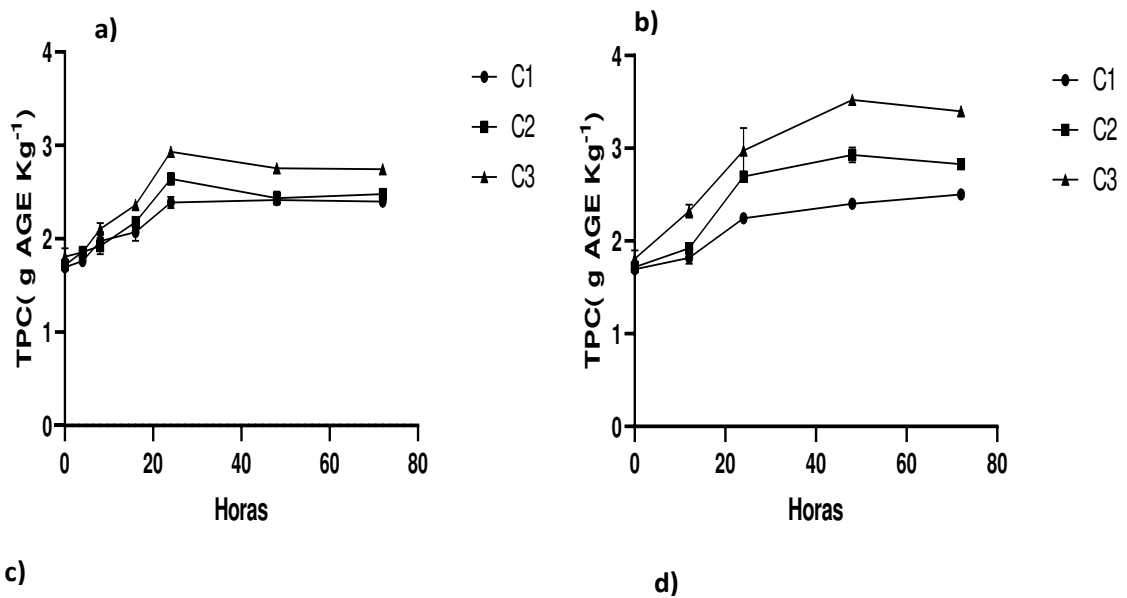
El comportamiento se mantuvo asintótico a lo largo del tiempo, observándose hasta un aumento del 132% en la actividad PPO a las 24 para el GS con C3 almacenada a 20°C. Durante el almacenamiento a 15°C, la PPO mostró los mayores cambios, como se observa en la Figura 3.19-b, la actividad de la PPO de C2 y C3 aumentó en 261 y 301% (0.23 y 0.26 $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), respectivamente, en comparación con C1 en el tiempo 0 ($p < 0.05$). Estos resultados confirman que a mayor intensidad de corte (Ct), mayor activación de la enzima PPO con respuesta acumulativa durante el tiempo de almacenamiento luego de 12-24 h. De forma similar a lo observado en la actividad PAL, según el análisis de correlación realizado sobre las diferentes respuestas estudiadas, la variación de la actividad PAL y PPO mostró una correlación altamente significativa ($p < 0.001$, R^2 0.60), como se muestra en la Tabla 3.26. Adicionalmente, los resultados fueron similares a lo reportado para frutillas enteras y cortadas en mitades, donde la actividad PPO varió de 0.04 a 0.09 $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Van de Velde, et al., 2018). Según los resultados aquí obtenidos, a 10°C, los picos de actividad de PPO se retrasaron, y para un almacenamiento de hasta 72 horas, PPO mostró un aumento del 155% para C1 y del 197% para C2 y C3 (Figura 3.19 c). En el caso del almacenamiento a 5°C, luego de 72h la PPO de GS C3 mostró una actividad de 0.27 $\Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, significativamente mayor que en los otros cortes, siendo hasta un 329% mayor que C1 TM=0h, y un 217% mayor que C3 TM=0h. Los resultados sugieren que cuanto mayor es la intensidad del corte en GS, mayor es la actividad de la PPO, lo que conduce a una mayor tasa de oxidación de los compuestos fenólicos. Esto también desencadena el metabolismo secundario de la planta, dando lugar a la síntesis de metabolitos que ayudan a reparar el daño causado por el estrés mecánico y los procesos de oxidación en las membranas lipídicas celulares (Araji et al., 2014; Torres-Contreras et al., 2014). La ecuación 3.7 representa el modelo cuadrático reducido que ajusta a los datos experimentales sobre la actividad de la PPO para GS con la mayor intensidad de corte C3, permitiendo predecir la actividad de la PPO en función de la temperatura (ST) y tiempo de almacenamiento.

$$PPO_{C3} = 0.13135 + 9.23351E - 004 * ST + 2.32096E - 003 * ST - 8.73608E - 005 * ST \\ * TM - 4.96324E - 005 * ST^2 \quad Eq \ 3.7.$$

3.5.2.3. Efecto del estrés por corte sobre el contenido de compuestos fenólicos totales de GS.

Es bien sabido que los compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes y pueden actuar como agentes de defensa contra el estrés biótico y abiótico en las plantas. De esta forma, al aumentar el contenido de compuestos fenólicos en los subproductos

agroindustriales, podemos potencialmente mejorar su valor nutracéutico y desarrollar nuevas fuentes bioactivas y compuestos con aplicaciones industriales potenciales (Jacobo-Velázquez, 2022; Villarreal-García et al., 2016). En el proceso de biofortificación de GS mediante la aplicación de estrés por corte, las tres variables estudiadas influyeron ($p < 0.001$) sobre el TPC (Tabla 3.21). Luego del almacenamiento, se produjo un aumento significativo de TPC, especialmente en los cortes C2 y C3, alcanzando un valor de TPC máximo a 15°C luego de 48 h de almacenamiento (Figura 3.20). Siendo en C3 (3.5 g AGE Kg⁻¹) seguido de C2 (2.9 g AGE Kg⁻¹) y por último la cáscara entera (C1) (2.4 g AGE Kg⁻¹). Cabe destacar que el efecto cuadrático de ST² sobre TPC indica que el aumento de TPC con ST tiene un valor máximo (óptimo) alrededor de 15°C. Estos resultados concuerdan con estudios previos que informan de un aumento del TPC en respuesta al daño mecánico (Ortega-Hernández et al., 2020; Santana-Gálvez et al., 2019). Por lo tanto, la aplicación de estrés mecánico a GS puede ser una estrategia potencial para aumentar su contenido fenólico, lo que puede contribuir a sus propiedades funcionales y beneficios para la salud.



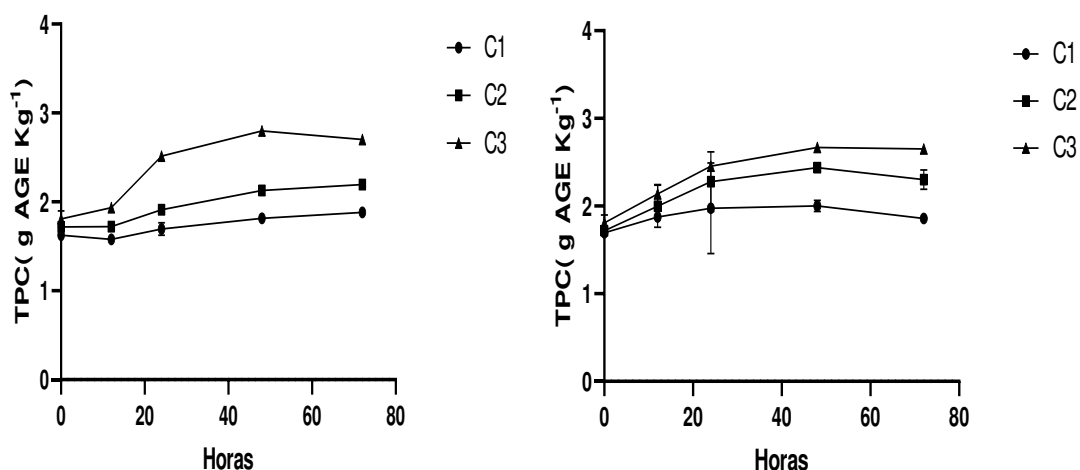


Figura 3.20. Variación del contenido fenólico total (TPC) de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ para distintos tipos de corte durante el almacenamiento a diferentes temperaturas a) 20°C, b) 15°C, c) 10°C, y d) 5°C.

Media $\pm$ desviación estándar (n=3). C1: GS entero. C2: GS cortado 6 mm, C3: GS cortado 1.5 mm.

Por otro lado, luego de 24h a 20°C, se determinaron diferencias significativas ($p < 0.05$) de TPC entre los diferentes cortes: C1 (2.4 g AGE Kg⁻¹) < C2 (2.6 g AGE Kg⁻¹) < C3 (2.9 g AGE Kg⁻¹). Posteriormente, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) de TPC entre los diferentes cortes de GS hasta las 72 h a 20°C. Un comportamiento similar se determinó para 15°C a las 24h, sin embargo, a las 48 h, se observó un incremento significativo del TPC para C3, con un aumento del 108% (3.5 g AGE Kg⁻¹) comparado con el valor de TPC C1 inicial (1.7 g AGE Kg⁻¹). En cuanto a GS con el corte C2 se evidenció un aumento del 73% (2.93 g AGE Kg⁻¹), y para C1 tuvo un aumento del 42% (2.40 g AGE Kg⁻¹) en comparación con GS sin ningún tipo de tratamiento, luego de 48h a 15°C (Figura 3.20 b). En la cáscara GS cortada y almacenada a 10°C, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre C1 y C2 a lo largo de las 72h de almacenamiento, mientras que para C3 los TPC incrementaron significativamente, alcanzando un valor máximo de 2.8 g AGE Kg⁻¹ GS a las 48 h (Figura 3.20 c). A 5°C, el aumento del TPC fue del 57% para C3, 44% para C2 y 18% para C1 en comparación con C1 a TM=0, manteniéndose la tendencia de que, a mayor intensidad de corte, mayor acumulación de compuestos fenólicos. La máxima acumulación de compuestos fenólicos a 5°C se produjo a las 48 h de almacenamiento (Figura 3.20 d). Los valores más altos de TPC se obtuvieron en GS con el corte C3 luego de 48 h a 15°C, alcanzando una concentración de 3.5 g AGE Kg⁻¹ GS.

El máximo valor de TPC obtenido por estrés por corte en GS es similar al reportado por Guyot et al. (2002) para la cáscara de manzana ‘Granny Smith’ con 3.1 y superior a lo reportado por Piagentini y Pirovani (2017) con 1.73 g AGE Kg⁻¹. También, fue superior a los TPC de la pulpa de manzana ‘Granny Smith’ (0.9-0.5 g AGE Kg⁻¹) reportados por Serra et al. (2021). Además, los valores de TPC obtenidos en GS estresada son superiores a los

reportados para la cáscara de diferentes cultivares de manzana regionales de Argentina, como 'Eva' (1.34 g Kg⁻¹), 'Caricia' (2.15 g Kg⁻¹), 'Princesa' (1.78 g Kg⁻¹) y cáscaras de variedades comerciales como 'Red Delicious' (2.41 g Kg⁻¹) (Piagentini y Pirovani, 2017; Rodríguez-Arzuaga et al., 2019). Similarmente a lo determinado para la actividad de las enzimas PAL y PPO, el contenido fenólico total (TPC) en GS aumentó rápidamente durante las primeras 12 h de almacenamiento, particularmente en los cortes de mayor intensidad (C2 y C3) a las diferentes temperaturas de almacenamiento. El TPC de GS alcanzó su máximo valor entre las 24-48 h de almacenamiento, correlacionando significativamente con las actividades de las enzimas PAL y PPO ($p < 0.001$), con R^2 0.77 y 0.70, respectivamente, como se presenta en la Tabla 3.26. Esto sugiere que una mayor intensidad del estrés por corte desencadena una activación significativa del metabolismo secundario en GS, dando lugar a la síntesis de compuestos fenólicos a un ritmo que supera su tasa de oxidación. Esto conduce finalmente a la acumulación de altos niveles de compuestos fenólicos. El modelo cuadrático reducido para determinar el contenido de fenoles totales (TPC) de GS con corte C3 en función del tiempo (TM) y la temperatura (ST) de almacenamiento, obtenido a partir de los datos experimentales, se muestra a continuación en la ecuación 3.8.

$$TPC_{C3} = 1.59682 + 0.021607 * ST + 0.035858 * ST - 2.92249E - 4 * TM^2 \quad Eq. \ 3.8.$$

3.5.2.4. Efecto del estrés por corte sobre el perfil de compuestos fenólicos de GS.

Este trabajo de tesis doctoral tuvo el objetivo identificar tentativamente los principales compuestos fenólicos en la cáscara de la manzana 'Granny Smith'. Como se describió anteriormente, las principales clases son los Flavan-3-oles con (+) catequina ((+)CTQN), (-) epicatequina ((-)EPQN); las Proantocianidinas con procianidina B2 (PACB2) y tetrámero de procianidina (PACT); los Ácidos fenólicos con ácido clorogénico (ACI); los Flavonoles con quercetina-3-O-glucurónido (Q3G), pentóxido de quercetina (QP), hexósido de quercetina (QHS) y kaempferol-3-O-glucurónido (K3G); y por último, las dihidrochalconas con fletina (FLN). Las Tablas 3.22 a 3.25 muestran los cambios en la concentración de los compuestos fenólicos específicos que se identificaron en la GS para diferentes tipos de corte (Ct), temperatura (ST) y tiempo (TM). La concentración inicial de (+)CTQN fue de 0.02 g/Kg GS (C1 TM=0). El proceso de biofortificación generó los aumentos más sustanciales en la concentración de (+)CTQN cuando se almacena el tejido GS a 15°C durante 72h, con un aumento de 356% para C2, seguido de C1 con 332%, y C3 con 314%, sin diferencias significativas entre tipo de corte (Ct) ($p > 0.05$). PACB2 fue identificado como el principal compuesto fenólico en GS, con un contenido de 0.24 g/kg GS, el cual fue significativamente afectado ($p < 0.05$) por las tres variables estudiadas, Ct,

ST, y TM, así como por la interacción entre Ct y TM ($p<0.01$) y sus términos cuadráticos, como se muestra en la Tabla 3.22. La aplicación de estrés por corte tuvo un efecto negativo inmediato sobre el PACB2 (Figura 3.21), reduciendo su concentración inicial (TM=0 h) hasta en un 28% para el C3, posiblemente debido a su susceptibilidad a la oxidación por la enzima PPO. De acuerdo con el análisis de correlación de Pearson (Tabla 3.26), el PACB2 tuvo una correlación altamente significativa ($P<0.001$) con la actividad de la enzima PPO (R^2 0.5). Sin embargo, durante el periodo de almacenamiento, se observó un aumento en la concentración de PACB2, alcanzando 0.31 g Kg^{-1} a 5°C (Tabla 3.25) y 0.28 g Kg^{-1} a 15°C (Tabla 3.23) (Figura 3.21).

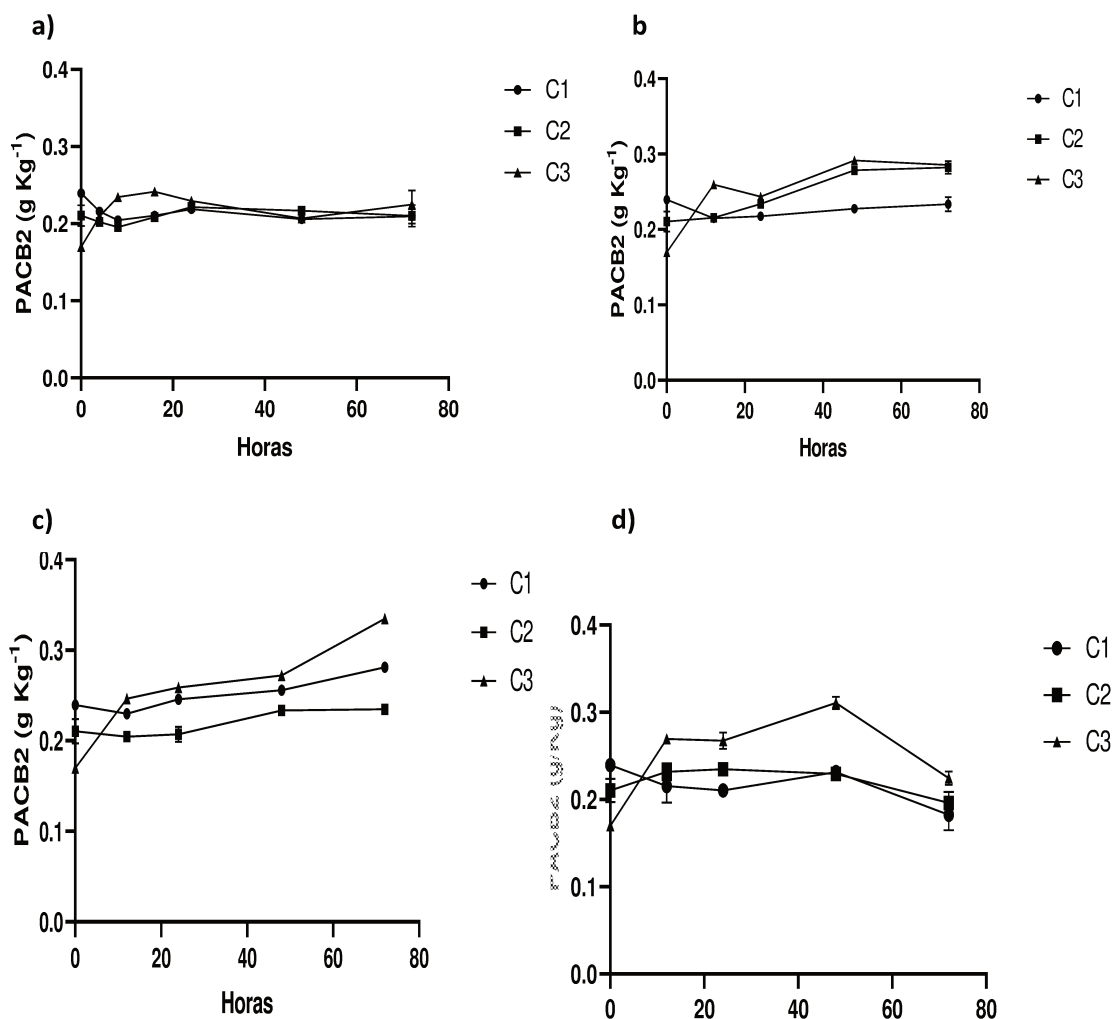


Figura 3.21. Concentración de procianidina B2 (PACB2) de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ con diferentes tipos de corte durante el almacenamiento a diferentes temperaturas a) 20°C, b) 15°C, c) 10°C, y d) 5°C.

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). C1: GS entera. C2: GS cortado 6 mm, C3: GS cortado 1,5 mm.

Estas concentraciones de procianidina B2 en GS estresada por corte fueron superiores a los reportados para pulpa de manzana ‘Granny Smith’ (0.10 g Kg⁻¹) y cáscara de manzana ‘Golden’ (0.08 g Kg⁻¹) (Escarpa & González, 1998). Como el compuesto fenólico principal de GS, los valores experimentales de PACB2 en GS con corte C3 se ajustaron adecuadamente al modelo cuadrático (ecuación 3.9) que permite evaluar el efecto del tiempo (TM) y la temperatura de almacenamiento (ST).

$$PACB2_{C3} = 0.16515 + 8.80818E - 003ST + 2.54653E - 003 * TM - 3.24339E - 005 * ST * TM - 3.93399E - 004 * ST^2 - 1.54401E - 055 * TM^2 \quad Ec \ 3.9.$$

Tabla 3.22. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ biofortificada con compuestos fenólicos a 20 °C.

Ct	TM (h)	(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	ACI	Q3G	QP	QHS	K3G	FLN
C1	0	0.02±0.002Ci	0.24±0.005Aab	0.10±0.003Ce	0.08±0.02Af	0.004±0.001Cg	0.04±0.003Ci	0.01±0.001Bb	0.02±0.0003De	0.06±0.01Cg	0.0002±0.00003De
	12	0.06±0.001Bgh	0.20±0.003Cde	0.10±0.002BCde	0.07±0.01Afgi	0.004±0.0001BCf _g	0.07±0.0003Bef	0.03±0.0004Aa _b	0.04±0.0004Acd	0.10±0.002Bdef	0.0006±0.000001Ccd _e
	24	0.06±0.002Bfg	0.21±0.002BCde	0.11±0.003ABc	0.08±0.003Afg	0.005±0.00001Be _f	0.07±0.001BABe	0.03±0.001Aab	0.04±0.0001Abc _d	0.10±0.01Bb-f	0.0009±0.0001Bbc
	48	0.06±0.001Bcd _e	0.22±0.0001Bcd	0.11±0.01Ac	0.09±0.007Af	0.005±0.00002Be _f	0.07±0.0005ABe	0.03±0.0002Aa _b	0.03±0.001Bd	0.15±0.002Aa	0.001±0.00002ABab
	72	0.07±0.001Aef	0.21±0.003Cde	0.11±0.01Ac	0.05±0.01Ai	0.013±0.0003Aa	0.08±0.0003Ade	0.03±0.0001Aa _b	0.03±0.0001Cde	0.15±0.01Aa	0.0011±0.00002Aab
C2	0	0.01±0.002Bi	0.21±0.01ABde	0.08±0.001Df	0.09±0.002Cef	0.002±0.00002Ci	0.05±0.002Bgi	0.04±0.005Aa	0.03±0.01Ade	0.09±0.02Cfg	0.0003±0.00005Be
	12	0.05±0.002Bef	0.20±0.003Be	0.11±0.0003Bcd	0.12±0.001Bde	0.003±0.00002Cg _i	0.09±0.005Acd	0.04±0.0001Aa _b	0.03±0.001Ad	0.09±0.008 Cfg	0.0009±0.0003ABbcd
	24	0.05±0.002Bbc _d	0.21±0.005ABde	0.11±0.001ABc	0.13±0.001Aa- _d	0.005±0.0006Bde	0.09±0.001Acd	0.04±0.0003Aa _b	0.03±0.002Ad	0.11±0.001ABA- _e	0.0011±0.0001Aab
	48	0.05±0.001Bb	0.22±0.002Abcd	0.11±0.001Ac	0.13±0.001Abc _d	0.006±0.0005Bd	0.09±0.0005Ac	0.04±0.0006Aa	0.04±0.0003Acd	0.14±0.001Aab _c	0.0011±0.00003Aab
	72	0.07±0.003Adef	0.22±0.0001A	0.10±0.001Ce	0.05±0.001Dgi	0.012±0.0004Ab	0.09±0.0004Ac	0.04±0.00002A _a	0.03±0.002Ad	0.15±0.0003Aa _b	0.0011±0.00001A
C3	0	0.03±0.002Ch	0.17±0.003Df	0.10±0.003De	0.13±0.001Bcd	0.002±0.00003Di	0.05±0.001Dfg	0.05±0.0005Aa	0.04±0.002Cbcd	0.09±0.01Cef	0.0004±0.00003Cde
	12	0.05±0.003Bb	0.23±0.005ABab _c	0.12±0.001Bb	0.15±0.002Aab _c	0.003±0.0001Cgi	0.10±0.0006Cc	0.02±0.03Aab	0.03±0.0007Dde	0.11±0.007BCc- _f	0.0009±0.00004Bab
	24	0.06±0.001ABa	0.24±0.001ABa	0.13±0.002ABa	0.16±0.002Aab	0.004±0.0002Bfg	0.13±0.001Bb	0.05±0.0001Aa	0.05±0.0007Aa	0.12±0.002ABa- _d	0.0011±0.0001ABab
	48	0.06±0.001Aa	0.23±0.001Babc	0.13±0.001Aa	0.16±0.001Ba	0.004±0.0002Bfg	0.14±0.0001ABa _b	0.04±0.001Aa	0.05±0.0004Bab _c	0.13±0.005Abc	0.0012±0.00001ABab
	72	0.06±0.001Abc	0.21±0.001Cde	0.11±0.01Cc	0.05±0.01Ci	0.009±0.0001Ac	0.15±0.01Aa	0.05±0.0005Aa	0.05±0.0009ABa _b	0.14±0.001Aab	0.0014±0.00013Aa

Ct: Tipo de corte. ST: Temperatura de almacenamiento. TM: Tiempo de almacenamiento. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre tiempos de almacenamiento para el mismo tipo de corte. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre los distintos tiempos de almacenamiento y tipos de corte.

Tabla 3.23. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ biofortificada con compuestos fenólicos a 15 °C.

Ct	TM (h)	(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	ACI	Q3G	QP	QHS	K3G	FLN
C1	0	0.02±0.001C _{gi}	0.24±0.004Acd _e	0.10±0.003Aefg	0.08±0.01Ai	0.004±0.001Cgi	0.04±0.002DI	0.01±0.001Ci	0.02±0.0003De	0.06±0.01Cg	0.0002±0.00002Eg
	12	0.05±0.003C _e	0.22±0.004Bfg	0.11±0.001Adef	0.09±0.005Ai	0.006±0.0001Be _f	0.08±0.0003Bg	0.03±0.0003Bg	0.02±0.001Cde	0.1±0.0001Bef	0.002±0.00007Bef
	24	0.08±0.0001Bd	0.22±0.005ABe _{fg}	0.10±0.006Ag	0.10±0.004Afg _i	0.007±0.0002Be _f	0.07±0.0016Ci	0.03±0.00001Afg	0.03±0.001Bcd	0.14±0.002Ab _c	0.0025±0.00003Ab _c
	48	0.10±0.003A _{ab}	0.23±0.002ABd _{-g}	0.11±0.005Ad-g	0.12±0.001Aef	0.011±0.001Abc	0.08±0.0007Bg	0.03±0.001Bg	0.03±0.001Bcd	0.15±0.0004A _{bc}	0.001±0.00002Dbc
	72	0.10±0.002A _{ab}	0.23±0.009ABd _{-g}	0.11±0.0007Ad _{-g}	0.12±0.004Aef _g	0.012±0.0001Ab	0.09±0.002Af	0.03±0.001Afg	0.04±0.001Abc	0.14±0.002Ab _c	0.0015±0.00003Cb _c
C2	0	0.01±0.001Di	0.21±0.01Bfg	0.08±0.001Ci	0.09±0.001Cgi	0.002±0.001Di	0.05±0.002Dk	0.04±0.005ABde	0.03±0.01Acde	0.09±0.02Bfg	0.0003±0.00005Ef _g
	12	0.06±0.001C _e	0.22±0.001Bfg	0.12±0.0003Ad	0.14±0.003Bd _e	0.006±0.0003Ce _f	0.10±0.001Ad	0.04±0.001Bef	0.04±0.0006Ab _c	0.09±0.001Bfg	0.0014±0.0006Bfg
	24	0.06±0.001Cf _e	0.23±0.005Bde _f	0.12±0.0005Ad	0.1±0.006Abc	0.008±0.001BC _{de}	0.09±0.001Cf	0.05±0.001Abc	0.04±0.0002Ab _{cd}	0.12±0.01ABc _{-f}	0.0026±0.00001Ac _{-f}
	48	0.08±0.01Bc _d	0.28±0.005Aab	0.11±0.01ABde	0.17±0.0004A _{bc}	0.009±0.002Bcd	0.09±0.0002BC _{ef}	0.04±0.0006ABc _{de}	0.05±0.002Aab	0.16±0.001Ab	0.001±0.00002Cb
	72	0.11±0.002A _a	0.28±0.008Aab	0.10±0.00004Be _{fg}	0.16±0.003Ac	0.015±0.003Aa	0.10±0.002ABd _e	0.04±0.0005Bef	0.05±0.0007Aa _b	0.11±0.001Bd _{ef}	0.0009±0.0004Dde _f
C3	0	0.03±0.001D _g	0.17±0.003Di	0.10±0.002Dfg	0.13±0.001De	0.002±0.00003C _i	0.05±0.001Dj	0.05±0.0004Cbc _d	0.04±0.001Dbc _d	0.09±0.006Cfg	0.0004±0.00004Df _g
	12	0.06±0.001C _e	0.26±0.001Bbc	0.17±0.001Aa	0.17±0.002Bb _c	0.006±0.0003Be _f	0.12±0.0003Cc	0.05±0.005Cbcd	0.05±0.0001Ca _b	0.11±0.001BC _{c-f}	0.0021±0.00001Bc _{-f}
	24	0.08±0.002B _{df}	0.24±0.004Ccd	0.14±0.0008Cb	0.15±0.002Cc _d	0.006±0.00001B _{fg}	0.16±0.002Bb	0.10±0.0005Aa	0.06±0.001Ba	0.14±0.001Bb _{cd}	0.0036±0.00001Ab _{cd}
	48	0.09±0.005A _{bc}	0.29±0.005Aa	0.16±0.004Bb	0.21±0.005Aa	0.007±0.0003Bd _{ef}	0.18±0.001Aa	0.05±0.002Bb	0.06±0.0002Aa	0.19±0.0004A _a	0.0018±0.00003Ba
	72	0.10±0.003A _{ab}	0.29±0.001Aa	0.15±0.002Cbc	0.19±0.008Bb	0.012±0.0001Ab	0.16±0.001Bb	0.04±0.001Dde	0.05±0.003Cab	0.13±0.02Bb-e	0.0014±0.00002Cb _{-e}

Ct: Tipo de corte. ST: Temperatura de almacenamiento. TM: Tiempo de almacenamiento. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Prociandina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre tiempos de almacenamiento para el mismo tipo de corte. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre los distintos tiempos de almacenamiento y tipos de corte

Tabla 3.24. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ biofortificada con compuestos fenólicos a 10°C.

Ct	TM (h)	(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	ACI	Q3G	QP	QHS	K3G	FLN
C1	0	0.02±0.001Di	0.24±0.004BC _{ef}	0.10±0.003Aab	0.08±0.01Bj	0.004±0.001Bef	0.04±0.002Cj	0.01±0.001Bk	0.02±0.0003Bg	0.06±0.01Ch	0.0002±0.00002Cf
	12	0.04±0.001Cg	0.23±0.006Cf	0.10±0.002Aa	0.11±0.01AB	0.005±0.0003ABcd	0.05±0.002Bi	0.03±0.0005Aj	0.02±0.0003Bfg	0.08±0.001BCe _{fg}	0.0026±0.00005Ac
	24	0.05±0.002Cf	0.25±0.004BC _{de}	0.05±0.004Ch	0.12±0.006ABe _h	0.005±0.0002ABbc	0.06±0.002Ag	0.03±0.0009A _{hi}	0.02±0.001Befg	0.11±0.008ABb _c	0.0003±0.00007BC _{ef}
	48	0.06±0.004Bde	0.26±0.001Bcd	0.07±0.004B	0.12±0.008ABe _g	0.006±0.0004Aab	0.07±0.0005Ae _f	0.03±0.001Ahi	0.02±0.011Bfg	0.1±0.0003BCc _{-f}	0.0005±0.00001Be _f
	72	0.07±0.002Ab	0.28±0.005Ab	0.06±0.0002B _{Cg}	0.15±0.01Abc	0.008±0.0007Aa	0.06±0.00001A _{fg}	0.03±0.0005A _{hi}	0.03±0.004Acd _e	0.15±0.02Aa	0.0003±0.00001BC _{ef}
C2	0	0.01±0.001Dj	0.21±0.01ABg	0.08±0.001Cde	0.09±0.001Cij	0.002±0.001Bg	0.05±0.002Ci	0.04±0.005Ad _e	0.03±0.013Adef	0.09±0.02Bd-g	0.0003±0.00005Be _f
	12	0.05±0.001Cf	0.20±0.004Bg	0.09±0.001Bc	0.11±0.006Bghi	0.002±0.002Bg	0.06±0.002Bg	0.04±0.001Afg	0.04±0.001Aab _c	0.08±0.001Bfg	0.0035±0.0004Ab
	24	0.06±0.001Be	0.21±0.008ABg	0.07±0.001Df	0.13±0.004ABd _{ef}	0.003±0.002ABfg	0.07±0.002ABd _e	0.04±0.001Aef	0.04±0.001Aab	0.15±0.001Aa	0.0007±0.0003Bde
	48	0.06±0.001Bde	0.23±0.003ABf	0.08±0.0008Cc _d	0.13±0.003Acde	0.003±0.002ABef	0.08±0.005Ab	0.04±0.0003A _{de}	0.03±0.0002Ab _{cd}	0.14±0.001Aa	0.0005±0.00003Be _f
	72	0.09±0.002Aa	0.24±0.0004Ae _f	0.09±0.001Ab	0.14±0.004Abcd	0.004±0.002Ade	0.07±0.001ABf _g	0.03±0.002Ag _h	0.03±0.0003Ab _{cd}	0.11±0.001ABb _c	0.0003±0.0001Bef
C3	0	0.03±0.001Ch	0.17±0.003Dh	0.10±0.002Aab	0.13±0.004BCd _{-g}	0.002±0.00003Bg	0.05±0.001Ch	0.05±0.0004B _{bc}	0.04±0.001Aab _c	0.09±0.006BCd _{-g}	0.0004±0.00004Be _f
	12	0.06±0.001Bd _e	0.25±0.003Cd _e	0.10±0.001Aa	0.13±0.003BCc _{de}	0.003±0.00003ABe _{fg}	0.07±0.003Bde	0.04±0.0007B _{cd}	0.04±0.002Aa	0.10±0.004Bcd _e	0.004±0.0002Aa
	24	0.06±0.0004B _d	0.26±0.001B _{Cc}	0.07±0.001Cf	0.15±0.007ABb	0.003±0.0002ABef	0.07±0.0007Bc _d	0.05±0.001Bb _c	0.03±0.0004Bb _{cd}	0.12±0.001Ab	0.001±0.0002Bd
	48	0.07±0.004A _{Bc}	0.27±0.004Bb	0.08±0.001Bd _e	0.17±0.007Aa	0.004±0.001ABef	0.11±0.003Aa	0.06±0.002Aa	0.04±0.001Aab	0.10±0.002Bb _{cd}	0.001±0.0001Bd
	72	0.07±0.0003A _b	0.34±0.005Aa	0.07±0.004B _{Ce}	0.10±0.02Chi	0.004±0.0002Ade	0.08±0.0005Bb _c	0.05±0.0004B _b	0.02±0.001Cf _g	0.08±0.001Cgh	0.0003±0.0002Bef

Ct: Tipo de corte. ST: Temperatura de almacenamiento. TM: Tiempo de almacenamiento. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre tiempos de almacenamiento para el mismo tipo de corte. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre los distintos tiempos de almacenamiento y tipos de corte.

Tabla 3.25. Influencia del estrés por corte y del tiempo de almacenamiento en el perfil de compuestos fenólicos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ biofortificada con compuestos fenólicos a 5°C.

Ct	TM (h)	(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	ACI	Q3G	QP	QHS	K3G	FLN
C1	0	0.02±0.001Cg	0.24±0.004Acde	0.10±0.003Bc	0.08±0.01Cg	0.004±0.0008BCb	0.04±0.002Be	0.01±0.001Be	0.02±0.001Cg	0.06±0.012B	0.0002±0.0002Bi
	12	0.04±0.001Aabc	0.22±0.02ABdef	0.12±0.003Adef	0.10±0.01BCf	0.006±0.001ABab	0.04±0.001Bde	0.02±0.01ABde	0.02±0.001Cfg	0.06±0.001AB	0.0007±0.0001Ai
	24	0.04±0.002ABbcd	0.21±0.01ABef	0.12±0.004Aef	0.14±0.001Bcd	0.007±0.0001Aab	0.04±0.001Bde	0.02±0.001ABd	0.02±0.001Cfg	0.07±0.004AB	0.0003±0.00005ABhi
	48	0.04±0.005Aab	0.23±0.01ABcde	0.12±0.004Acde	0.14±0.01Bcd	0.007±0.003Aab	0.05±0.01Bde	0.02±0.001ABd	0.02±0.002Bef	0.07±0.01AB	0.0004±0.0002ABf-i
	72	0.03±0.0002BCfg	0.18±0.02Bgh	0.05±0.004Cfg	0.19±0.04Aa	0.003±0.0004Cb	0.09±0.01Aa	0.05±0.01Aab	0.04±0.01Ab	0.09±0.007A	0.0004±0.00002ABb-e
C2	0	0.01±0.001Dh	0.21±0.01Aef	0.08±0.001BCef	0.09±0.02Dfg	0.002±0.0007Ab	0.05±0.002Cde	0.04±0.005Bbc	0.03±0.001Aef	0.09±0.02A	0.0003±0.00005Bc-f
	12	0.03±0.001Cfg	0.23±0.02Acd	0.08±0.002ABCcd	0.12±0.004Ce	0.005±0.001Aab	0.07±0.002BCc	0.04±0.02Bc	0.03±0.001Acde	0.08±0.002A	0.0007±0.0002Ad-g
	24	0.04±0.002Bbcd	0.24±0.01Acd	0.09±0.001ABcd	0.12±0.004Ce	0.005±0.002Aab	0.09±0.008Aa	0.04±0.001Bbc	0.03±0.001Ade	0.10±0.002A	0.0005±0.00018ABabc
	48	0.04±0.001Aa	0.23±0.01Acde	0.10±0.001Acde	0.14±0.007Bc	0.002±0.0004Aab	0.08±0.008ABb	0.05±0.001Aa	0.03±0.01Ade	0.10±0.02A	0.0005±0.00008ABa-d
	72	0.03±0.0003Bcde	0.20±0.02Afg	0.07±0.01Cfg	0.17±0.004Ab	0.02±0.0004Aa	0.09±0.002Aa	0.04±0.01Bbc	0.04±0.004Abcd	0.10±0.004A	0.0004±0.00008ABab
C3	0	0.03±0.001Ade	0.17±0.003Dh	0.10±0.002Bg	0.13±0.01Cde	0.002±0.0003Bb	0.05±0.001Bd	0.05±0.003Aabc	0.04±0.001Bbcd	0.09±0.006BC	0.0004±0.00004Ab-e
	12	0.03±0.001Ade	0.27±0.02Bb	0.09±0.006Bb	0.12±0.01Ce	0.003±0.001ABb	0.07±0.001Bc	0.04±0.003Abc	0.04±0.001Bb	0.10±0.03AB	0.0006±0.00009Aabc
	24	0.04±0.002A	0.27±0.01Bb	0.10±0.003ABb	0.14±0.005BC	0.004±0.0005A	0.07±0.003Bbc	0.04±0.001Abc	0.04±0.01ABbc	0.11±0.001A	0.0006±0.00004Aa
	48	0.03±0.001Ade	0.23±0.01Aa	0.12±0.002Aa	0.15±0.005Bc	0.004±0.020Aab	0.09±0.006Aa	0.05±0.001Aab	0.04±0.003ABb	0.10±0.002AB	0.0003±0.00008Aa-d
	72	0.03±0.001Aef	0.22±0.02Ccde	0.07±0.004Ccde	0.20±0.0081Aa	0.004±0.020ABb	0.10±0.005Aa	0.05±0.001Aabc	0.05±0.003Aa	0.08±0.003C	0.0003±0.0001Ae-h

Ct: Tipo de corte. ST: Temperatura de almacenamiento. TM: Tiempo de almacenamiento. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procidanidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre tiempos de almacenamiento para el mismo tipo de corte. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) mediante la prueba de Tukey entre los distintos tiempos de almacenamiento y tipos de corte.

La (-)EPQN mostró un aumento máximo del 60% para GS con el corte C3 almacenado a 15°C durante 48 h, pasando de 0.1 a 0.16 g Kg⁻¹ de GS. Del mismo modo, la concentración de PACT aumentó hasta un 156% al aplicar C3 y almacenar durante 48 h a 15°C (Tabla 3.23). El ACI es uno de los principales compuestos fenólicos en la pulpa de la manzana 'Granny Smith', pero en la cáscara es un compuesto menor (Łata et al., 2009). Sin embargo, el estrés abiótico causado por el corte y almacenamiento permitió un incremento significativamente mayor cuando se aplicó el corte C2 y se almacenó a 5°C durante 72 h (Tabla 3.25). Los flavonoles fueron la segunda clase de compuestos fenólicos presentes en GS, estos metabolitos secundarios fueron los únicos que mostraron un efecto significativo inmediatamente después de someter GS a estrés por corte. El Q3G comenzó con una concentración media de 0.04 g Kg⁻¹ de GS y aumentó significativamente ($p<0.05$) en un 23% para C2 (0.047 g Kg⁻¹) y 40% para C3 (0.054 g Kg⁻¹), con una acumulación máxima de 0.18 g Kg⁻¹ (370% superior a C1 TM=0) cuando se almacenó a 15°C durante 48 h (Tabla 3.23).

Dado que el Q3G mostró una correlación altamente significativa con la actividad PAL ($p<0.001$ R² 0.72), podemos afirmar que la quercetina se modula como uno de los metabolitos más importantes de la respuesta sistémica en GS para defenderse de la condición de estrés abiótico impuesta (Tabla 3.26). Del mismo modo, C3 generó un aumento inmediato de QP en un 400%, que a las 24 h a 15°C mostró un aumento de 900%, de 0.01 g Kg⁻¹ a 0.10 g Kg⁻¹. Para QHS y K3G, C3 también generó un aumento máximo de 200% y 216%, respectivamente, luego de 48 h a 15°C. (Tabla 3.23). La chalcona FLN mostró un aumento significativo de 800% con C3 a 15°C por 48 h, indicando su importante participación en la respuesta sistémica del GS, ya que las chalconas desempeñan diferentes funciones biológicas en las plantas, tales como fertilidad, pigmentación, polinización y regulación del crecimiento (Rammohan et al., 2020). El total de los compuestos individuales identificados (TPC_{HPLC}) se vio afectada significativamente por la intensidad de corte (Ct), la temperatura de almacenamiento (ST) y el tiempo de almacenamiento (TM) ($p<0.001$), así como por los factores cuadráticos ST² y TM² ($p<0.01$) (Tabla 3.21). La aplicación del daño por corte de mayor intensidad (C3) aumentó inmediatamente el TPC_{HPLC} en un 14.2% en comparación con C1. Este comportamiento fue similar al observado para los compuestos (+)CTQN, PACT, Q3G y QHS.

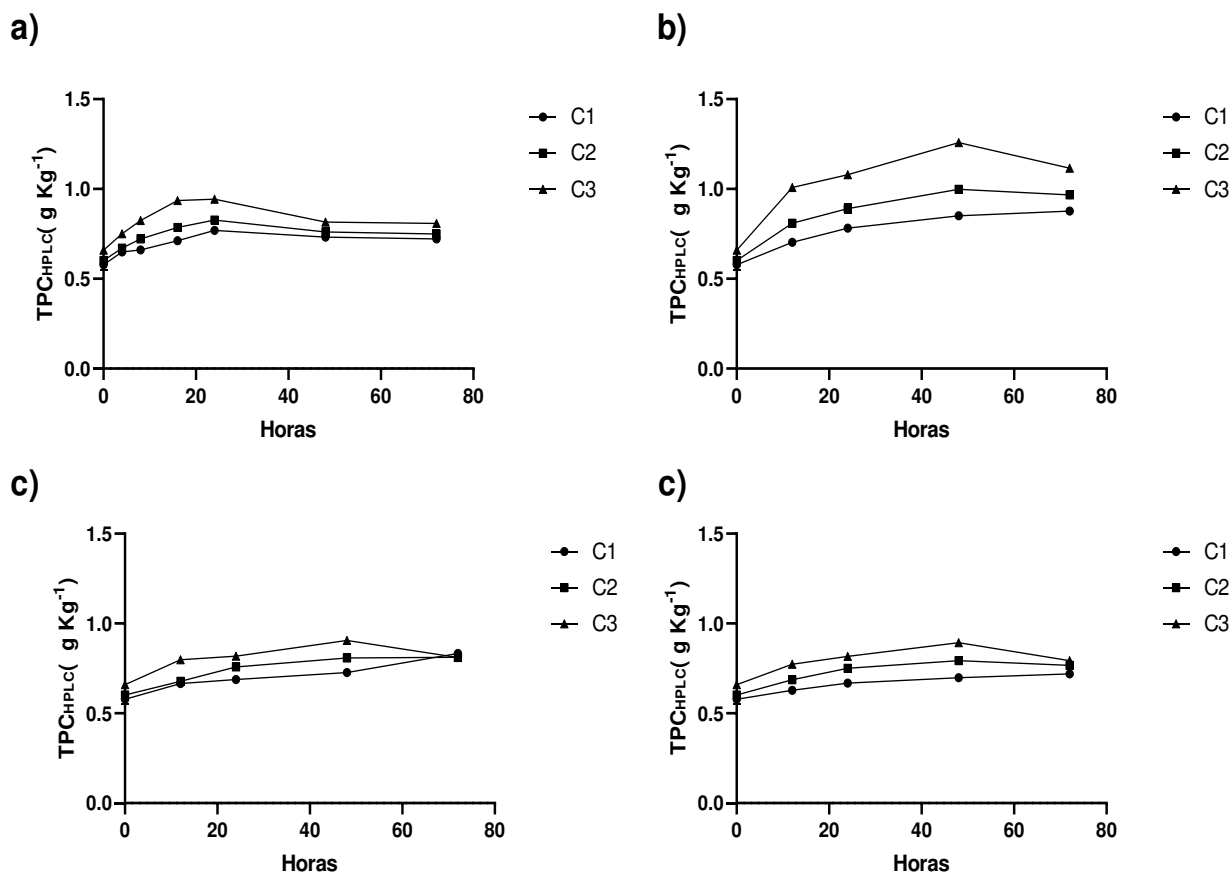


Figura 3.22. Variación del contenido fenólico total determinado por HPLC (TPC_{HPLC}) de cáscara de manzana 'Granny Smith' con diferentes tipos de corte durante el almacenamiento a diferentes temperaturas a) 20°C, b) 15°C, c) 10°C, d) 5°C.

Promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). C1: GS entera. C2: GS cortado 6 mm, C3: GS cortado 1.5 mm.

La mayor acumulación de compuestos fenólicos en GS se observó a una temperatura de almacenamiento de 15°C (Figura 3.22). A lo largo del período de almacenamiento a 15°C, se mantuvo la tendencia de mayor contenido de TPC_{HPLC} para C3, con un aumento significativo superior de 118% (1.26 g Kg⁻¹) a las 48 h, seguido por C2 con 73% (1.00 g Kg⁻¹), y finalmente la cáscara entera C1 con 47% (0.85 g Kg⁻¹). Los valores obtenidos para el GS biofortificado con C3 a 15 °C y 48 h fueron 35%, 28% y 29% más altos en comparación con los valores de TPC_{HPLC} para C3 y 48h de almacenamiento a 20°C, 10°C y 5°C, respectivamente (Figura 3.22). Estos resultados sugieren que la temperatura de almacenamiento de 15°C favorece el metabolismo secundario del GS. El modelo cuadrático reducido que permite la predicción de TPC_{HPLC} para el corte 3 (C3) en función del tiempo (TM) y Temperatura (ST) de almacenamiento se muestra en la ecuación 3.10.

Tabla 3.26. Coeficientes de correlación para diferentes variables implicadas en el proceso de biofortificación por corte de cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

	PAL	PPO	TPC	TPC _{HPLC}	(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	ACI	Q3G	QP	QHS	K3G	FLN
PAL	-													
PPO	0.6029***	-												
TPC	0.7704***	0.7003***	-											
TPC_{HPLC}	0.8033***	0.7194***	0.8734***	-										
(+)CTQN	0.7337***	0.3953***	0.6498***	0.7426***	-									
PACB2	0.4956***	0.5128***	0.5276***	0.5615***	0.4080***	-								
(-)EPQN	0.3185***	NS	0.4541***	0.5369***	0.3360***	NS	-							
PACT	0.3685***	0.6711***	0.4802***	0.6642***	0.2824**	0.3125***	0.1990*	-						
ACI	0.2304**	0.2868***	0.3361***	0.2934***	0.3571***	NS	NS	NS	-					
Q3G	0.7166***	0.5938***	0.8202***	0.8839***	0.5811***	0.3297***	0.5275***	0.5123***	0.2504**	-				
QP	0.4869***	0.5058***	0.5100***	0.5390***	NS	NS	NS	0.3964***	NS	0.5485***	-			
QHS	0.6036***	0.5588***	0.6842***	0.7741***	0.4529***	0.1883*	0.3837***	0.5352***	NS	0.7877***	0.6613***	-		
K3G	0.6697***	0.3877***	0.6138***	0.6986***	0.6826***	0.1928*	0.2553**	0.2107*	0.2947***	0.6060***	0.3423***	0.5486***	-	
FLN	0.3846***	NS	0.2489***	0.4110***	0.4199***	NS	0.4120***	NS	NS	0.3988***	0.3314***	0.3523***	0.3117***	-

PAL: actividad fenilalanina amoniaco liasa; PPO: actividad polifenol oxidasa; TPC: contenido fenólico total; TPC_{HPLC}: contenido fenólico total por HPLC. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetramero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina. NS: no significativo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

$$TPC_{HPLC-C3} = 0.48087 + 0.039566 * ST + 9.85374E - 003 * ST - 1.37746E - 003 * ST^2 - 9.97415E - 005 * TM^2 \quad Ec \quad 3.10.$$

Estas condiciones de biofortificación con compuestos fenólicos en GS, los TPC_{HPLC} muestran una correlación significativa con la actividad de las enzimas PAL y PPO, así como con la TPC determinada por la metodología de Folin-Ciocalteu ($p < 0.001$ R^2 0.80, 0.72, y 0.87, respectivamente), según la Tabla 3.26. Por lo tanto, el uso de diferentes intensidades de corte, temperaturas y tiempos de almacenamiento para modular la síntesis de compuestos fenólicos en subproductos agroindustriales de manzanas ‘Granny Smith’ es factible, demostrando ser una herramienta segura, simple y eficiente. Los resultados observados concuerdan con estudios previos sobre la relación entre la intensidad de corte, la tasa de respiración y la activación del metabolismo de los tejidos vegetales. Cuanto mayor es la intensidad de corte, mayor es la tasa de respiración, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), etileno y ácido jasmónico, que a su vez estimulan el metabolismo primario y secundario del tejido vegetal (Villarreal-García et al., 2016). Sin embargo, según Torres-Contreras et al. (2023), la modulación del metabolismo secundario es específica de cada tejido, lo que resalta la importancia de estudiar el proceso de biofortificación en el caso del GS, donde se carece de dicha información. De forma similar, un estudio previo sobre brócoli sometido a estrés por corte y almacenado hasta 48 h mostró que la máxima acumulación de compuestos fenólicos, principalmente ácido cafeico, se produjo a las 36 horas (Guan et al., 2020).

3.5.2.5. Condiciones óptimas del proceso de biofortificación por corte de GS

Un diseño factorial completo, como el utilizado en este caso, es un diseño experimental de superficie de respuesta que puede utilizarse para optimizar múltiples respuestas simultáneamente (Cheng, 2016). Los datos obtenidos de las principales respuestas (PAL, PPO, TPC, PACB2, TPC_{HPLC}) estudiadas en el proceso de biofortificación por corte de GS se ajustaron adecuadamente a ecuaciones de segundo orden (Ecuaciones 3.6-3.10). Mediante el uso de la función de deseabilidad, se realizó la optimización de múltiples respuestas, determinando las condiciones experimentales que maximizan la actividad de PAL, TPC, la concentración de PACB2, y TPC_{HPLC} , y minimice la actividad de PPO, y dando como resultado una deseabilidad de 0.72 para el proceso de biofortificación por corte de GS con C3, una ST de 17°C y un TM de 56 h.

En las condiciones óptimas determinadas, se validaron experimentalmente los modelos de predicción desarrollados para el proceso de biofortificación por corte de GS. Para la actividad PAL, el valor predicho fue de $0.12 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, significativamente mayor ($p < 0.05$) que el valor experimental obtenido ($0.09 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Sin embargo, este valor fue

superior al observado en el GS inicial, lo que indica la activación del metabolismo secundario del GS debido al estrés por corte y almacenamiento. En cuanto a la actividad PPO, el valor experimental fue de $0.195 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, significativamente superior al valor predicho de $0,18 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. En cuanto a los valores de TPC y TPC_{HPLC} , no hubo diferencias significativas entre los valores predichos ($3.0 \text{ g AGE Kg}^{-1}$, $1.0 \text{ g Kg}^{-1} \text{ GS}$, respectivamente) y los experimentales ($2.7 \text{ g AGE Kg}^{-1}$; $0.90 \text{ g Kg}^{-1} \text{ GS}$, respectivamente) validándose los modelos de predicción desarrollados. Sin embargo, para PACB2, el valor experimental (0.28 g Kg^{-1}) fue significativamente superior ($p < 0.05$) al valor predicho (0.26 g Kg^{-1}).

Considerando que el objetivo de la aplicación del estrés por corte en GS es lograr la mayor acumulación de compuestos fenólicos con alto potencial bioactivo, los resultados obtenidos son alentadores. Se observó que la actividad de la PAL correlaciona con la acumulación de compuestos fenólicos. Aunque la PPO oxida los monofenoles, también está relacionada con la síntesis de nuevos fenoles en el equilibrio de la tasa de oxidación y síntesis de compuestos fenólicos (Araji et al., 2014). En cuanto a TPC y TPC_{HPLC} , no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en sus medias entre los valores experimentales y los predichos, lo que indica la validez y reproducibilidad del proceso de optimización. Este ensayo de biofortificación por corte de GS con compuestos fenólicos demuestra el potencial de este subproducto de la manzana 'Granny Smith' como fuente rica en compuestos fenólicos a través de una tecnología de bajo coste como el estrés de corte y el almacenamiento.

3.5.3. Efecto combinado del tipo de corte (Ct), la temperatura de almacenamiento (ST) y la dosis de radiación UVA en la cáscara de manzana (GS)

3.5.3.1. Efecto sobre la actividad de la enzima PAL en cáscara de manzana 'Granny Smith'.

Para optimizar el potencial metabólico de los subproductos agroindustriales derivados de la manzana 'Granny Smith', el presente estudio empleó una estrategia combinada que involucra el estrés inducido por corte, la exposición a radiación UVA y la manipulación de la temperatura de almacenamiento como estímulos para potenciar la biofortificación de GS mediante la acumulación de compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos a través del análisis de varianza (ANOVA) presentados en la Tabla 3.27 indican que el tipo de corte (Ct, $p < 0.01$), la temperatura de almacenamiento (ST, $p < 0.01$) y la dosis de radiación UVA (UVA, $p < 0.001$) ejercieron un efecto significativo sobre la actividad de la enzima PAL (fenilalanina amonio-*liasa*). Las variaciones porcentuales de las respuestas analizadas se presentan en la Tabla 3.28.. La actividad PAL mostró un efecto inmediato

cuando se sometió a radiación UVA, ya que mostró incrementos entre 110% y 142% después de 3 horas de radiación (UVA3), y de 44% a 148% después de 6 horas de radiación (UVA6). Para ambas dosis, no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre los diferentes cortes (Tabla 3.28). El almacenamiento de GS con los diferentes cortes (C1, C2, C3) durante 56 h a 20°C tras la radiación UVA6 afectó negativamente a la actividad PAL, ya que mostró reducciones de hasta el 58% para C1. Para ST 15°C, se observaron aumentos de la actividad PAL de hasta un 193% para C3 UVA3 ($0.11 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), que fue significativamente mayor ($p<0.05$) que para C1 y C2 ($0.07\text{-}0.09 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), además de ser mayor que para UVA6 en estas mismas condiciones, y mayor que para UVA3 para 10 y 5°C (Tabla 3.28).

Tabla 3.27. ANOVA para la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), contenido de procianidina B2 (PACB2), contenido de fenoles totales (TPC), contenido de fenoles totales por HPLC (TPC_{HPLC}) para el biofortificación de cáscara de manzana 'Granny Smith'.

Fuente de variación	GL	PAL	PPO	TPC	PACB2	TPC _{HPLC}
Ct	2	**	*	**	**	***
ST	1	**	*	**	*	**
UVA	1	***	*	**	**	*
Ct x ST	2	ns	ns	ns	ns	ns
Ct x UVA	2	ns	ns	ns	*	ns
ST x UVA	1	ns	*	ns	ns	ns
Ct ²	1	ns	ns	ns	ns	ns
ST ²	1	**	ns	ns	ns	ns
UVA ²	1	***	ns	***	***	*
Ct x ST x UVA	2	ns	ns	ns	ns	ns
Ct x ST ²	2	ns	ns	ns	ns	ns
Ct x UVA ²	2	ns	ns	ns	ns	ns
ST ² x UVA	1	ns	ns	ns	ns	ns
ST x UVA ²	1	ns	ns	ns	ns	ns
R ²	-	0.85	0.78	0.75	0.72	0.69
Falta de ajuste	34	ns	ns	ns	ns	ns

Ct: Tipo de corte, ST: Temperatura de almacenamiento, UVA: dosis de radiación UVA, GL: Grados de libertad. *: $p\leq 0.05$; **: $p\leq 0.01$; ***: $p\leq 0.001$. ns: $p>0.05$.

Estos resultados indican una inducción tardía y progresiva del metabolismo secundario del GS después del corte y la radiación UVA3, similar a lo reportado para los arándanos irradiados con UV-B, donde la expresión de genes relacionados con PAL alcanzó su máximo a las 24 horas (Song et al., 2022). Por otro lado, UVA3 mostró mayores incrementos en la actividad PAL en comparación con UVA6 en el C3 a 10 y 5°C, esto se debe probablemente a la sobreexposición de energía del GS durante UVA6 que satura los

fotoreceptores UVA del GS y acelera el proceso de senescencia del tejido vegetal (Isah, 2019).

Tabla 3.28. Variación porcentual de la actividad de la enzima fenilalanina amoníaco liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), contenido de fenoles totales (TPC y TPC_{HPLC}) en diferentes condiciones de biofortificación de la cáscara de manzana ‘Granny Smith’ (GS).

Respuesta (%)	Ct	Inicial		20°C		15°C		10°C		5°C	
		UVA3	UVA6	UVA3	UVA6	UVA3	UVA6	UVA3	UVA6	UVA3	UVA6
PAL	C1	110.80aA*	44.03aAB	149.21aA*	-58.31aC	127.88bA	68.11aA	113.59bA*	8.80aB	108.22bA*	-52.76aC
	C2	115.32aB	148.32aA	143.67aA*	-19.47aBC	162.42abA*	102.56aA	114.33bB*	16.22abB	149.11aA*	-60.84aC
	C3	142.99aB	148.32aA	172.82aAB*	-9.99aB	193.34aA*	38.72aA	145.02aAB*	-64.55bBC	139.68aB*	-72.94aC
PPO	C1	6.40aB	-10.21aC	469.98aA	112.67aA	-0.16cB	63.97bAB	128.74bB	-32.69bC	-8.04bB	2.82bBC
	C2	57.81aC*	26.96aB	354.87aA*	138.75aA	24.66bC	49.94bB	130.30aB	69.74aB	56.94aC	29.24bB
	C3	7.32aB	1.58aC	470.60aA	156.23aA	108.99aB	95.23aB	96.01abB	115.90aAB	53.42aB	92.54aB
TPC	C1	104.64bA*	21.89bC	94.19bA*	58.75bA	99.15cA	32.42bBC	118.86bA	45.87aAB	43.16bB*	19.680aC
	C2	76.10bB*	-2.56bC	70.06bBC*	41.10bA	135.42bA*	20.97bB	93.49aBA	-7.38bC	28.17aC*	-6.36aC
	C3	85.08aB*	12.46aC	99.84aB	76.38aA	174.37aA*	41.53aB	103.66aB*	-17.36bD	21.28aC*	-12.26aD
TPC _{HPLC}	C1	19.74bB	66.76aA	50.97bA	21.67a	53.60cA	37.43aA	31.58aAB	22.84aA	46.65cA	35.35aA
	C2	33.64abB	33.98aA	44.69abB*	0.51aA	62.32bA	49.12aA	30.69aB	-13.32aA	4.84abC	-1.75aA
	C3	80.77aC	72.59aA	67.05aC*	21.98aBC*	126.15aD*	57.36aAB	32.88aC*	5.53aC	12.93aD	7.94aC

Ct: Tipo de corte. C1: GS entera. C2: Corte GS 5 mm. C3: Corte GS 1,5 mm. UVA3: Radiación UVA (86.4 KJ/m²). UVA6: Radiación UVA (172.8 KJ/m²). Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por la prueba de Tukey entre cada tipo de corte. Letras mayúsculas diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por la prueba de Tukey entre las diferentes temperaturas de almacenamiento a cada dosis de radiación UVA. *: significa diferencias significativas ($p \leq 0.05$) mediante la *t-test* entre las distintas dosis de radiación UVA en cada condición de almacenamiento.

3.5.3.2. Efecto sobre la actividad de la enzima PPO.

Los resultados mostraron que el estrés Ct y las diferentes UVA afectaron significativamente ($p < 0.05$) la actividad PPO del GS, así como la interacción entre ST y UVA, como se muestra en la Tabla 3.27. Al inicio del experimento (tiempo 0), la actividad PPO de todo el tejido GS fue de $0.08 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Inmediatamente después de la radiación UVA, la actividad PPO para C2 aumentó a $0.14 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ con UVA3 y $0.12 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ con UVA6. El efecto tardío de los elicitors de biofortificación de GS mostró que el almacenamiento a 20°C con UVA3 favoreció la actividad PPO (como se muestra en la Tabla 3.28) observándose incrementos de hasta 470% para los diferentes cortes, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos.

Los incrementos en la actividad PPO para UVA6 a 20°C oscilaron entre 112-156% sin diferencias entre Ct, ya que esta ST es la más cercana a la temperatura óptima de trabajo de la PPO (37°C) (Araji et al., 2014). Sin embargo, para C1, se evidenció un efecto inhibitorio de la PPO para UVA6 a 10 °C ($0.05 \Delta A \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), similar al reportado por Müller et al. (2014), donde lograron una inhibición de la actividad de la PPO en jugo de manzana a una dosis de 100 KJ L^{-1} aplicando UV-C. En los experimentos realizados en (GS), no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos UVA3 y UVA6 para cada tipo de corte examinada a 15, 10 y 5°C (Tabla 3.28). Sin embargo, los resultados mostraron que los elicitores estudiados activaron el metabolismo secundario del GS, como lo demuestra el aumento de la actividad PAL y el comportamiento de la PPO, que mostró una débil correlación significativa ($p < 0.05$ R^2 0.26) con la actividad de la enzima PAL (Tabla 3.30). Estos resultados se atribuyen al hecho de que la enzima PPO oxida los compuestos fenólicos en compuestos coloreados denominados o-quinonas, aumentando la síntesis y la tasa de acumulación de compuestos fenólicos para ayudar al tejido vegetal a defenderse contra las condiciones de estrés. Se ha informado del uso de radiación LED UV-A (390 nm) como alternativa ecológica, segura y de bajo coste para el control del pardeamiento enzimático de la pulpa de manzana ‘Granny Smith’ recién cortada irradiada durante 60 minutos (Lante et al., 2016). Sin embargo, su efecto sobre la cáscara de la manzana ‘Granny Smith’ y su efecto sinérgico con el estrés por daño mecánico (corte) como elicitores para biofortificar este residuo agroindustrial con compuestos fenólicos no tiene precedentes.

3.5.3.3. Efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC)

Como se analizó previamente, el GS tiene un potencial importante como fuente de compuestos fenólicos con actividad antioxidante y pectina, así como su obtención secuencial para un aprovechamiento integral de este subproducto- Además, el GS puede ser propuesto como una biofábrica de compuestos fenólicos, aprovechando su capacidad metabólica a través de su modulación por medio de la aplicación estrés abiótico. Como lo muestra la Tabla 3.27, el uso de Ct, UVA, y los diferentes ST afectaron significativamente ($p < 0.01$) el TPC. Además, el factor cuadrático de UVA² también afectó significativamente ($p < 0.05$) el TPC.

Inmediatamente después del estrés por corte, las GS mostraron un aumento en TPC, con C1 a $1.10 \text{ g AGE Kg}^{-1}$, C2 a $1.31 \text{ g AGE kg}^{-1}$, y C3 a $1.46 \text{ g AGE kg}^{-1}$. Cuando se sometieron a UVA, se observaron aumentos significativos en la acumulación de TPC. Entre los tratamientos con UVA, UVA3 mostró el mayor incremento porcentual, para C1 con un 104%, superior a los obtenidos para C2 y C3 (76% y 86%, respectivamente), en comparación con cada tipo de corte sin radiación. Sin embargo, para todas las Ct con

UVA3, los TPC fueron superiores a los obtenidos con UVA6, donde el efecto inmediato generó un aumento del TPC de sólo un 22% para C1 y un 12% para C3, mientras que para C2, los TPC se redujeron en un 2.6%. Similarmente a lo determinado para la actividad de las enzimas PAL y PPO, el mayor aumento en compuestos fenólicos luego de 56 h de almacenamiento de GS biofortificados se observó para C3 con UVA3 a 15°C, correlacionando con el incremento en la actividad de PAL y PPO (R^2 0.73 y 0.35 respectivamente). En dichas condiciones, el mayor incremento ($p<0.05$) en TPC, entre todos los tratamientos aplicados, fue de 174% (4.0 g AGE Kg⁻¹), siendo significativamente mayor que el TPC para UVA6 (2.06 g AGE Kg⁻¹). Por otra parte, el tratamiento UVA con una dosis de 172.8 KJ m⁻² (UVA6), almacenado a 5°C durante 56 horas, afectó negativamente al TPC. Concretamente, para C2 y C3, se produjo una reducción del 6% y del 12%, respectivamente (Tabla 3.28).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran un efecto sinérgico entre el estrés por corte y la radiación UVA, que conduce a una mayor concentración de compuestos fenólicos, incluso en comparación con el efecto del estrés por corte solo. Este efecto se potenció aún más durante el almacenamiento. Los resultados observados fueron superiores a los comunicados para la piel de cactus rojo, donde el efecto combinado del estrés por UV-B y el corte no mostró inmediatamente un efecto significativo sobre el TPC. Sin embargo, mostró un efecto retardado durante el almacenamiento a las 24 h con un aumento máximo del 33.8% con un tiempo de radiación UV-B de 15 minutos (Ortega-Hernández et al., 2018). Estos hallazgos resaltan el potencial de la radiación UVA y el almacenamiento o incubación como tecnologías alternativas para la biofortificación de subproductos agroindustriales. Por ejemplo, la radiación UV-A se ha utilizado como único elicitor en residuos agroindustriales de frutilla, dando lugar a incrementos significativos del 142% en TPC, como se describió previamente en este trabajo de tesis.

3.5.3.4. Efecto sobre compuestos fenólicos individuales

El proceso de biofortificación mediante Ct, ST y UVA no afectó cualitativamente al perfil de compuestos fenólicos, pero si modificó la concentración de los compuestos fenólicos individuales (Figura 3.23).

La radiación UVA modula los procesos de fotosíntesis en las plantas, y se ha demostrado que repercute en determinados metabolitos secundarios individuales. En el caso del GS, la concentración del principal compuesto fenólico, PACB2, mejoró significativamente por la radiación UVA y el estrés por corte. Con una concentración inicial de 0.2 g/Kg de GS, PACB2 fue identificado tentativamente como el principal compuesto fenólico en este tejido. Este compuesto fenólico fue afectado por Ct ($p<0.01$), UVA

($p<0.01$), y ST ($p<0.05$), así como la interacción entre Ct y UVA. De acuerdo con la Tabla 3.29, inmediatamente después de la exposición a UVA, se observaron incrementos significativos, tanto en la aplicación de UVA3 (58-225%) como para UVA6 (105-156%), alcanzando con el C3 más UVA3 una concentración media máxima de 0.78 g/Kg. Esta concentración fue un 305% superior a la de C3 sin radiación inicial (0.21 g/Kg) y un 138% superior a la de C3 tras la exposición a UVA3 (0.33 g/Kg). Adicionalmente, fue significativamente superior ($p<0.05$) a la mayor acumulación de PACB2 lograda con el tratamiento con UVA6 que fue con el C1 inmediatamente después de la radiación UVA6 con 0.532 g/Kg.

El compuesto (+)CTQN, mostró un incremento máximo del 209% con C3 y UVA3 a 20°C (0.2 g/Kg). Además, según los datos presentados en la Tabla 3.30, este compuesto mostró una correlación significativa ($p<0.001$ R^2 0.57) con la actividad de PPO, siendo probablemente uno de los principales sustratos de esta enzima, durante el proceso de biofortificación de GS en este estudio. Mientras tanto, (-)EPQN mostró su máximo incremento con C2 a 10°C, siendo UVA3 un 173% superior al C1 inicial. El compuesto PACT aumentó hasta un 121% con C3 y UVA3 a 20°C, y ACI aumentó un 231% con C3 y UVA3 a 15°C. Q3G aumentó un 202% con UVA3 (0.2 g/Kg) y un 150% con UVA6 (0.17 g/Kg) sin diferencias significativas ($p>0.05$). El UVA6 alcanzó un incremento máximo del 246%. Por otra parte, PACT y PACB2 fueron los compuestos fenólicos individuales que mostraron una mayor correlación con PAL, con valores R^2 de 0.50 y 0.49, respectivamente (Tabla 3.30). Para QP la máxima síntesis y acumulación de este compuesto se logró con el corte C3 almacenado a 15°C luego de aplicar una radiación UVA6 logrando un incremento del 246% comparado con C1 a tiempo cero. Para el glucósido de quercetina QHS se logró un aumento de hasta el 140% en su concentración para ambas dosis de radiación UVA (UVA3, UVA6) con el C3 almacenado a 15°C durante 48h. A su vez la aplicación de UVA3, con C3 y 15°C al tejido de GS, permitió un aumento del 106% y 142% para K3G y FLN, respectivamente (Tabla 3.29). Estos resultados demuestran que la síntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos aumenta con una mayor intensidad del corte, acompañada de una dosis de radiación de 86.4 KJ m⁻² (UVA3).

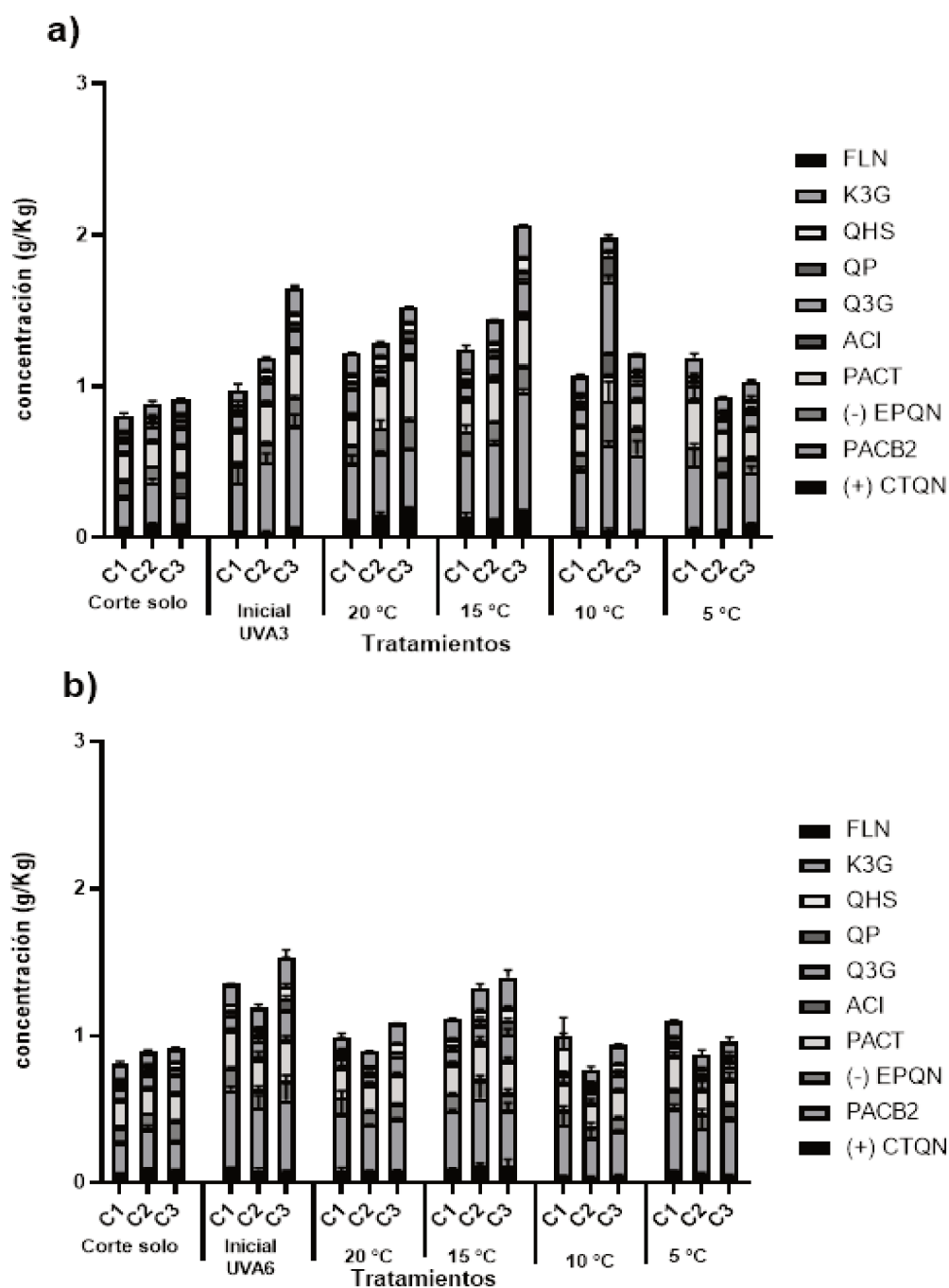


Figura 3.23. Concentración de compuestos fenólicos individuales en diferentes tratamientos de biofortificación con compuesto fenólicos en cáscara de manzana ‘Granny Smith’. a) Radiación UVA3 (86.4 KJ m^{-2}), y b) Radiación UVA6 (172.8 KJ m^{-2}). C1: cáscara entera, C2: cáscara cortada 6 mm de ancho, C3: cáscara cortada 1.5 mm de ancho. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina.

En cuanto al total de compuestos fenólicos identificados y cuantificados por HPLC-DAD (TPC_{HPLC}), la misma fue afectada por ST ($p<0.01$), UVA ($p<0.05$) y Ct ($p<0.001$) y el factor UVA² ($p<0.05$) (Tabla 3.27).

La Tabla 3.28 presenta la variación en el TPC_{HPLC} en GS después del tratamiento con radiación UVA, con una dosis de 86.4 KJ m⁻² resultando en la acumulación inmediata de compuestos fenólicos, especialmente en C3, que mostró la mayor acumulación ($p<0.05$) en 80.7% después del tratamiento UVA3 comparado con GS fresco sin tratar, incrementando los TPC_{HPLC} al pasar de una concentración de 0.81 a 1.65 g Kg⁻¹. Posteriormente durante el almacenamiento, se observaron aumentos de concentración significativos ($p<0.05$) para el C3 tratado con UVA3 y almacenado a 20 y 15°C siendo 67 y 126.2% superiores en comparación con GS sin tratamiento, en comparación con UVA6 para el C3 almacenado a 20, 15 y 10°C el tratamiento con UVA3 fue 45%, 69% y 27% mayor, respectivamente en los TPC_{HPLC}. Observando que cuando se aplicó UVA6 sobre GS, el almacenamiento no promovió la acumulación de TPC_{HPLC}; mostrando, un efecto inmediato con un aumento del 72.6%, siendo la procianidina B2 el compuesto principal (Tabla 3.28 y 3.29).

Otros autores, reportaron que la acumulación de antocianinas aumentó en un 300% en tomates cuando se sometieron a la radiación UVA (Guo & Wang, 2010). En el caso del GS, se observó que la acción sinérgica de UVA con Ct indujo la acumulación de procianidinas, las cuales exhiben valiosas bioactividades como cardioprotectoras, antivirales, anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras (Khanal et al., 2009; Kimmel et al., 2011; Rue et al., 2018). Este estudio destaca el uso potencial de los residuos agroindustriales de la cáscara de la manzana ‘Granny Smith’ como biofábricas de compuestos fenólicos específicos, utilizando tecnologías eficientes, seguras, de bajo costo y amigables con el medio ambiente, como el estrés abiótico por corte y la radiación UVA.

Tabla 3.29. Porcentaje de variación de los compuestos fenólicos individuales por efecto de la biofortificación con compuestos fenólicos decáscara de manzana ‘Granny Smith’ con UVA y corte.

Compuesto fenólico	Ct	Inicial		20°C		15°C		10°C		5°C	
		UVA3	UVA6	UVA3	UVA6	UVA3	UVA6	UVA3	UVA6	UVA3	UVA6
CTQN	C1	-38.98bB	52.37aA*	74.34cA	19.66aAB	119.24aA	42.44aA	-16.16aB	-33.06aB	-5.93bB	18.31aAB
	C2	-31.87bB	28.46aAB	138.05bA*	21.63aAB	94.32aA	77.17aA	-20.27aB	-40.89aC	-17.41bB	-6.32abBC
	C3	5.32aD	9.45aA	209.38aA*	29.61aA	189.23aB	75.89aA	-31.48aE	-25.74aA	46.15aC*	-23.80bA
PACB2	C1	57.97bA	156.24aA	85.11aA	89.35aA	99.77cA	91.03aA	-16.16aA	69.03aA	-5.93aA	105.54aA
	C2	119.85abBC	105.36aA	98.32aCD*	51.37aA	139.92bAB	119.93aA	-20.27aA	30.37aA*	-17.41aD	49.07aA
	C3	224.87aAB*	135.48aA	88.52aC*	68.15aA	276.25aA*	81.83aA	-31.48aBC	47.77aA	46.15aC	86.46aA
EPQN	C1	11.11bA	39.98aA*	10.64aA	4.41aA	42.70aA	9.84aA	2.23aA	-7.10aA	19.95aA	22.82aA
	C2	21.62bB	13.84aA	49.21aAB	-10.18aA	36.80aAB	21.51aA	173.58aA	-26.45aA	0.18aB	-10.09bA
	C3	72.42aA	28.27aA	81.94aA*	-1.52aA	55.50aA	10.38aA	62.62aA*	-15.08aA	-12.86aB	-3.78bA
PACT	C1	21.43bA	36.58aA	0.51cA	5.3aA	9.94bA	8.61aA	-2.47aA	-2.40aA	64.24aA	21.44aA
	C2	39.47abA	13.82aA	62.55bA*	-3.70aA	51.55abA	28.98aA	-10.53aB	-19.59aA	-2.65aB	-11.27aA
	C3	69.50aB	46.13aA	120.82aA*	5.13aAB	79.36aAB*	14.27aAB	-0.23aC	-0.98aAB	2.82aC	-12.04aB
ACI	C1	-20.61bB	59.68aAB*	245.44bA	83.77aAB	40.33cB	106.61aA*	12.80bB	-27.97aB	33.65aB	20.61aAB
	C2	62.96aD	44.54aBC*	355.72aB*	86.22aAB	164.38bC	170.13aA	48.7aA*	-20.26aC	10.60aD	-18.08bC
	C3	8.21bC	-28.33aA	170.86cB*	74.53aA	231.58aA	91.51aA	2.45bC	-24.21aA	0.18aC	-40.54bA
Q3G	C1	52.19bB	28.11bA	129.56aA*	-15.50bA	26.65cB	18.32aA	71.42bB*	-26.46aA	32.94aB	-2.54aA
	C2	83.54abB	57.53bA	-20.97cC	-32.62bA	91.96bB	63.08aA	580.63aA*	9.07aA	1.62aBC	3.93aA
	C3	95.80aB	183.66aA*	33.22bC	59.28aAB	202.86aA	149.82aAB	55.98bBC	42.49aA B	56.26aBC	20.88aB
QP	C1	-6.01aA	25.52bA	61.30bA*	-16.10aBC	42.49bA	16.24bAB	54.62bA	-27.43aC	18.22aA	-2.71bABC
	C2	22.11aB	52.20bA	23.55cB*	-16.77aA	52.03bB	56.86bA	507.68bA*	-2.67aA	-11.73aB	6.42abA
	C3	39.27aB	205.94aA	125.70aA*	33.91aB	133.53aA	246.54aA	105.41bA*	22.15aB	2.64aB	31.75aB*
QHS	C1	0.91aA	33.09aA	49.69aA*	-18.41aA	46.68bA	25.71bA	26.13aA	360.60aA	3.54A	-5.76aA
	C2	30.66aB	26.34aA	62.67aA*	21.01abA	48.19bAB	43.14abA	-7.67bC	-7.54aA	-8.60aC	0.10aA
	C3	72.54aAB	112.32aA	68.72aAB	46.89aA	139.04aA	139.19aA	-6.60bB	29.77aA*	43.79aAB	28.86aA
K3G	C1	-17.42aA	28.29aA	35.15aA	-20.28bA	38.45bA	25.04aA	9.89aA	-24.95aA	5.01aA	-4.93aA
	C2	-25.34aB	30.94aA	-23.35bB	-8.60bA	37.33aA	45.53aA	-20.14aB	-14.69aA	-14.26aB	-8.44aA
	C3	59.27aB	91.84aA	-6.06bC	29.49aA*	106.39aA	96.06aA	-2.77aC	16.82aA	-12.52aC	-19.51aA
FLN	C1	-46.14bA	-38.90aA	-32.071aA	-57.91aA	-62.17cA	-39.67aA	-34.00aA	-60.33aA	-62.85aA	-37.07aA
	C2	-43.53bB	-56.50abA	-31.26aB	-62.17aA	50.18aA*	-54.38bA	-47.21aB	-48.69aA	-65.45aB	-54.65abA
	C3	69.11aAB*	-63.40bB	-23.58aB	-52.27aAB	141.53aA	-53.02bAB	-25.53aB	-49.22aA	-17.95aB*	-64.08bAB

Ct: Tipo de corte. C1: GS entera. C2: Corte GS 5 mm. C3: Corte GS 1.5 mm. UVA3: Radiación UVA (86.4 KJ/m²). UVA6: Radiación UVA (172.8 KJ/m²). (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. FLN: Floretina. Letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por la prueba de Tukey entre cada tipo de corte. Letras mayúsculas diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por la prueba de Tukey entre las diferentes temperaturas de almacenamiento a cada dosis de radiación UVA. *: significa diferencias significativas ($p \leq 0.05$) mediante el *t-test* entre las distintas dosis de radiación UVA en cada condición de almacenamiento.

Tabla 3.30. Análisis de correlación para las diferentes respuestas estudiadas en el proceso de biofortificación de cáscara ‘Granny Smith’ con UVA y corte.

Respuesta	(+)CTQN	PACB2	(-)EPQN	PACT	ACI	Q3G	QP	QHS	K3G	FLN	TPC _{HPLC}	PAL	PPO	TPC
CTQN	-													
PACB2	0.3250*	-												
EPQN	NS	0.6236***	-											
PACT	0.6076***	0.4928***	0.3875**	-										
ACI	NS	0.2896*	0.6926***	NS	-									
Q3G	NS	0.4853***	0.6917***	NS	0.8336***	-								
QP	NS	0.4154**	0.7195***	NS	0.7878***	0.9143***	-							
QHS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-						
K3G	0.4095**	0.5471***	NS	0.3411**	NS	0.3079*	0.2798*	0.2798*	-					
FLN	0.4250***	0.6758***	0.2815*	0.4588***	NS	NS	NS	NS	0.4278***	-				
TPC_{HPLC}	0.4913***	0.8660***	0.7890***	0.5965***	0.5354***	0.7084***	0.2953*	0.2953*	0.5843***	0.5640***	-			
PAL	0.4494***	0.4969***	0.4745***	0.5061***	NS	0.2996*	NS	NS	0.2594*	0.5333***	0.5716***	-		
PPO	0.5214***	NS	NS	0.3652**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.2592*	-	
TPC	0.4614***	0.5669***	0.5104***	0.4601***	0.2642*	0.3579**	NS	NS	0.2717*	0.7036***	0.6249***	0.7250***	0.3464**	-

PAL, Actividad fenilalanina amonio liasa; PPO, Actividad polifenol oxidasa; TPC, Contenido total de compuestos fenólicos; TPC_{HPLC}, contenido total de compuestos fenólicos determinados por HPLC. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Procianidina tetramero; ACL: ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucuronido; QPN; Quercetina pentóxido; QHS: Quercetina hexóxido; K3G; Kaempferol-3-o-glucuronide. FLN: Floretina. NS: no significativo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

3.5.3.5. Condiciones óptimas del proceso de biofortificación de GS con UVA y estrés por corte, y validación de los modelos obtenidos

Los datos experimentales del diseño factorial general utilizado en este estudio se ajustaron adecuadamente a un modelo polinómico de segundo orden. A continuación, se presentan las ecuaciones de predicción 3.11-3.15 obtenidas para las respuestas principales (actividad de las enzimas PAL y PPO, concentraciones de TPC, PACB2 y TPC_{HPLC}) para la intensidad de corte de 1.5 mm de ancho (C3).

$$PAL = 8.15169 + 27.30658 * ST + 1.38335 * UVA - 0.019776 * ST * UVA - 0.69067 * ST^2 - 0.013703 * UVA^2 \quad Ec \ 3.11.$$

$$PPO = 199.38943 - 3.66680 * ST - 0.76187 * UVA + 0.070568 * ST * UVA \quad Ec \ 3.12.$$

$$TPC = -42.74451 + 15.01318 * ST + 1.77161 * UVA + 0.010268 * ST * UVA - 0.25768 * ST^2 - 0.011657 * UVA^2 \quad Ec \ 3.13.$$

$$PACB2 = 6.01014 + 9.83149 * ST + 1.79692 * UVA - 2.96826E - 003 * ST * UVA - 0.23874 * ST^2 - 0.010494 * UVA^2 \quad Ec \ 3.14.$$

$$TPC_{HPLC} = -25.58295 + 10.91894 * ST + 0.48910 * UVA - 8.58268E - 003 * ST * UVA - 0.21343 * ST^2 - 3.30769E - 003 * UVA^2 \quad Ec \ 3.15.$$

Posteriormente, se realizó la optimización de respuestas múltiples para determinar las condiciones óptimas de biofortificación de GS. Para lograrlo, se buscó maximizar las respuestas PAL, TPC, PACB2 y TPC_{HPLC}, manteniendo la PPO dentro de un cierto rango mínimo para evitar la sobre oxidación de los compuestos fenólicos. Los valores óptimos de las variables del proceso de biofortificación determinadas fueron las siguientes: UVA de 66 KJ m⁻² (2.3 horas), Ct de 1.5 mm y ST de 17°C. El valor predicho de la enzima PAL en las condiciones óptimas de proceso fue 0.115 ΔA h⁻¹mg⁻¹, similar al valor experimental obtenido (0.10 ΔA h⁻¹mg⁻¹). Adicionalmente, no hubo diferencias significativas entre el valor predicho (0.20 ΔA h⁻¹mg⁻¹) y del valor promedio obtenido en la validación experimental (0.23 ΔA h⁻¹mg⁻¹) para la enzima PPO siendo el modelo adecuado para describir el comportamiento de estas enzimas claves en el proceso de biofortificación con compuestos fenólicos de GS. Para los valores experimentales de TPC (3.80 g AGE Kg⁻¹), PACB2 (0.61 g Kg⁻¹) y TPC_{HPLC} (2.02 g Kg⁻¹) fueron superiores a los valores predichos en un 16, 6.5 y 18.5% respectivamente. Estando dentro de los rangos de error normales en un modelo predictivo (Setford et al., 2019). Este hallazgo pone de relieve el efecto sinérgico del estrés por corte y la radiación UVA en la acumulación de compuestos fenólicos en GS. Estudios previos también han reportado los beneficios de combinar diferentes elicitores para mejorar la acumulación de compuestos fenólicos, incluyendo el uso de UV-B y UV-C con estrés por daño mecánico u hormonas exógenas (Ortega-Hernández et al., 2019; Surjadinata et al., 2017).

Sin embargo, el uso de luz LED UVA ofrece varias ventajas, como presentar un menor riesgo de manipulación, un consumo eficiente de energía y un menor coste en comparación con UV-B y UV-C (Lante et al., 2016). Además, la aplicación de daño por corte es una técnica de bajo coste que puede automatizarse, lo que hace factible la ampliación de este tipo de procedimiento de biofortificación para residuos agroindustriales a gran escala, como el de las manzanas ‘Granny Smith’, para la producción de compuestos de alto valor nutracéutico.

3.5.3.6. Estabilidad de los compuestos fenólicos de cáscara de manzana biofortificada durante el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*

Los subproductos agroindustriales de manzana ‘Granny Smith’ biofortificados (GS-E) con compuestos fenólicos de acuerdo con las condiciones determinadas anteriormente (3.5.3.5), se sometieron a una prueba de estabilidad gastrointestinal *in-vitro* para evaluar su potencial como suplemento dietético nutracéutico o ingrediente funcional. La Tabla 3.31 presenta los cambios en la concentración de compuestos fenólicos en el tejido biofortificado GS-E en comparación con el tejido GS no biofortificado con compuestos fenólicos o control (GS-N) tras simular el proceso digestivo humano. Se observaron cambios significativos en la concentración de compuestos fenólicos durante cada etapa del proceso de digestión *in-vitro*, particularmente en GS-E, donde los niveles de PACB2, ACL, QPN, QHS, K3G y TPC_{HPLC} se vieron significativamente afectados ($p < 0.05$). Por otro lado, en GS-N, las diferentes fases no afectaron significativamente ($p > 0.05$) a la mayoría de los compuestos fenólicos, con excepción de K3G, TPC_{HPLC}. La fase gástrica causó las mayores reducciones en la mayoría de los compuestos fenólicos determinados, probablemente debido a las condiciones ácidas del fluido gástrico (pH 2) (Serra et al., 2010). Sin embargo, la concentración y bioaccesibilidad de (+)CTQN mostró una tendencia inversa, manteniendo su concentración durante la fase gástrica tanto para el control GS-N (104%) como para el tejido biofortificado con compuestos fenólicos, GS-E (102%) sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. Esto podría atribuirse a la hidrólisis de los oligómeros de PACB2, que se transforman en dímeros y monómeros de catequina y epicatequina (De Taeye et al., 2014). Este hallazgo confirma los resultados comunicados para el cacao en polvo, donde la bioaccesibilidad de la catequina fue mayor durante la fase gástrica, mientras que la procianidina fue hidrolizada (Giltekin-Özgüven et al., 2016).

Tabla 3.31. Estabilidad gastrointestinal in-vitro de los compuestos fenólicos del subproducto de manzana ‘Granny Smith’.

Muestra Compuesto		Concentración (g Kg ⁻¹)			Bioaccesibilidad (%)	
		Fluido salival (FS)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)
GS-N	(+) CTQN	0.046±0.002a	0.048±0.013a	0.024±0.002b	104.18	52.16
	PACB2	0.384±0.11a	0.064±0.015b	0.072±0.008b	16.73	18.81*
	(-)EPQN	0.089±0.003a	0.051±0.011b	0.037±0.004b	56.91	41.99
	PACT	0.158±0.021a	0.057±0.004b	0.032±0.005b	35.90	20.19
	ACI	0.009±0.001a	0.005±0.0004b	n.d	59.21*	n.d
	Q3G	0.032±0.0003a	0.015±0.0003b	0.016±0.001b	47.83	50.61
	QPN	0.012±0.0004a	0.004±0.0003b	0.004±0.0003b	37.40	31.57
	QHS	0.022±0.003a	0.007±0.003b	0.009±0.001b	29.70	38.41*
	K3G	0.034±0.008a	0.018±0.001b	0.006±0.001c	53.35*	16.09
	FLN	0.001±0.0004	n.d	n.d	n.d	n.d
	TPC _{HPLC}				34.27	25.37
GS-E	(+) CTQN	0.160±0.014a*	0.164±0.022a*	0.096±0.009b*	102.12	59.71*
	PACB2	0.793±0.085a*	0.310±0.096b*	0.091±0.01c	39.08*	11.52
	(-)EPQN	0.152±0.017a*	0.081±0.016b	0.073±0.005b*	53.36	48.36*
	PACT	0.358±0.004a*	0.124±0.003b*	0.121±0.011b*	34.63	33.83*
	ACI	0.023±0.002a*	0.012±0.0002b*	0.0001±0.00002c*	53.73	0.52*
	Q3G	0.116±0.001a*	0.080±0.004b*	0.073±0.008b*	69.05*	63.36*
	QPN	0.053±0.004a*	0.031±0.001b*	0.022±0.001c*	57.78*	41.99*
	QHS	0.051±0.005a*	0.025±0.001b*	0.015±0.002c*	48.93*	29.64
	K3G	0.048±0.002a*	0.024±0.001b*	0.019±0.002c*	49.81	39.64*
	FLN	0.003±0.0004	n.d	n.d	n.d	n.d
	TPC _{HPLC}				48.48*	29.16

GS-N, cáscara de manzana ‘Granny Smith’ control; GS-E, cáscara de manzana ‘Granny Smith’ en condiciones óptimas de biofortificación. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetramero de procianidina; ACI: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido; FLN: Floretina. TPC_{HPLC}: Contenido fenólico total por HPLC. n.d: No detectado. Letras minúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p<0.05$). *: Diferencias de medias ($p<0.05$) entre el mismo compuesto de las muestras GS-N y GS-E.

El proceso de biofortificación (GS-E) mejoró significativamente ($p<0.05$) la bioaccesibilidad de los flavan-3-oles [(+)Catequina y (-)Epicatequina] en la FI con un 59.7% y 48.4% respectivamente. Según Olivero-David et al. (2018) y Serra et al. (2010), estos compuestos en matrices ricas en carbohidratos, como el GS, tienen la capacidad de atravesar la barrera gástrica y alcanzar la circulación en la hora siguiente a su consumo, a diferencia de las procianidinas cuya permeabilidad intestinal es muy baja. La (-)epicatequina puede ser biotransformada por la microbiota en 5-(4'-hidroxifenil)- γ -valerolactona-3'-sulfato y 5-(4'-hidroxifenil)- γ -valerolactona-3'-O-glucurónido, analitos que alcanzan el 95% de absorción y circulación en plasma (Borges et al., 2018).

Por otra parte, la bioaccesibilidad de Q3G en GS-E resultó ser la más alta entre todos los compuestos fenólicos en la FI (63%), un 13% superior a la bioaccesibilidad de Q3G en el tejido control GS-N. Aunque no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) en la bioaccesibilidad de TPC_{HPLC} entre GS-E (29%) y el control GS-N (25%) en la FI, el proceso de biofortificación mediante estrés por corte y radiación UVA con compuestos fenólicos mejoró la estabilidad de la mayoría de los compuestos fenólicos individuales durante el proceso digestivo, aumentando así el potencial bioactivo de estos residuos agroindustriales (Tabla 3.31) Principalmente gracias a que tiene un contenido mayor de compuestos fenólicos en su composición, adicionalmente los procesos de lignificación del tejido vegetal causados por el estrés por corte genera una protección adicional durante la fase gástrica la cual es la que mayores deterioro genera en los tejidos vegetales sometidos a digestión (Becerra-Moreno et al., 2015).

3.6. Extracción asistida por ultrasonido (UAE) de compuestos fenólicos a partir de subproductos de frutilla (RF)

3.6.1. Influencia de las variables de extracción asistida por ultrasonido sobre el contenido de fenoles totales (TPC) y las constantes cinéticas (modelo de Peleg) para RF.

En el presente estudio, basándose en análisis anteriores, se identificaron los factores claves que influyen significativamente en la extracción de compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales de frutilla (RF). Como resultado, se estudió el impacto de tres variables: la relación de extracción (X1), el porcentaje de etanol en la solución de extracción (X2) y el porcentaje de potencia de la sonda ultrasónica (X3). Estos factores se seleccionaron específicamente para su análisis debido a su posible influencia en el proceso de extracción y en la recuperación de compuestos fenólicos de la RF. La tabla 3.32 presenta los detalles del diseño experimental realizado. En cada serie del experimento se determinó la concentración de los compuestos fenólicos totales (TPC) durante un tiempo de extracción fijo (24 min). A continuación, los datos experimentales obtenidos en cada punto del diseño experimental se ajustaron al modelo de Peleg (Ecuación 2.2) obteniéndose un R^2 -adj comprendido entre 0.96-0.99, y lo que permitió calcular los parámetros cinéticos (K1 y K2) asociados a cada punto del diseño de Box-Behnken (BB) para luego evaluar el efecto de las variables de extracción (X1, X2 y X3) sobre las constantes cinéticas (Tabla 3.32 y 3.33).

Se determinó que la constante de la velocidad de extracción de TPC (K1) del modelo de Peleg es afectada significativamente ($p<0.05$) por la variación de las tres variables independientes estudiadas, X1, X2 y X3; así como también por la interacción entre X1 y X3 ($p<0.001$), y entre X2 y X3 ($p<0.05$) (Tabla 3.33). La relación de extracción

(X1) desempeña un papel crucial en el control de la fuerza motriz del fenómeno de transferencia de masa mediante la creación de un gradiente de concentración entre los residuos agroindustriales de frutilla (RF) y el disolvente de extracción. Como se observa en la Figura 3.24, el aumento de X1 de -1 (1:20) a 1 (1:40 p/v), manteniendo constante X2 en 0 (40% de etanol) y X3 en -1 (20% de potencia ultrasónica), produjo un aumento del 127% en la constante de velocidad de extracción (K1). Sin embargo, cuando se aumentó X1 junto con X2 (40-80% de etanol) manteniendo X3 al 20% de potencia ultrasónica, el aumento de K1 fue sólo del 21%.

Tabla 3.32. Variables del Diseño experimental de Box-Behnken, junto con los valores determinados y predichos de la constante de velocidad de Peleg (K1) y la constante de capacidad de Peleg (K2), derivados del modelo cinético de los compuestos fenólicos totales (TPC) en residuos agroindustriales de frutilla.

Corrida	Relación extracción, (p/v) (X1: codificada)	Contenido de etanol (%vol) (X2: codificada)	Potencia US (%) (X3: codificada)	K1 (min ⁻¹)		K2 (g AGE Kg ⁻¹)		Temperatura Final (°C)
				Determinado (Ec. 2.2)	Predicho (Ec. 3.17)	Determinado (Ec. 2.2)	Predicho (Ec. 3.18)	
1	1:20(-1)	0(-1)	60(0)	36.67	43.90	102.28	101.72	80
2	1:40(1)	0(-1)	60 (0)	44.23	44.90	89.65	89.09	77
3	1:20(-1)	80(1)	60 (0)	25.64	28.24	86.96	87.51	76
4	1:40(1)	80(1)	60 (0)	31.05	29.24	104.60	105.16	78
5	1:20(-1)	40(0)	20(-1)	27.92	21.65	102.86	102.86	67
6	1:40(1)	40(0)	20(-1)	63.31	62.53	114.81	114.81	62
7	1:20(-1)	40(0)	100(1)	65.58	69.29	112.84	112.84	71
8	1:40(1)	40(0)	100(1)	21.22	30.42	175.25	175.25	74
9	1:30(0)	0(-1)	20(-1)	49.42	50.46	113.42	113.98	76
10	1:30(0)	80(1)	20(-1)	10.33	14.92	95.13	94.58	82
11	1:30(0)	0(-1)	100(1)	47.29	38.35	87.65	88.21	75
12	1:30(0)	80(1)	100(1)	47.96	42.57	110.03	109.47	76
13	1:30(0)	40(0)	60 (0)	52.64	45.97	128.74	130.44	77
14	1:30(0)	40(0)	60 (0)	51.38	45.97	135.46	130.44	77
15	1:30(0)	40(0)	60 (0)	39.77	45.97	127.13	130.44	77

La solubilidad de los compuestos fenólicos puede variar en función de su naturaleza química y de las condiciones de extracción empleadas. En el contexto de la extracción sólido-líquido, las interacciones entre el disolvente y el soluto, así como las interacciones disolvente-disolvente, desempeñan un papel crucial en la determinación de la eficacia de la extracción (Villamil-Galindo et al., 2020). El etanol, al ser un disolvente prótico polar, posee la capacidad de donar enlaces de hidrógeno a través de su grupo hidroxilo. Sin embargo, tiene una polaridad moderada, como indica su índice solvatocrómico (E^N_T) de 0.65. Esta polaridad moderada limita su capacidad para extraer eficazmente compuestos fenólicos altamente polares. Para mejorar la extracción de una gama más amplia de

compuestos fenólicos, pueden emplearse mezclas que incorporen un disolvente más polar, como el agua ($E^n_T = 1$). Utilizando mezclas como etanol al 80% ($E^n_T = 0.69$) y etanol al 40% ($E^n_T = 0.73$), se puede extraer eficazmente un espectro más amplio de compuestos fenólicos (Krygowski et al., 1985).

Tabla 3.33. ANOVA para las constantes K1 y K2 del modelo de Peleg en la extracción asistida por ultrasonido (UAE) para residuos agroindustriales de frutilla (RF).

Fuente de variación	GL	K1	K2
X1	1	*	*
X2	1	*	*
X3	1	*	*
X1*X2	1	ns	*
X1*X3	1	***	**
X2*X3	1	*	*
X1 ²	1	ns	*
X2 ²	1	*	***
X3 ²	1	ns	ns
X1*X2*X3	1	ns	ns
X1 ² *X2	1	ns	***
X1 ² *X3	1	ns	ns
X1*X2 ²	1	ns	ns
X1*X3 ²	1	ns	**
X2 ² *X3	1	ns	ns
X2*X3 ²	1	ns	ns
R ²	-	0.87	0.99
Falta de ajuste	14	ns	ns

X1: Relación de extracción (p/v). X2: Concentración de etanol (%v/v), X3: Porcentaje de la potencia de la sonda ultrasónica (%), GL: Grados de libertad. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. ns: $p > 0.05$.

La potencia de la sonda ultrasónica desempeñó un papel significativo en la tasa de extracción de compuestos fenólicos totales (TPC). Este efecto es evidente en los experimentos de extracción llevados a cabo con una relación de extracción fija de 1:20 ($X_1 = -1$), 40% de etanol ($X_2 = 0$), y niveles variables de potencia de la sonda ultrasónica (X_3) que van del 20% al 100% de US. El resultado fue un aumento del 135% en la constante de la velocidad de extracción de TPC (K_1). Este hallazgo pone de relieve el impacto de la energía acústica en la eficacia de la extracción de TPC. Diferentes combinaciones de

variables de extracción pueden influir en la velocidad de extracción de TPC. Es crucial encontrar el punto óptimo para una extracción eficiente de compuestos fenólicos a partir de RF.

La capacidad máxima de extracción de TPC del sistema de extracción, determinada por el parámetro K2 del modelo de Peleg, es afectada por las tres variables estudiadas ($p < 0.05$) y por las interacciones entre X1 y X2 ($p < 0.05$), X1 y X3 ($p < 0.01$), y X2 y X3 ($p < 0.05$) (Tabla 3.33).

En los ensayos experimentales, los TPC obtenidos del tejido RF-N oscilaron entre 64.5 y 122.7 g AGE Kg⁻¹ RF. El parámetro K2, ajustado a los datos experimentales, osciló entre 87.3 y 175.5 g AGE Kg⁻¹ RF. Cuando X1 se incrementó de -1 (1:20) a +1 (1:40 p/v), X3 se aumentó del -1 (20%) a +1 (100%), manteniendo X2 constante en 0 (40%), el valor de K2 mostró un aumento aproximado del 53% (Figura 3.25). Esto puede atribuirse a la mayor relación de extracción, que crea un mayor gradiente de concentración y una fuerza motriz más fuerte. Por otra parte, cuando X2 se incrementó de 0% (-1) a 80% (+1) y X3 de 20% (-1) a 100% US (+1), mientras que X1 se mantuvo constante en 1:30, no hubo ningún efecto significativo sobre K2, que cambió de 113.6 a 110 g AGE Kg⁻¹. Esto sugiere que las altas concentraciones de etanol en la solución de extracción resultaron desfavorables para la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en la RF-N.

3.6.2. Modelado y optimización de la extracción asistida por ultrasonido para RF.

Se determinaron los parámetros cinéticos del modelo de Peleg, K1 y K2, para cada ensayo de extracción de TPC a partir de RF-N. A continuación, estos parámetros se ajustaron a un modelo de segundo orden, que se redujo considerando las variables de extracción significativas. Los modelos ajustados para K1 y K2 están representados por las ecuaciones 3.16 y 3.17, respectivamente. Los altos valores adj-R² indican que 86% y 97% de la variabilidad de los datos puede ser descrita por las Ec. 3.17 y 3.18 para K1 y K2, respectivamente, en función de X1, X2 y X3 (Figuras 3.24 y 3.25).

$$K1 = 45.97 + 0.5004X1 - 7.82964X2 + 3.88434X3 - 19.93534X1X3 + 9.93902X2X3 - 9.39967X2^2 \quad Ec \ 3.16.$$

$$K2 = 130.443 + 1.25359X1 + 0.4646X2 - 2.719X3 + 7.5668X1X2 + 12.614X1X3 + 10.1657X2X3 - 4.846X1^2 - 29.7263X2^2 + 0.84285X3^2 + 20.3241X1^2X3 + 17.3391X1X3^2 \quad Ec \ 3.17.$$

Los modelos cuadráticos desarrollados permiten una comprensión exhaustiva de la relación entre estos factores experimentales de la UAE y los parámetros cinéticos de la extracción de TPC (K1 y K2). Mediante el análisis de los coeficientes del modelo reducido,

es posible identificar los factores más influyentes y sus interacciones, proporcionando información valiosa para optimizar el proceso de extracción y maximizar los rendimientos de TPC.

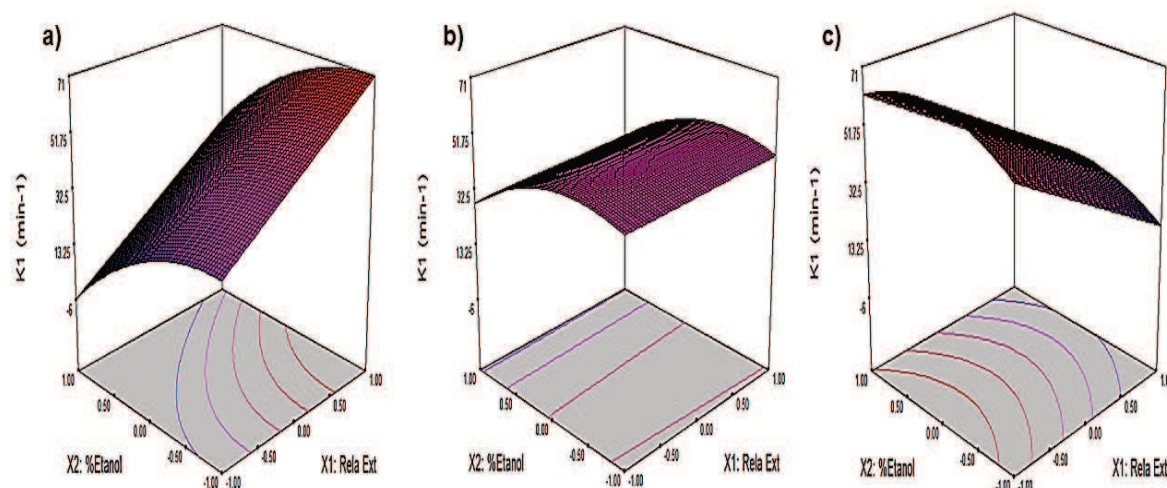


Figura 3.24. Gráficos de superficie de respuesta de la constante de la velocidad de extracción de compuestos fenólicos totales (K_1) del modelo de Peleg para. a) 20% potencia de ultrasonido; B) 60% potencia de ultrasonido; c) 100% potencia de ultrasonido para residuos agroindustriales de frutilla (RF-N).

La ecuación 3.16 muestra que la tasa (K_1) de extracción de TPC a partir de RF es mayor cuando se utiliza una mayor relación de extracción (1:40 p/v) y una menor potencia de la sonda ultrasónica en combinación con un 100% de agua como disolvente de extracción (Figura 3.24 a). La adición de un 40% de etanol a la solución de extracción no dio lugar a una mayor tasa de extracción, incluso con una mayor potencia de la sonda ultrasónica. El agua, al ser un buen agente de hinchamiento, puede difundirse eficazmente a través de la matriz de la planta, ayudando en el proceso de extracción. Sin embargo, su alta tensión superficial ($105 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ a 25°C) y su viscosidad de 0.89 cP permiten una mayor intensidad ultrasónica según la Tabla 2.2 de $316666.67 \text{ W m}^{-2}$, no obstante, estas condiciones no favorecieron la tasa de extracción (Bosch & Rosés, 1992; Santos-Zea et al., 2021).

Además, la alta polaridad del agua la hace menos eficaz para interactuar con metabolitos de polaridad baja a media presentes en la RF (Villamil-Galindo et al., 2020). Por otra parte, la adición de etanol a la solución de extracción disminuye la tensión superficial gracias a su moderada tensión superficial ($31.62 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ a 25°C). Además, el incremento de la viscosidad al mezclarse con agua (1.9 Cp) conlleva a una reducción en la intensidad ultrasónica (UI) en un rango entre 129973.05 - $208713.49 \text{ W m}^{-2}$, facilitando así la rápida solvatación del TPC, especialmente en el caso del etanol al 40% (Bosch & Rosés, 1992; Perez et al., 2011). Además, en soluciones con concentraciones similares de

agua y etanol, el etanol ayuda a la solvatación de una gama más amplia de compuestos fenólicos. Curiosamente, se observó que la velocidad de extracción era más lenta cuando la concentración de etanol en la solución de extracción se incrementaba hasta el 80% en comparación con el 40% de etanol. Esto sugiere que una mayor concentración de etanol puede no favorecer la velocidad de extracción de compuestos fenólicos de la RF (Figura 3.24).

Según la ecuación 3.17, la capacidad de extracción del sistema (K_2) sigue una tendencia similar a la de K_1 , aumentando con el incremento de la relación de extracción, especialmente para altos porcentajes de potencia ultrasónica (US) (Figura 3.25). La máxima capacidad de extracción se alcanza cuando la concentración de etanol en la solución de extracción es del 40% ($X_2=0$). Cabe destacar que las propiedades fisicoquímicas de la mezcla agua:etanol 60:40 contribuyen a la mayor capacidad de extracción observada, alcanzando hasta $175.5 \text{ g AGE Kg}^{-1}$. Esta significativa capacidad de extracción se atribuye a la interacción entre los tres factores: relación de extracción, porcentaje de potencia US y concentración de etanol. Estos resultados pueden observarse, además, en las superficies de respuestas proporcionadas en la Figura 3.25. Las figuras demuestran que un aumento en el porcentaje de potencia de US y en la relación de extracción conduce a una mejora en la capacidad de extracción del sistema, validando la relación descrita por la Ecuación 3.17.

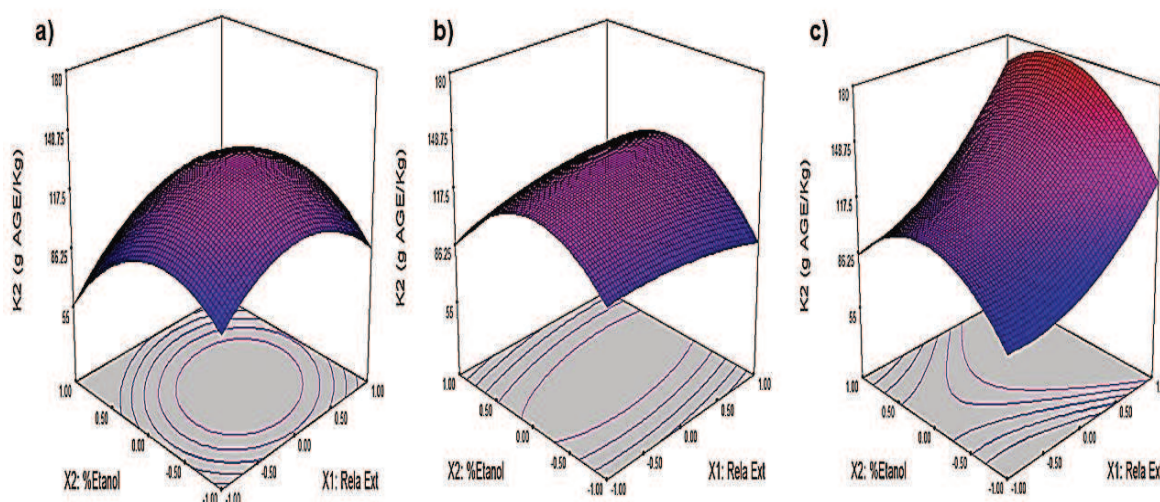


Figura 3.25. Gráficos de superficie de respuesta de la constante cinética de capacidad (K_2) de compuestos fenólicos totales del modelo cinético de Peleg para a) 20% de potencia de ultrasonido. b) 60% de potencia de ultrasonido c) 100% de potencia de ultrasonido para los residuos agroindustriales de frutilla (RF-N).

La optimización de las variables de extracción de TPC de RF asistida por US, se realizó a través de la optimización de respuestas múltiples, maximizando las constantes cinéticas del modelo de Peleg, K_1 y K_2 con las ecuaciones 3.16 y 3.17, ya que maximizar

ambas constantes implica maximizar la extracción de TPC dentro del modelo de Peleg (ecuación 2.2. Mediante la obtención de estas constantes cinéticas óptimas, se desarrolló un modelo unificado que permite predecir el rendimiento de extracción de TPC a lo largo del tiempo, teniendo en cuenta las variables del proceso (Tabla 3.34).

Tabla 3.34. Coeficientes del modelo de Peleg para las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos totales de residuos agronidustriales de frutilla (RF)

Variables			Muestra	Respuesta	K1 (min ⁻¹)	K2 (g AGE Kg ⁻¹)	adj-R ²	RSME	TPC (g AGE Kg ⁻¹)
Relación de extracción (p/v)	%EtOH	%US							
1:30	46.4	100	USRF-N	Ec 3.16-3.17	53.00	130.91	0.98	0.91	110.9b
1:30	46.4	100	USRF-N	Ec. 2.2	70.09	113.91	0.98	0.47	103.6±8.3b
1:30	46.4	100	USRF-E	Ec. 2.2	67.00	125.18	0.98	0.56	117.3±2.0a
1:30	46.4	0	MAERF-N	Ec. 2.2	60.27	46.00	0.96	0.31	46.4±1.7d
1:30	46.4	0	MAERF-E	Ec. 2.2	45.36	54.91	0.94	0.42	55.5±1.9c

%EtOH: porcentaje de etanol (v/v) en la solución disolvente. %USP: porcentaje de potencia de los ultrasonidos. USRF-N: Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos en condiciones óptimas a partir de subproductos de frutilla sin biofortificación con compuestos fenólicos. USRF-E: Extracción asistida por ultrasonido en condiciones óptimas de compuestos fenólicos a partir de subproductos de frutilla con bioenriquecimiento de compuestos fenólicos. MAERF-N: Extracción controlada de compuestos fenólicos en condiciones óptimas sin %USP de RF-N. MAERF-E: Control de la extracción de compuestos fenólicos en condiciones óptimas sin %USP de RF-E. K1: Constante de velocidad del modelo de Peleg. K2: Constante de capacidad del modelo de Peleg. adj-R²: Coeficiente de regresión ajustado. RSME: Error cuadrático medio. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los distintos métodos de extracción y condición de RF, según lo determinado por la prueba de Tukey.

El modelo optimizado obtenido mediante este enfoque representa una valiosa herramienta en la búsqueda de un proceso de extracción más eficiente para recuperar metabolitos secundarios de alto valor a partir de subproductos agroindustriales de la frutilla. Proporciona la capacidad de predecir cómo influyen los diversos factores del proceso en los rendimientos de extracción, permitiendo determinar el tiempo mínimo de extracción necesario para lograr la máxima extracción asistida por ultrasonidos. Las condiciones optimizadas incluyen una relación de extracción de 1:30 p/v, un disolvente de extracción compuesto por un 46.4% de etanol y la aplicación de una intensidad de potencia de ultrasonidos del 100% (400W). Bajo estas condiciones, se obtuvieron valores máximos para los parámetros cinéticos K1 y K2, 53 min⁻¹ y 130.5 g AGE Kg⁻¹, respectivamente, con un coeficiente de deseabilidad de 0.73.

En la búsqueda de maximizar el valor de los subproductos agroindustriales de la frutilla y lograr un aprovechamiento integral de estos recursos, previamente se han identificado condiciones óptimas para la biofortificación con compuestos fenólicos en RF mediante la aplicación de UVA, y condiciones de almacenamiento posterior controladas (Sección 3.5.1.5) para aumentar el contenido de compuestos fenólicos y su bioactividad. Para avanzar aún más en la extracción eficiente y sostenible de compuestos fenólicos a

partir de RF, las condiciones de UAE óptimas validadas se aplicaron a dos tipos diferentes de tejidos: RF biofortificada con compuestos fenólicos (RF-E) y RF sin el proceso de biofortificación (RF-N). El objetivo era investigar si el modelo óptimo obtenido podía aplicarse a ambos tipos de tejido. Para evaluar la eficacia de la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), también se llevó a cabo un proceso de extracción utilizando los parámetros óptimos sin el uso de la energía acústica de la sonda ultrasónica. Este método de extracción, conocido como extracción asistida por maceración (MAE), se aplicó tanto al tejido RF biofortificado (RF-E) como al tejido RF de control (RF-N). La Figura 3.26 ilustra la extracción de TPC durante un periodo de extracción de 24 minutos utilizando las condiciones óptimas. En la Figura 3.26, se muestran los resultados de extracción UAE y MAE para RF-N (Figura 3.26-a) y para RF-E (Figura 3.26-b). El gráfico revela una diferencia significativa en los rendimientos de extracción entre la extracción asistida por ultrasonidos y la maceración en ambos tejidos. A partir del tercer minuto de extracción, los rendimientos de la extracción asistida por ultrasonidos fueron sistemáticamente superiores a los de la maceración. En concreto, los rendimientos de extracción del USRF-N fueron un 123% superiores a los del MAERF-N, mientras que los rendimientos de extracción del USRF-E fueron un 111% superiores a los del MAERF-N. Estas diferencias en los rendimientos pueden atribuirse a la eficacia de extracción de los respectivos métodos.

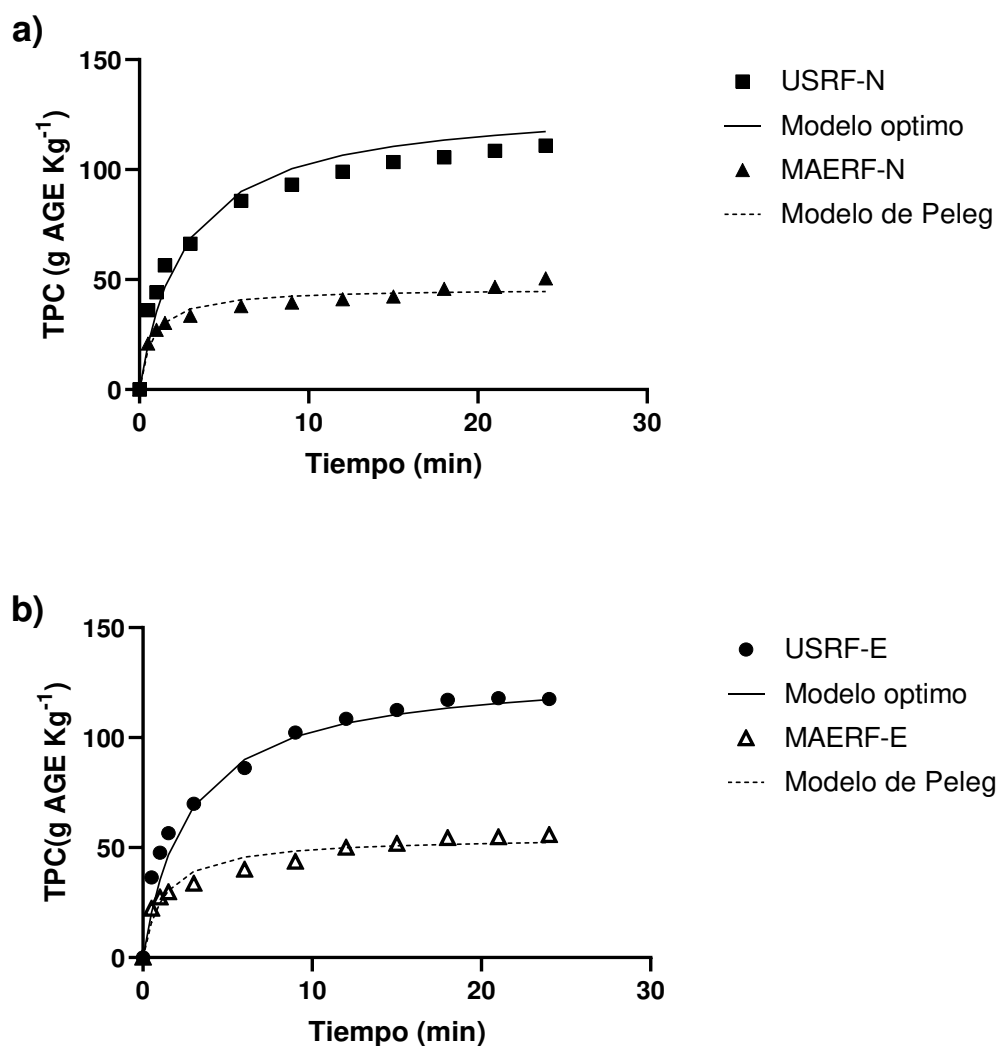


Figura 3.26. Datos experimentales y predichos por los modelos cinéticos de extracción del contenido de fenoles totales (TPC) durante la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y la extracción por maceración (MAE) de (a) RF-N, tejido residual de frutilla sin biofortificar (RF-N); y (b) RF-E tejido residual de frutilla biofortificado.

La Tabla 3.34 proporciona información adicional sobre la concentración máxima de TPC alcanzada durante el proceso de extracción. Para el USRF-N, la concentración máxima determinada fue de 103.6 g AGE Kg⁻¹, mientras que para el MAERF-N, fue de sólo 46.3 g AGE Kg⁻¹. Del mismo modo, para USRF-E, la concentración máxima alcanzada fue de 117.3 g AGE Kg⁻¹, mientras que para MAERF-E, fue de 55.5 g AGE Kg⁻¹. Estos valores demuestran además la superioridad de la extracción asistida por ultrasonidos para alcanzar mayores concentraciones de TPC en comparación con la maceración. Los resultados predichos a partir del modelo óptimo fueron consistentes con los datos experimentales determinados, confirmando su capacidad predictiva. El rendimiento de extracción de TPC

predicho de 110.9 g AGE Kg⁻¹ no fue significativamente diferente al experimental para RF-N, pero fue significativamente inferior en un 5% al obtenido experimentalmente para RF-E (Tabla 3.34), mostrando que el modelo tiene un rango de error válido para describir los rendimientos de TPC de RF luego de la secuencia de biofortificación con radiación UVA y extracción por ultrasonido. En particular, los rendimientos de extracción de TPC fueron mayores para la RF biofortificado con compuestos fenólicos. Comparando con la extracción de referencia por Soxhlet, descrita previamente, la extracción UAE permitió rendimiento hasta 6 veces superior comparado con la extracción por Soxhlet de mayor rendimiento en TPC (15.8 g AGE Kg⁻¹; con etanol 80% y relación de extracción de 1:40 g mL⁻¹).

En cuanto a los parámetros cinéticos, la constante de velocidad K1 predicho fue inferior (53 min⁻¹) en comparación con los valores experimentales de 70 min⁻¹ para USRF-N y 67.3 min⁻¹ para USRF-E. Esto indica que la velocidad real de extracción de TPC en estas condiciones de extracción fue superior a la predicha por el modelo, superando incluso la velocidad de extracción para el sistema sin ultrasonido, MAE. Estos resultados ponen de manifiesto la eficacia de la extracción asistida por US (UAE) para lograr una mayor tasa de extracción de TPC. Comparado con la extracción por maceración por 4 horas de RF descrita previamente, la velocidad fue superior a la mostrada bajo las condiciones de extracción con agua a 70°C con un K1 de 8.6 min⁻¹ con 1:40 g mL⁻¹ y etanol 80% a 70°C con 6.1 min⁻¹. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir del modelo óptimo fueron consistentes con los datos experimentales, confirmando su capacidad predictiva. Para la constante de capacidad de extracción K2, el valor predicho fue de 130.9 g AGE Kg⁻¹, que se aproximó al valor experimental de 125.5 g AGE Kg⁻¹ determinado para el USRF-E. En todos los casos, los valores obtenidos con UAE fueron superiores a los obtenidos con MAE. Incluso superiores al estudio por maceración durante 4 horas de RF donde la mayor capacidad de extracción se evidenció con EtOH80% a 70°C con 1:20 g mL⁻¹, la cual fue 3.3 veces inferior a la K2 determinada experimentalmente con USRF-E. Esto enfatiza aún más la superioridad del proceso de biofortificación con compuestos fenólicos y UAE para extraer un mayor número y cantidad de compuestos fenólicos de la RF. Según la Figura 3.26, puede observarse que, a partir del rango de 15-18 min de extracción, la variación del TPC empezó a ser mínima. Por lo tanto, puede estimarse que el rendimiento máximo puede obtenerse bajo parámetros óptimos después de 15 min de extracción UAE.

La temperatura es un factor importante que puede influir en la eficacia de la extracción en los procesos UAE. En el presente estudio, la temperatura durante el proceso de extracción se dejó fluctuar libremente, y fue incrementado hasta oscilar entre 64-82°C con una temperatura media de 68°C para las condiciones de 40% de etanol y 100% de potencia de UAE. Trabajar a temperaturas más elevadas puede tener varios efectos en el

proceso de extracción. En primer lugar, favorece la difusión de los compuestos fenólicos a través del solvente, lo que permite una cinética de extracción más rápida. Sin embargo, esto puede ser especialmente perjudicial para los compuestos termosensibles que pueden degradarse o sufrir cambios estructurales a temperaturas más elevadas. En segundo lugar, el aumento de la temperatura mejora la solvatación de los compuestos fenólicos, lo que conduce a un mayor rendimiento de extracción (Chemat et al., 2017b). Los estudios realizados por Galván D'Alessandro et al. (2014) sobre residuos de *Aronia melanocarpa* informaron que la máxima recuperación de compuestos fenólicos totales (TPC) y antocianinas a 70°C se obtiene utilizando una potencia ultrasónica de 100W y etanol al 50% como disolvente de extracción. Los valores reportados fueron de 60 g Kg⁻¹ para TPC y 12 g Kg⁻¹ para antocianinas. Según los resultados de Urango et al. (2021), la termosonicación es hasta 50 veces más barata que las tecnologías convencionales. Esta ventaja de costos puede atribuirse a varios factores.

En primer lugar, la termo sonicación generalmente requiere tiempos de extracción más cortos en comparación con los métodos tradicionales, lo que lleva a una reducción del consumo de energía y de los costos operativos. Además, el uso de ultrasonidos puede mejorar la eficacia de la extracción, permitiendo mayores rendimientos y reduciendo la cantidad de disolvente necesaria. Esto puede suponer un ahorro de costos relacionados con la compra y eliminación de los solventes de extracción empleados en el proceso. La composición de los subproductos agroindustriales de la frutilla ha demostrado un excelente potencial como fuente de compuestos fenólicos obtenidos mediante UAE. Los rendimientos obtenidos de RF mediante UAE fueron superiores al contenido de TPC reportado para hojas de plantas de frutilla silvestre extraídas por maceración con 100% de agua a 25°C (83.6 g AGE Kg⁻¹) (Mudnic et al., 2009).

En comparación con otros residuos agroindustriales, como la cáscara de granada y las semillas de uva, el contenido de TPC obtenido a partir de subproductos agroindustriales de frutilla mediante UAE también fue superior. La cáscara de granada extraída con ultrasonidos a 25°C durante 60 minutos produjo un contenido de TPC de 7 g AGE Kg⁻¹, mientras que las semillas de uva extraídas mediante UAE a 56°C con etanol al 50% durante 29 minutos produjeron un contenido de TPC de 50.4 g AGE Kg⁻¹ (Ghafoor et al., 2009; Pan et al., 2011)

3.6.3. Efecto de la extracción asistida por ultrasonido (UAE) sobre el perfil de compuestos fenólicos de RF.

La UAE permitió la extracción, identificación y cuantificación de once compuestos fenólicos principales, encabezados por elagitaninos tales como, tetra galloil glucosa isómero (TGI), sanguiin-H6 (SG), Bis-HHDP-glucosa isómero (BHDP), agrimoniin (AGN);

derivados de la procianidina, como procianidina trímero (PT), procianidina tetramero (PCT); derivados del ácido elágico, como el ácido elágico pentóxido (EAP) y el ácido elágico libre (EA) y los flavonoles quercetina-3-o-glucurónido (Q3G), kaempferol-3-o-glucurónido (K3G), y kaempferol cumaroil hexóxido (KCH). La presencia de diferentes partes de la planta de frutilla en la composición de la RF permite obtener una variedad de compuestos fenólicos con diferentes propiedades bioactivas. Según la Figura 3.27, USRF-E presentó la mayor concentración del TGI con 2.4 g Kg⁻¹. Esta concentración fue significativamente superior en comparación con USRF-N en un 126% y con MAERF-N en un 319%.

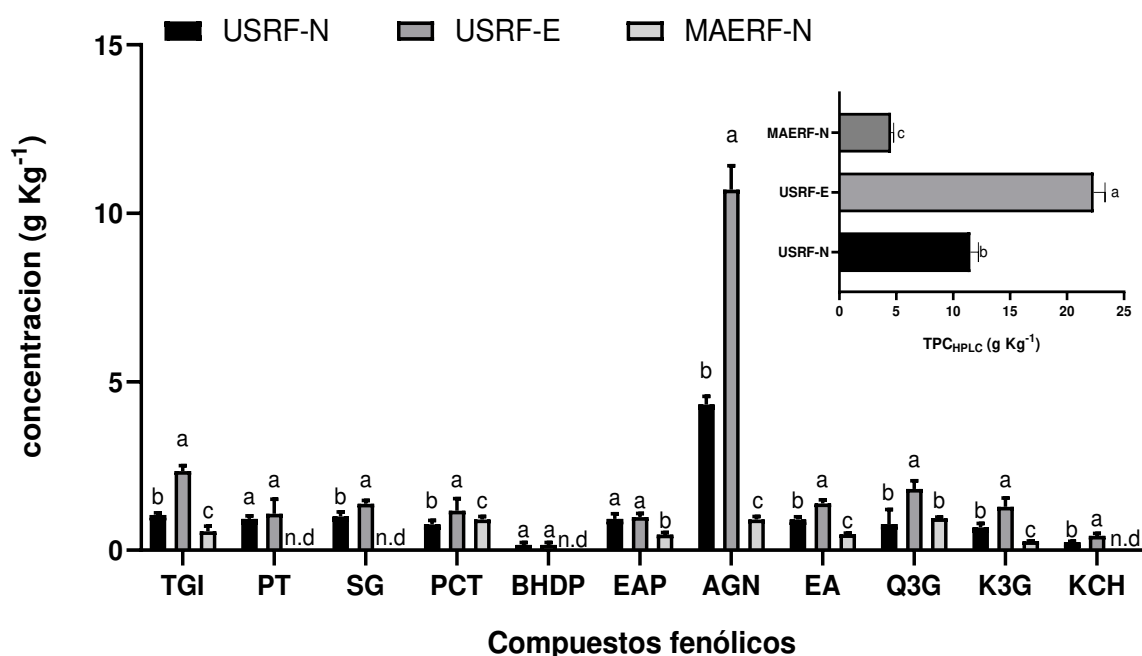


Figura 3.27. Perfil de compuestos fenólicos individuales y totales para diferentes procesos de extracción asistida por ultrasonido (UAE) y su control (MAE) en residuos agroindustriales de frutilla (RF).

TGI, isómero tetragalloilglucosa; PT, procianidina trímero; SG, saguinn; PCT, procianidina tetramero; BHDP, bis-HHDP-glucosa isómero; EAP, ácido elágico pentóxido de; AGN, agrimoniin; EA, ácido elágico libre. Q3, quercetina-3-o-glucurónido; K3G, kaempferol-3-o-glucurónido de; KCH, kaempferol-cumaroil hexóxido; P3G, pelargonidina-3-o-glucurónido; TPC_{HPLC}, contenido fenólico total por HPLC. n.d, no detectado. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$) entre los sistemas de extracción de un mismo compuesto.

El aumento observado en la concentración del compuesto TGI en USRF-E indica que el proceso de biofortificación con compuestos fenólicos, combinado con UAE, mejora la extracción de este compuesto en comparación con el control (RF-N) y el método de extracción MAE (MAERF-N). El uso de UAE demostró ser ventajoso en la recuperación de compuestos como PT (0.93-1.10 g Kg⁻¹), BHDP (0.16 g Kg⁻¹) y SG (1.00-1.40 g Kg⁻¹). Estos compuestos no se detectaron en el extracto obtenido mediante MAERF-N, lo que indica

que la aplicación de ultrasonido facilitó su extracción. Las procianidinas y los elagitaninos son compuestos bioactivos conocidos por sus potenciales beneficios para la salud, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Gesek et al., 2021; Rue et al., 2018). Estos compuestos se encuentran típicamente en los órganos florales de la planta de frutilla y están presentes en bajas concentraciones en la propia fruta (Hanhineva et al., 2008).

La presencia de agrimoniin como compuesto principal tanto en los extractos obtenidos por extracción asistida por ultrasonidos (UAE) como en extractos obtenidos por maceración (MAE) de los subproductos de frutilla (RF) pone de relieve su importancia como marcador taxonómico de la familia *Rosaceae*. El agrimoniin ha cobrado importancia en el mercado nutracéutico debido a sus propiedades bioactivas, en particular su potencial antioxidante (Grochowski et al., 2017). En el caso de la RF con UAE y la biofortificación con compuestos fenólicos (USRF-E), la concentración de agrimoniin alcanzó un máximo de 10.71 g Kg⁻¹, seguido de 4.32 g Kg⁻¹ en USRF-N, y 0.91 g Kg⁻¹ en MAERF-N. Estas concentraciones fueron significativamente superiores en comparación con la concentración notificada de 1.4 g Kg⁻¹ en frutos de frutilla extraídos con acetona como disolvente (Aaby et al., 2012).

En cuanto a los derivados del ácido elágico, el USRF-E mostró una concentración significativamente mayor de EA (1.40 g Kg⁻¹), mientras que tanto el USRF-N como el USRF-E presentaron concentraciones similares de EAP (0.93-0.99 g Kg⁻¹), sin diferencias significativas entre ellos. Entre los flavonoles, Q3G tuvo la concentración más alta de 1.82 g Kg⁻¹ en USRF-E, que fue significativamente mayor que la concentración reportada de 0.30 g Kg⁻¹ en frutilla extraída con acetona (da Silva Pinto et al., 2008). El compuesto KCH (0.24-0.43 g/Kg) no se detectó en MAERF-N. El total de todos los compuestos fenólicos cuantificados (TPC_{HPLC}) en RF, como se muestra en la Figura 3.27, destaca el potencial de RF como una valiosa fuente de estos compuestos bioactivos. Utilizando tecnologías alternativas como la radiación UVA y la extracción asistida por ultrasonidos, la concentración de compuestos fenólicos en RF puede mejorarse significativamente, aumentando así su valor. Concretamente, se determinó que la concentración media de TPC_{HPLC} en USRF-E era de 22.34 g Kg⁻¹ RF, lo que supone un 85% más que en USRF-N y un 400% más que en MAERF-N. Esto indica el impacto significativo de la UAE y la biofortificación con compuestos fenólicos en el contenido fenólico global de la RF. Comparando estos resultados con informes anteriores sobre subproductos agroindustriales de la frutilla, la concentración de TPC_{HPLC} obtenida en el USRF-N es similar a la comunicada para la extracción con acetona 80% en una relación de extracción de 1:10 p/v utilizando un baño ultrasónico (12.91 g Kg⁻¹) (Villamil-Galindo et al., 2020). En la figura 3.28

se muestra el extracto rico en compuestos fenólicos a partir de RF, luego del proceso de liofilización. Con el fin de evaluar su estabilidad durante el proceso gastro intestinal y su bioactividad se sometió a un proceso simulado de digestión *in-vitro*.



Figura 3.28. Extracto liofilizado obtenido a partir del subproducto agroindustrial de frutilla biofortificado (RF-E) por asistencia de ultrasonido (UAE).

3.6.4. Estabilidad de los compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales de frutilla extraídos por ultrasonido durante el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*

La extracción adecuada y eficiente de compuestos fenólicos a partir de fuentes secundarias, como RF, es crucial tanto para el medio ambiente como para ampliar el mercado de ingredientes nutraceuticos. Sin embargo, un reto importante asociado a la utilización de suplementos nutraceuticos ricos en fenoles es su baja estabilidad durante la digestión gastrointestinal (Angelino et al., 2017). Los extractos obtenidos en condiciones óptimas de UAE se sometieron a liofilización y posteriormente a un proceso de digestión *in-vitro*. Se evaluó el impacto de las etapas del proceso de digestión en la concentración de compuestos fenólicos tanto para el USRF-N como para el USRF-E, como se presenta en la Tabla 3.35. Se determinó que las distintas etapas del proceso de digestión tenían un efecto significativo ($p < 0.05$) en la concentración de compuestos fenólicos. Durante la fase salival, la mayoría de los compuestos fenólicos en el USRF-E mostraron concentraciones significativamente más altas ($p < 0.05$) en comparación con el USRF-N.

En la fase gástrica, se observó una reducción significativa de la concentración de los compuestos fenólicos, con una bioaccesibilidad que oscilaba entre el 17.65% y el 87.50% para el USRF-N y entre el 33.33% y el 83.81% para el USRF-E (Tabla 3.35). La disminución del pH (1.3 ± 0.2) y la acción de enzimas como la α -amilasa y la pepsina contribuyeron a la ruptura de interacciones y estructuras cristalinas dentro del extracto liofilizado, lo que condujo a una degradación más rápida de los compuestos fenólicos. A

pesar de la degradación, persistió la tendencia de mayor concentración en el USRF-E, excepto para el EA, que mostró mayor bioaccesibilidad en la fase gástrica para el USRF-N. Cabe destacar que la bioaccesibilidad de los compuestos SG y AGN en la fase gástrica fue mayor en USRF-N (56.7% a 69.2%) con concentraciones de 0.76 y 4.73 g Kg⁻¹, respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones fueron inferiores a las de SG y AGN en la fase gástrica de USRF-E (1.40 y 6.20 g Kg⁻¹) con bioaccesibilidades de 52.75% y 47.30%, respectivamente. Aunque el USRF-E experimentó un mayor porcentaje de pérdida durante la fase gástrica en comparación con su concentración inicial, la cantidad de SG y AGN que permaneció en la fase gástrica fue mayor para el USRF-E. Para la fase intestinal, KCH y P3G no se identificaron ni cuantificaron en el USRF-E, mientras que en el USRF-N se mantuvieron estables en un 28% y un 25%, respectivamente. EA y Q3G exhibieron la mayor bioaccesibilidad en la FI, con valores de 73.68% y 64.00% en USRF-E, similares al porcentaje de bioaccesibilidad reportado Kaeswurm et al. (2022) para flavonoles de siete variedades de manzana: 66% para la pulpa y 52% para la cáscara.

Tabla 3.35. Estabilidad a la digestión *in-vitro* de los compuestos fenólicos del extracto de subproductos de frutilla biofortificada con estrés abiótico obtenido por extracción asistida por ultrasonido.

Muestra	Compuesto	Concentración (g Kg ⁻¹)			Bioaccesibilidad (%)	
		Fluido salival (FS)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)
USRF-N	TGI	2.24± 0.36a	1.14± 0.32b	0.55± 0.16b	52.78	25.46
	PT	0.90± 0.10a	0.37± 0.03b	0.22± 0.10c	38.95	23.16
	SG	1.14± 0.20a	0.76± 0.13b	0.22± 0.03c	56.72	16.42
	PCT	0.88± 0.06a	0.43± 0.02b	0.29± 0.04c	46.74	31.52
	BHDP	0.64± 0.09a	0.06± 0.01b	0.08± 0.003b*	21.43	17.86
	EAP	0.76± 0.15a	0.06± 0.004b	0.06± 0.002b	17.65	17.65
	AGN	5.40± 0.18a	4.73± 0.43a	2.52± 0.20b	69.15	36.84
	EA	0.84± 0.03a	0.57± 0.06a*	0.16± 0.03b	83.82*	23.53
	Q3G	0.98± 0.03a	0.51± 0.04b	0.40± 0.03b	36.43	28.57
	K3G	1.51± 0.48a	0.88± 0.07ab	0.30± 0.07b	75.21	25.64
	KCH	0.41± 0.05a	0.23± 0.04b	0.10± 0.06c*	65.71	28.57*
	P3G	0.08± 0.03a*	0.07± 0.04a	0.02± 0.002a*	87.50	25.00*
	TPC _{HPLC}				59.84	29.74
USRF-E	TGI	2.15± 0.24a	1.85± 0.22a*	1.19± 0.15b*	70.08*	45.08*
	PT	1.11± 0.04a*	0.66± 0.02b*	0.65± 0.02b*	48.53*	47.798*
	SG	1.62± 0.16a*	1.44± 0.20a*	0.42± 0.01b*	52.75*	15.38*
	PCT	2.41± 0.01a*	1.62± 0.07b*	0.66± 0.12c*	72.00*	29.33*
	BHDP	0.63± 0.15a	0.49± 0.02a*	0.04± 0.001b	58.33*	4.76
	EAP	1.77± 0.08a*	1.33± 0.10b*	0.99± 0.02c*	73.89*	55.00*
	AGN	8.13± 0.84a*	6.21± 0.37ab*	4.12± 1.20c	47.30*	31.38
	EA	1.42± 0.15a*	0.25± 0.01c	0.56± 0.02b*	32.89	73.68*
	Q3G	2.64± 0.02a*	0.85± 0.16c*	1.12± 0.08b*	48.57*	64.00*
	K3G	1.98± 0.03a	0.98± 0.05b	0.70± 0.14c*	71.53	51.09*
	KCH	0.94± 0.004a*	0.88± 0.07b*	n.d	83.81*	n.d
	P3G	0.04± 0.0001a	0.02± 0.01a	n.d	33.33	n.d
	TPC _{HPLC}				57.94*	36.47*

USRF-N, Extracto asistido por ultrasonidos a partir de subproducto de fresa control; USRF-E, Extracto asistido por ultrasonidos a partir de subproducto de frutilla en condiciones óptimas de biofortificación TGI, isómero tetragalloilglucosa; PT, procianidina trómero; SG, saguinn; PCT, procianidina tetrámero; BHDP, bis-HHDP-glucosa isómero; EAP, ácido elágico pentóxido de; AGN, agrimoniin; EA, ácido elágico libre. Q3, quercetina-3-o-glucurónido; K3G, kaempferol-3-o-glucurónido de; KCH, kaempferol-cumaroil hexóxido; P3G, pelargonidina-3-o-glucurónido; TPC_{HPLC}, contenido fenólico total por HPLC. n.d, no detectado. Letras minúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). *: Diferencias de medias ($p < 0.05$) entre el mismo compuesto de las muestras USRF-N y USRF-E.

En términos de TPC_{HPLC}, la concentración de compuestos fenólicos que permanecieron estables en el fluido gástrico, sin embargo, en el fluido intestinal la concentración de compuestos fenólicos fue significativamente mayor en USRF-E (10.5 g Kg⁻¹) en comparación con USRF-N (4.90 g Kg⁻¹). El uso de UAE como tecnología de extracción no sólo proporciona ventajas tecnológicas, como la reducción de los tiempos de extracción y el aumento de los rendimientos, sino que también mejora la bioaccesibilidad

de los compuestos fenólicos en la RF. Como se discutió previamente, la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de RF-N y RF-E liofilizados, sin ningún proceso de extracción, tenían una bioaccesibilidad del 15.3% para RF-N y del 22% para RF-E en la fase intestinal (FI), siendo AGN el compuesto mayoritario a una concentración de 0.45 g Kg^{-1} en FI de RF-E (Tabla 3.20). Estos valores fueron inferiores a las concentraciones reportadas para USRF-E en la fase intestinal (4.12 g Kg^{-1}), destacando el efecto del ultrasonido en la liberación de compuestos fenólicos de la matriz vegetal, que de otra manera dificulta su solubilización y reduce su potencial bioactivo (Tabla 3.35). Estos resultados ponen de relieve la importancia de la RF como fuente valiosa de elagitaninos.

Tal como se había descrito anteriormente, los elagitaninos han demostrado su capacidad para interactuar con la microbiota de los individuos y su biotransformación por bacterias como *Gordonibacter urolithinfaciens*. Este proceso microbiano involucra la decarboxilación de un anillo de lactona de ácido elágico, lo que lleva a la producción de metabolitos conocidos como urolitinas tipo A y B (Lopez-Corona et al., 2022). Estudios *in-vivo* han demostrado que estos metabolitos pueden ingresar al torrente sanguíneo dentro de las 6-8 h posteriores al consumo de alimentos ricos en elagitaninos. Estas observaciones resaltan los posibles beneficios para la salud asociados con el consumo de alimentos ricos en elagitaninos, como RF, y su impacto en el metabolismo microbiano intestinal y la circulación sistémica de compuestos bioactivos (Piwowarski et al., 2015).

3.7. Extracción asistida por ultrasonido (UAE) de compuestos fenólicos a partir de cáscara de manzana (GS)

3.7.1. Influencia de las variables de extracción asistida por ultrasonido sobre el contenido de fenoles totales (TPC) y las constantes cinéticas (modelo de Peleg) para GS.

La tabla 3.36 presenta los niveles de cada variable del proceso de UAE de TPC de cáscara de manzana (GS) para cada una de las 15 corridas del diseño experimental realizado. En cada corrida del experimento se determinó la concentración de los compuestos fenólicos totales (TPC) en los extractos obtenidos a partir de GS durante un tiempo de extracción asistida por ultrasonido (UAE) fijo (24 min). A continuación, los datos experimentales obtenidos en cada punto del diseño experimental se ajustaron al modelo de Peleg modificado (Ecuación 2.2), con valores R^2 comprendido entre 0.91-0.99, obteniendo las correspondientes constantes cinéticas K1 y K2 (Tabla 3.37).

Tabla 3.36. Variables del Diseño experimental de Box-Behnken, junto con los valores determinados y predichos de la constante de velocidad de Peleg (K1) y la constante de capacidad de Peleg (K2), derivados del modelo cinético de los compuestos fenólicos totales (TPC) en cáscara de manzana 'Granny Smith'.

Corrida	Relación extracción, (p/v) (X1: codificada)	Contenido de etanol (%vol) (X2: codificada)	Potencia US (%) (X3: codificada)	K1 (min ⁻¹)		K2 (g AGE Kg ⁻¹)		Temperatura final °C
				Determinado (Ec. 2.2)	Predicho (Ec. 3.19)	Determinado (Ec. 2.2)	Predicho (Ec. 3.20)	
1	1:20(-1)	0(-1)	60(0)	3.59	3.24	11.03	11.72	69
2	1:40(1)	0(-1)	60 (0)	3.06	3.24	9.87	11.87	71
3	1:20(-1)	80(1)	60 (0)	3.14	3.56	16.81	15.26	82
4	1:40(1)	80(1)	60 (0)	3.92	3.57	32.23	32.00	80
5	1:20(-1)	40(0)	20(-1)	2.65	2.79	15.22	15.57	71
6	1:40(1)	40(0)	20(-1)	2.06	2.79	34.82	33.85	68
7	1:20(-1)	40(0)	100(1)	3.00	2.79	25.45	27.88	71
8	1:40(1)	40(0)	100(1)	3.35	2.79	25.36	26.47	71
9	1:30(0)	0(-1)	20(-1)	2.48	2.54	8.89	10.56	67
10	1:30(0)	80(1)	20(-1)	3.46	2.86	22.45	22.40	82
11	1:30(0)	0(-1)	100(1)	2.42	2.54	17.39	13.03	64
12	1:30(0)	80(1)	100(1)	2.34	2.86	23.04	24.86	71
13	1:30(0)	40(0)	60 (0)	2.18	2.09	30.08	25.94	68
14	1:30(0)	40(0)	60 (0)	1.91	2.09	25.28	25.94	67
15	1:30(0)	40(0)	60 (0)	2.28	2.09	25.38	25.94	68

La tabla 3.37 muestra que las tres variables del proceso de extracción asistido por ultrasonido, la relación de extracción (X1), la concentración de etanol en la solución de extracción (X2), y el porcentaje de la potencia de la sonda ultrasónica (X3), afectaron significativamente ($p < 0.05$) la constante cinética de velocidad extracción (K1) de los TPC a partir de GS, así como también la interacción entre X1 y X2, y los términos cuadráticos $X1^2$ y $X2^2$ ($p < 0.05$). En cuanto a la constante de capacidad del modelo de Peleg, K2, fue afectada por las tres variables de la UAE, X1 ($p < 0.01$), X2 ($p < 0.01$) y X3 ($p < 0.05$), así como por las interacciones entre X1 y X2 ($p < 0.05$), X1 y X3 ($p < 0.01$), y el término cuadrático $X2^2$ ($p < 0.001$).

El contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) de GS obtenido durante la extracción asistida por ultrasonido (UAE), estudiada bajo las diferentes condiciones experimentales, estuvo en un rango de 7.70 a 23.80 g AGE Kg⁻¹, un rango amplio debido al efecto de las variables del proceso de extracción estudiados en la presente tesis (X1, X2, X3). Al disminuir X2 los compuestos fenólicos mostraron una afinidad por el solvente de polaridad media alta como el agua junto con el etanol al 40% con TPC entre los 18.5 y 20 g AGE Kg⁻¹, esto también sumado a que cuando se incrementaba la potencia de la sonda ultrasónica de 20 a 100% los TPC incrementaron hasta un 113%. Los máximos TPC obtenidos en los ensayos con UAE, fueron hasta un 95% superior a los TPC máximos obtenidos durante el ensayo de extracción por maceración con etanol 80% a 70°C (12.2 g

AGE Kg⁻¹), tal como se describió previamente para GS, con un tiempo de extracción de 4 h con agitación (120 rpm), siendo esta última claramente un tipo de extracción de mayor consumo energético y de tiempo, comparado con los 24 min máximos utilizados en la extracción asistida por ultrasonido.

Tabla 3.37. ANOVA para las constantes K1 y K2 del modelo de Peleg en la extracción asistida por ultrasonido (UAE) para cáscara de manzana ‘Granny Smith’.

Fuente de variación	GL	K1	K2
X1	1	*	**
X2	1	*	**
X3	1	*	*
X1*X2	1	*	*
X1*X3	1	ns	**
X2*X3	1	ns	ns
X1 ²	1	*	ns
X2 ²	1	*	***
X3 ²	1	ns	ns
X1*X2*X3	1	ns	ns
X1 ² *X2	1	ns	ns
X1 ² *X3	1	*	ns
X1*X2 ²	1	ns	ns
X1*X3 ²	1	ns	ns
X2 ² *X3	1	ns	ns
X2*X3 ²	1	ns	ns
R ²	-	0.70	0.94
Falta de ajuste	14	ns	ns

X1: Relación de extracción (p/v). X2: Concentración de etanol (%v/v), X3: Porcentaje de la potencia de la sonda ultrasónica (%), GL: Grados de libertad. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. ns: $p > 0.05$.

3.7.2. Modelado y optimización de la extracción asistida por ultrasonido para GS.

Los modelos matemáticos son herramientas ingenieriles útiles, que facilitan significativamente la simulación, optimización, diseño y control de procesos a distintas escalas. Contribuyendo al aprovechamiento eficiente de la energía, el tiempo, las materias primas y los solventes en el proceso de extracción sólido-líquido (Bucić-Kojić et al., 2007).

Por ello, en la presente tesis se estudió la influencia de la relación de extracción (X1) el porcentaje de etanol en la solución de extracción (X2) y el porcentaje de potencia de la sonda ultrasónica (X3), sobre el contenido de compuestos fenólicos, específicamente sobre los parámetros cinéticos determinados a través del modelo de Peleg, debido a la similitud entre las cinéticas de extracción de compuestos fenólicos y de sorción (Peleg, 1988).

Se determinaron los parámetros cinéticos del modelo de Peleg modificado (K1 y K2) para cada condición experimental de extracción de TPC de GS (Tabla 3.36). La variación en las constantes cinéticas K1 y K2 para cada punto experimental, se ajustó adecuadamente a un modelo cuadrático con un $p_{\text{valor}} < 0.05$, un R^2 de 0.7 y 0.94, respectivamente, y falta de ajuste no significativa ($p > 0.05$) como muestra la tabla 3.37. Las constantes K1 (Figura 3.29) calculadas para cada corrida experimental del diseño BB se ajustaron a el modelo cuadrático (Ecuación 2.4), y se utilizó el procedimiento de 'Stepwise' para reducir los términos no significativos del modelo cuadrático original, llegando de esta forma a la ecuación 3.18 para K1 y ecuación 3.19 para K2.

$$K1 = 2.08947 + 1.52E - 003X1 + 0.16355X2 - 0.29535X3 + 0.32575X1X2 + 0.23216X1X3 - 0.26717X2X3 + 0.70197X1^2 + 0.61036X2^2 + 0.70529X1^2X3 \quad \text{Ec. 3.18.}$$

De acuerdo con los resultados obtenidos, cuando el solvente de extracción está compuesto solo por etanol al 80% ($X2=1$), para la mayor relación de extracción ($1:40 \text{ g mL}^{-1}$, $X1= 1$) y $X3=0$ (60%), la constante de velocidad de extracción K1 de TPC de GS se incrementó significativamente llegando a 3.92 min^{-1} (Figura 3.29). Por el contrario, cuando se realizó la extracción con $1:40 \text{ p/v}$; 40% etanol y 100% de potencia de la sonda ultrasónica el K1 fue de 3.0 min^{-1} . Viendo que a mayor concentración de etanol no se requiere la aplicación de una mayor potencia de US para acelerar el proceso de extracción para estas condiciones, contribuyendo al menor consumo de energía eléctrica y reducción de costos. Sin embargo, Cuando $X2=1$ es decir que el sistema de extracción estuvo compuesto solo por agua, y el gradiente de concentración fue bajo ($X1=-1, 1:20 \text{ p/v}$) la velocidad de extracción del sistema fue de 3.6 min^{-1} empleando el 60% de la potencia del ultrasonido ($X3=0$). Estos resultados son favorables, considerando que el agua es un solvente verde con baja toxicidad, bajo impacto en su disposición final y bajo impacto ambiental (Lajoie et al., 2022). Estos resultados también están ligados con el incremento propio de la temperatura del sistema que varió entre $70\text{-}85^\circ\text{C}$ siendo mayor para cuando se usó agua 100% ($X2=-1$) y 400W de potencia de US ($X3=+1$). Esto genera un incremento en la solubilidad de compuestos medianamente polares los cuales se pueden extraer de

manera más rápida gracias al uso de energía acústica en la extracción sólido-líquido, especialmente en los tejidos de la cáscara de manzana, ya que al ser una matriz rica en fibra presenta múltiples compuestos fenólicos ligados en su matriz. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ziaedini et al. (2010), quienes encontraron que usando maceración durante 80 min por encima de 70°C se incrementaba la solubilidad en agua de compuestos como la catequina, epicatequina y galocatequina.

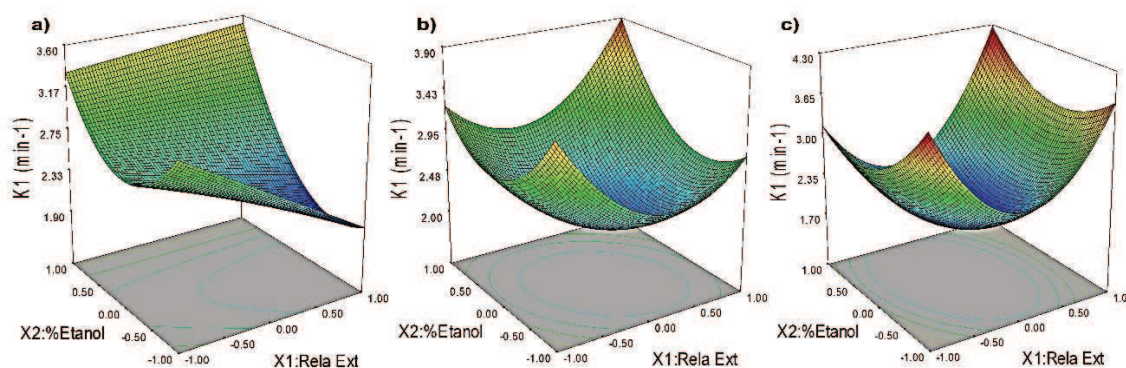


Figura 3.29. Gráficos de superficie de respuesta de la constante de la velocidad de extracción de compuestos fenólicos totales (K_1) del modelo cinético de Peleg para a) 20% de potencia ultrasónica. b) 60% de potencial ultrasónica. c) 100% de potencia ultrasónica para cáscara de manzana Granny Smith (GS-N).

La capacidad total de extracción del sistema de obtención de TPC a partir de GS empleando UAE, está descrita matemáticamente por la constante K_2 (Ecuación 3.20). A nivel experimental el rango de la constante de capacidad de extracción estuvo entre 8.90 y 34.82 g AGE Kg⁻¹, debido al efecto de X_1 , X_2 y X_3 así como las interacciones entre $X_1 \times X_2$, $X_1 \times X_3$ y el término cuadrático de X_2^2 como muestra la tabla 3.36. El incremento en el porcentaje de etanol en la solución de extracción a concentraciones medias entre el 50-60%, mostró un incremento en la constante de capacidad de extracción. En este rango de X_2 , se puede observar que al incrementar el gradiente de concentración de TPC entre el sólido y el solvente a través de la relación de extracción (X_1) se incrementa la constante de capacidad de extracción del sistema (K_2). Para una relación de extracción de 1:35 p/v ($X_1=0.5$) y 60% de etanol ($X_2=0.5$) y $X_3=0$ (60%), se tiene una $K_2 = 31.18$ g AGE Kg⁻¹, la cual se puede incrementar hasta un 17% más al emplear una relación de extracción de 1:40 g mL⁻¹ ($X_1=+1$). En la Figura 3.30 se puede observar que la potencia del US entre 20-60% (figura 3.30 a-b) mantuvo la tendencia de altos valores de la constante K_2 para altas relaciones de extracción y porcentajes de etanol entre 50-60%. Por otro lado, al aplicar potencias por encima del 60% (240W) (Figura 3.30-c) no se generaron aumentos significativos sobre la constante de capacidad de extracción del sistema K_2 ni para cuando el solvente fue 100% agua ($X_2=-1$) ni para cuando etanol al 80% ($X_2=+1$), los cuales

recibieron una intensidad ultrasónica de 319460.78 y 135099.69 W/m² respectivamente. Viendo que la K₂ se mantiene en un rango de 27-29 g AGE Kg⁻¹ cuando X₃ se trabaja en el rango de 60-100%. Llegando a valores de 8.3 g AGE Kg⁻¹ para la extracción realizada con agua 100% (X₂=-1) y relación de extracción de 1:40 g/mL (X₁=+1). Esto se puede deber a que en algunas matrices vegetales se ha reportado que el uso de altas potencia de US y temperaturas por encima de los 75°C pueden promover la generación de complejos insolubles en distintos metabolitos secundarios (Fernando & Soysa, 2015). No obstante, el espacio muestral analizado en esta presente tesis mostró que las potencias entre 80 y 240W tienen un efecto positivo sobre los parámetros cinéticos del proceso de extracción de compuestos fenólicos de GS, lo cual es positivo puesto que se requiere un menor gasto energético reduciendo costos e impactos ambientales en la revalorización de este tipo de subproductos agroindustriales. Hollá et al. (2023) evaluaron el impacto verde a través del software AGREE (v. 05 beta), evaluando la extracción asistida por ultrasonido empleando solventes como agua, etanol y sus mezclas en la recuperación de compuestos fenólicos a partir de distintos cultivares de manzana deshidratados (pulpa y cáscara). Se determinó una puntuación de 0.71 para la extracción UAE con 120W y etanol al 25% como solvente extracción, valor superior al obtenido para otro tipo de tecnologías emergentes como la extracción de líquidos con gases expandidos (GXLE por sus siglas en inglés gas-expanded liquid extraction) (0.61). De esta manera se puede visualizar el potencial de esta tecnología en la búsqueda de procesos más eficientes, de bajo impacto ambiental, con buena rentabilidad y practicidad.

$$K_2 = 25.94216 + 4.22057X_1 + 5.91935X_2 + 1.23201X_3 + 4.14935X_1X_2 - 4.92426X_1X_3 - 8.22861X_2^2 \quad Ec. 3.19$$

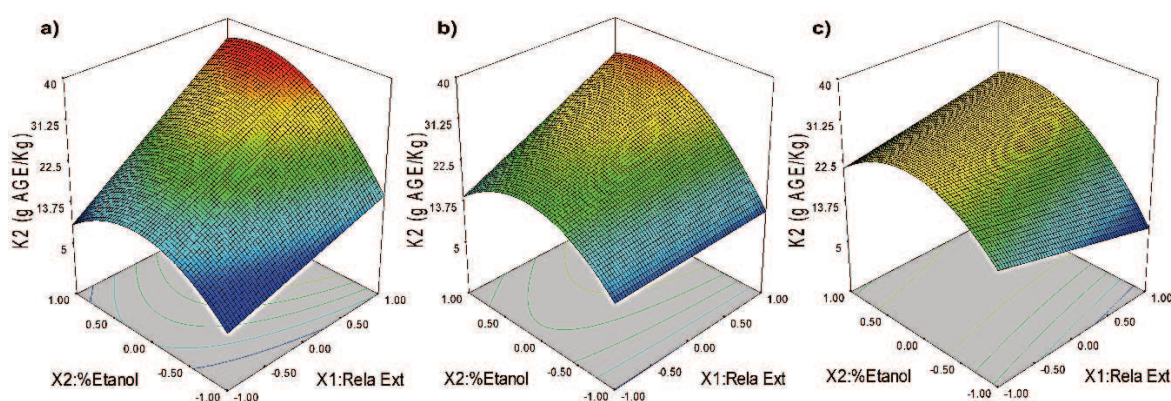


Figura 3.30. Gráficos de superficie de respuesta de la constante cinética de capacidad (K₂) de fenoles totales (TPC) del modelo cinético de Peleg para a) 20% potencia ultrasónica; b) 60% potencia ultrasónica; y c) 100% de potencia ultrasónica para cáscara de manzana 'Granny Smith' (GS).

El ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos cuadráticos de superficies de respuesta permite optimizar de manera simultánea ambos parámetros cinéticos en el modelo de Peleg ajustados para la extracción de compuestos fenólicos a partir de GS. Para ello, se determinaron las condiciones experimentales que maximizan K1 y K2 (ecuaciones 3.18 y 3.19, respectivamente). Mediante la optimización de respuestas múltiples y la función deseabilidad se determinaron los parámetros de extracción X1, X2 y X3 óptimos para obtener una velocidad máxima de extracción (K1) y la máxima capacidad de recuperación de TPC (K2) para GS (Tabla 3.38). De esta manera, se puede obtener un modelo cinético (modelo de Peleg modificado combinado con las ecuaciones cuadráticas) que permite conocer la concentración de los TPC durante el tiempo de extracción en función de sus constantes cinéticas y de las variables del proceso de extracción.

Tabla 3.38. Coeficientes del modelo de Peleg para las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos totales de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ (GS)

Variables			Muestra	Respuesta	K1 (min ⁻¹)	K2 (g AGE Kg ⁻¹)	adj-R ²	RSME	TPC (g AGE Kg ⁻¹)
Relación de extracción (p/v)	%EtOH	%US							
1:36	76	52	USGS-N	Ec 3.18-3.19	3.34	28.89	0.97	0.26	21.23b
1:36	76	52	USGS-N	Ec 2.2	3.22	28.21	0.99	0.14	20.29±0.5b
1:36	76	52	USGS-E	Ec 2.2	4.74	28.34	0.97	0.23	23.3±0.9a
1:36	76	0	MAEGS-N	Ec 2.2	2.54	6.76	0.98	0.5	6.26±0.2d
1:36	76	0	MAEGS-E	Ec 2.2	3.03	7.07	0.99	0.4	6.70±0.5c

%EtOH: porcentaje de etanol (v/v) en la solución disolvente. %US: porcentaje de potencia de los ultrasonidos. USGS-E: Extracción asistida por ultrasonido en condiciones óptimas de compuestos fenólicos a partir de GS con biofortificación de compuestos fenólicos. MAEGS-N: Extracción controlada de compuestos fenólicos en condiciones óptimas sin %US de GS-N. MAEGS-E: Control de la extracción de compuestos fenólicos en condiciones óptimas sin %US de GS-E. K1: Constante de velocidad del modelo de Peleg. K2: Constante de capacidad del modelo de Peleg. adj-R²: Coeficiente de regresión ajustado. RSME: Error cuadrático medio. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los distintos métodos de extracción y condición de GS, según lo determinado por la prueba de Tukey.

En la Figura 3.31 se muestran los valores de TPC obtenidos a través del tiempo de extracción UAE de GS con una relación de extracción de 1:36 p/v, 76% de etanol y el 52% de la potencia de US, los cuales fueron las variables del proceso de extracción optimizados en el rango de valores experimentales estudiado. Para validar los modelos de predicción desarrollados, se realizaron extracciones con GS con y sin biofortificación con compuestos fenólicos (GS-E y GS-N, respectivamente) bajo las condiciones óptimas determinando la cinética de extracción de compuestos fenólicos durante 24 minutos. Los datos de TPC obtenidos se ajustaron al modelo de Peleg modificado, y se compararon con los parámetros cinéticos óptimos definidos previamente. En la Tabla 3.38 se presentan los parámetros óptimos predichos con una constante de velocidad de extracción de K1= 3.34 min⁻¹ y una

constante de capacidad máxima del sistema de $K_2 = 28.89 \text{ g AGE Kg}^{-1}$. Para el extracto UAE del tejido de GS sin biofortificación con compuestos fenólicos (USGS-N) no se evidenciaron diferencias significativas con los valores predichos por el modelo óptimo de Peleg (Figura 3.31-a), con un rendimiento de TPC de $20.3 \text{ g AGE Kg}^{-1}$. El tejido de GS sometido a biofortificación (USGS-E) mostró un incremento del 41% en la constante de velocidad del sistema de extracción con un K_1 de 4.7 min^{-1} respecto al valor predicho. Sin embargo, en la constante de capacidad de extracción del sistema no hubo diferencias significativas con un K_2 de $28.3 \text{ g AGE Kg}^{-1}$ (Tabla 3.38). El contenido de TPC para USGS-E fue el más alto entre todas las determinaciones de los ensayos de validaciones con $23.3 \text{ g AGE Kg}^{-1}$. Comparando con la extracción sin aplicación de la potencia del US (MAE) se observaron parámetros cinéticos y rendimientos significativamente inferiores respecto a la extracción con UAE. La tabla 3.38 muestra que para MAEGS-E la K_1 y K_2 fueron 56% y 300% inferiores a las constantes cinéticas de USGS-E, además de que el rendimiento de extracción de MAE luego de los 24 min de extracción fue un 70% inferior.

Los presentes resultados dejan en manifiesto las ventajas tecnológicas que trae el uso de tecnologías de alternativas para incrementar el potencial bioactivos de los residuos agroindustriales, como lo es la aplicación de estrés abiótico en conjunto con una tecnología de extracción eficiente como la extracción asistida por ultrasonido, que permite una mayor recuperación de compuestos bioactivos de alto valor como lo son los compuestos fenólicos, donde, adicionalmente, el uso de solventes verdes permite reducir sustancialmente los consumos energéticos, los tiempos y los impactos ambientales de estos procesos de revalorización de residuos agroindustriales. Esto se confirma al observar los resultados analizados previamente en la presente tesis donde se estudió la extracción Soxhlet como tecnología tradicional de referencia, la cual para GS mostró su mayor rendimiento de TPC con el etanol 80% como solvente, y con una relación de extracción de 1:40 p/v obteniéndose $11.9 \text{ g AGE Kg}^{-1}$ de TPC en GS-N, logrando aumentar este rendimiento en un 96% con la metodología aplicada a USGS-E ($23.3 \text{ g AGE Kg}^{-1}$). Respecto a los parámetros cinéticos estudiados previamente en esta tesis en la extracción por maceración (4 horas) con agitación y temperatura (20 y 70°C), se determinó que para el etanol 80% a 70°C su mayor K_1 fue 2.4 min^{-1} y el K_2 de $11.94 \text{ g AGE Kg}^{-1}$, y con el agua 100% a 70°C se obtuvo un K_1 de 0.5 min^{-1} y un K_2 $13.5 \text{ g AGE Kg}^{-1}$; en ambos casos los valores de las constantes cinéticas del modelo de Peleg fueron significativamente inferiores a los obtenidos tanto para USGS-N como para USGS-E. Adicionalmente, estos últimos datos se reportan en un tiempo de extracción de 24 min frente a las 4 h de la extracción por maceración o Soxhlet con 80% etanol, lo cual significarían realizar 10 extracciones con US en el tiempo empleado durante la extracción por maceración y Soxhlet con etanol. Esta

ventaja competitiva permite darle un mayor valor agregado en el proceso de aprovechar integralmente los residuos generados durante acondicionamiento agroindustrial de manzana.

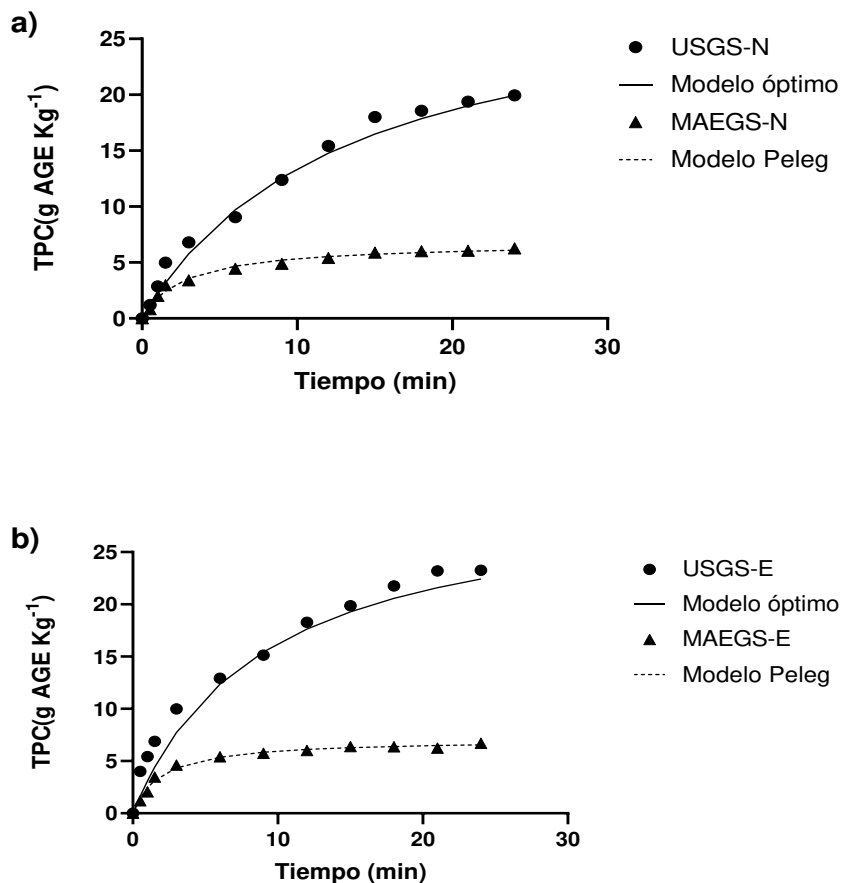


Figura 3.31. Datos experimentales y predichos por los modelos cinéticos de extracción del contenido de fenoles totales (TPC) durante la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y la extracción por maceración (MAE) de (a) cáscara de manzana sin biofortificar (GS-N); y (b) cáscara de manzana biofortificada con compuesto fenólicos (GS-E).

3.7.3. Efecto de la extracción asistida por ultrasonido (UAE) sobre el perfil de compuestos fenólicos de GS

El proceso de extracción de compuestos fenólicos asistida por ultrasonido mostró un impacto significativo sobre el perfil de compuestos fenólicos, como se muestra en la Figura 3.32. Para la (+)CTQN, el proceso de biofortificación y el ultrasonido permitieron la mayor recuperación de este compuesto (1.36 g Kg⁻¹) siendo 86% superior a USGS-N (0.73 g Kg⁻¹). Por otro lado, como se ha descrito previamente la manzana ‘Granny Smith’ es una fuente importante de procianidinas, especialmente procianidina B2 es uno de los compuestos mayoritarios en la cáscara con concentraciones que van desde 0.02-0.5 g Kg⁻¹ (Kalinowska et al., 2014). La PACB2 de GS extraída con UAE mostró una concentración

máxima de 0.45 g Kg^{-1} con USGS-E, siendo 1.1 veces superior a la obtenido en los extractos en el tejido sin biofortificar y 5.3 veces superior a la extracción en ausencia de energía acústica en el medio (MAEGS-N). La epicatequina que pertenece a la familia de los flavan-3-ol, también es un compuesto mayoritario en los tejidos de manzana (Lončarić et al., 2020) donde a través de la estrategias aplicadas a GS para incrementar su potencial bioactivo mediante el estrés abiótico y la extracción asistida por ultrasonido se logró una extracción 1700% superior al pasar de una concentración de 0.06 g Kg^{-1} con MAEGS-N a 1.10 g Kg^{-1} con USGS-E en 24 minutos de extracción respectivamente. Para el PACT no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre USGS-N y USGS-E, cuyas concentraciones fueron superiores al contenido de PACT extraído con MAEGS-N (0.03 g Kg^{-1}). Para la procianidina trómero (PT) el extracto USGS-E (0.44 g Kg^{-1}) mostró ser significativamente superior al tejido sin proceso de biofortificación (USGS-N; 0.07 g Kg^{-1}), para la extracción MAEGS-N no se lograron concentraciones superiores al límite de detección de la técnica. De manera similar ocurrió con el compuesto procianidina hexóxido (PCH) donde con una concentración de 0.14 g Kg^{-1} USGS-E mostró el mayor contenido, y no se logró su identificación ni cuantificación en la extracción con MAE. Esto se puede atribuir a la interacción de la cavitación generada por el US y el solvente de extracción, ya que este fenómeno en el cual se transforma la energía acústica en energía mecánica permite la liberación de compuestos ligados los cuales se solubilizan en función del solvente en su forma glicosilada (Munekata et al., 2020). El ACI mostró ser 57% superior con USGS-E comparado con USGS-N y 5.2 veces superior a la extracción con MAEGS-N. Con el uso de US como tecnología de extracción la Q3G con 1.0 g Kg^{-1} , fue superior en USGS-E en un 100% a USGS-N (0.5 g Kg^{-1}). Para los glicósidos derivados de quercetina como la quercetina pentóxido (QPN), quercetina hexosido (QHS) no se evidenciaron diferencias significativas ente los extractos con USGS-N y USGS-E. Para la Quercetina glucuronido (QG) se obtuvieron rendimientos superiores con el extracto USGS-E con 0.33 g Kg^{-1} . El flavonol K3G fue uno de los compuestos mayoritarios con una concentración de 1.35 g Kg^{-1} con USGS-E contrario a lo observado en la extracción por Soxhlet, donde la PACB2 fue el compuesto mayoritario en la extracción con 100% agua, seguido por la (-)EPQN. Para la FLN no se determinaron diferencias significativas (0.05 g Kg^{-1}) entre las diferentes extracciones ensayadas (Figura 3.32).

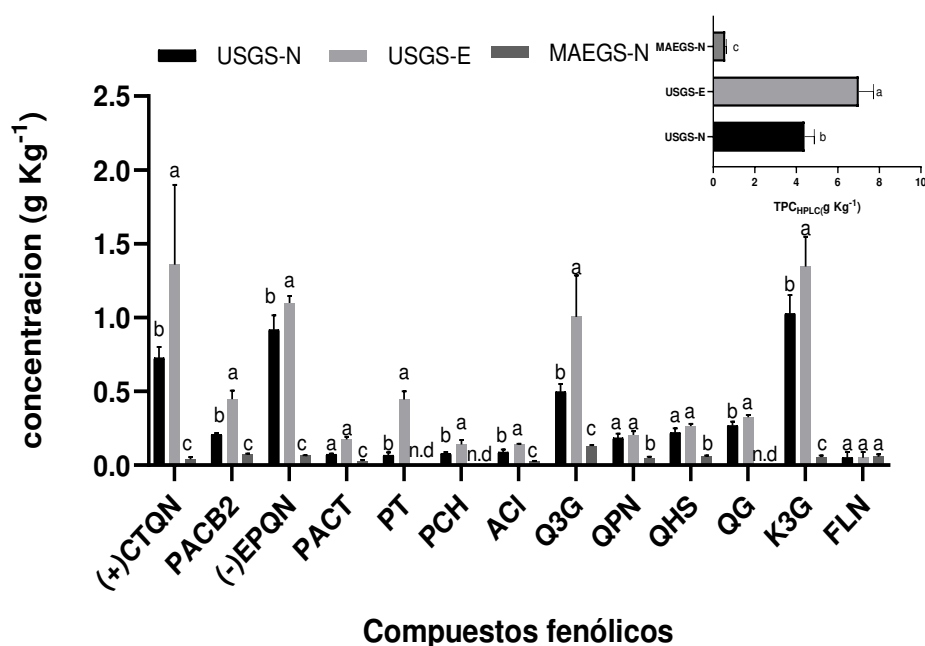


Figura 3.32. Perfil de compuestos fenólicos individuales y totales para diferentes procesos de extracción asistida por ultrasonido (UAE) y su control (MAE) a partir de GS.

USGS-E: Extracción asistida por ultrasonido en condiciones óptimas de compuestos fenólicos a partir de GS con biofortificación de compuestos fenólicos. MAEGS-N: Extracción controlada de compuestos fenólicos en condiciones óptimas sin %US de GS-N. MAEGS-E: Control de la extracción de compuestos fenólicos en condiciones óptimas sin %US de GS-E. (+) CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: Tetrámero de procianidina; ACI: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Pentóxido de quercetina; QHS: Hexóxido de quercetina; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido; FLN: Floretina. TPC_{HPLC}: Contenido fenólico total por HPLC. n.d: No detectado. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Para los TPC_{HPLC}, el tejido de GS biofortificado y extraído con ultrasonido USGS-E mostró una mayor solubilización total de compuestos fenólicos (7.0 g Kg^{-1}) seguido de USGS-N con 4.40 g Kg^{-1} y por último el control MAEGS-N 0.57 g Kg^{-1} (Figura 3.32). Estos valores de extracción asistida por ultrasonido y biofortificación con compuestos fenólicos son superiores a el rendimiento en fenoles totales obtenido por Hollá et al. (2023) para el extracto rico en compuestos fenólicos de pulpa y cáscara de manzana ‘Golden Delicious’ (0.86 g Kg^{-1}), ‘Artiga’ (1.17 g Kg^{-1}), ‘Angold’ (1.74 g Kg^{-1}) obtenidos con etanol 20% y 120W de potencia de ultrasonido. En la Figura 3.33 se muestra el producto resultante de la liofilización del extracto USGS-E, y en función de su potencial bioactivo, se podría utilizar como potencial suplemento nutracéutico. No obstante, para evaluar la factibilidad de ello, es importante estudiar la interacción y estabilidad que tiene este producto durante el proceso de digestión, considerando su potencial empleo para consumo por vía oral.



Figura 3.33. Extracto liofilizado obtenido a partir de cáscara de manzana biofortificada (GS-E) por asistencia de ultrasonido.

3.7.4. Estabilidad de los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana extraídos por ultrasonido durante el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*

La bioaccesibilidad es un factor crucial para el desarrollo de fuentes alternativas de compuestos nutraceuticos (Scarano et al., 2022) especialmente de fuentes alternativas como los residuos agroindustriales que requieren una estabilidad adecuada para que su aprovechamiento sea escalable, rentable y reproducible. En el caso de los extractos obtenidos por asistencia de ultrasonido y biofortificados mediante la aplicación estrés abiótico como el corte y la radiación UV-A, en GS, se puede influir en la liberación y accesibilidad de los compuestos fenólicos debido a la desintegración y ruptura de las estructuras celulares de la cáscara de manzana. En la tabla 3.39 se muestra la variación de la concentración de los compuestos fenólicos individuales del extracto US de GS con (USGS-E) y sin biofortificación (USGE-N). Con el fin de determinar el impacto de estas distintas estrategias tanto de biofortificación como de extracción sobre la estabilidad de dichos compuestos fenólicos durante la simulación del proceso digestivo.

Tabla 3.39. Estabilidad a la digestión *in-vitro* de los compuestos fenólicos del extracto biofortificado con estrés abiótico de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ obtenidos por extracción asistida por ultrasonido

Muestra	Compuesto	Concentración (g Kg ⁻¹)			Bioaccesibilidad (%)	
		Fluido salival (FS)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)
USGS-N	(+)CTQ	0.59 ± 0.04a	0.31 ± 0.03b	0.24 ± 0.05b	42.5	32.9
	PACB2	0.20 ± 0.04a	0.17 ± 0.01b	0.11 ± 0.01c	81.0	52.4
	(-)EPQN	0.90 ± 0.06a	0.76 ± 0.07b	0.63 ± 0.05c	82.6	68.5
	PACT	0.07 ± 0.01a	0.02 ± 0.004b	0.02 ± 0.01b	28.6	28.6
	PT	0.06 ± 0.01a	0.04 ± 0.01b	0.02 ± 0.01b	66.7	33.3
	PCH	0.07 ± 0.06a	0.02 ± 0.002b	n.d	25.0	n.d
	ACL	0.09 ± 0.12a	0.08 ± 0.06b	n.d	88.9	n.d
	Q3G	0.49 ± 0.11a	0.43 ± 0.14b	0.41 ± 0.05b	86.0	82.0
	QPN	0.17 ± 0.06a	0.14 ± 0.02b	0.08 ± 0.04b	77.8	44.4
	QHS	0.20 ± 0.06a	0.19 ± 0.02b	0.16 ± 0.01b	86.4	72.7
	QG	0.21 ± 0.07a	0.14 ± 0.02b	0.15 ± 0.04b	51.9	55.6
	K3G	1.08 ± 0.13a	0.61 ± 0.04b	0.49 ± 0.11b	59.2	47.6
	TPC _{HPLC}				71.0	48.7
USGS-E	(+)CTQ	1.16 ± 0.55a	0.97 ± 0.12a*	0.93 ± 0.07a*	71.3*	68.4*
	PACB2	0.45 ± 0.06a*	0.42 ± 0.06b*	0.36 ± 0.03b*	93.3*	80.0*
	(-)EPQN	1.10 ± 0.32a*	1.02 ± 0.13b*	0.60 ± 0.07c	92.7*	54.5
	PACT	0.15 ± 0.03a*	0.04 ± 0.004b*	0.03 ± 0.01b	23.5*	17.6
	PT	0.25 ± 0.02a*	0.07 ± 0.09b*	0.03 ± 0.01c	15.9*	6.82
	PCH	0.13 ± 0.09a*	0.02 ± 0.001b	0.02 ± 0.01b*	14.3	14.3*
	ACL	0.12 ± 0.06a*	0.09 ± 0.06b	n.d	64.3	n.d
	Q3G	1.00 ± 0.11a*	0.55 ± 0.11b	0.43 ± 0.10b	54.5	42.6
	QPN	0.19 ± 0.05a	0.16 ± 0.01b	0.03 ± 0.02c	80.0	15.0
	QHS	0.23 ± 0.03a	0.22 ± 0.01b*	0.18 ± 0.01c*	84.6*	69.2*
	QG	0.29 ± 0.09a	0.27 ± 0.017b*	0.20 ± 0.04b	81.8.*	60.6
	K3G	1.11 ± 0.13a*	1.21 ± 0.26b*	0.85 ± 0.03c*	89.6*	62.9*
	TPC _{HPLC}				64.8*	41.8*

USGS-N, Extracto asistido por ultrasonidos a partir de subproducto de manzana control; USGS-E, Extracto asistido por ultrasonidos a partir de subproducto de manzana en condiciones óptimas de biofortificación (+)CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: procianidina Tetramero; PCH: Procianidina hexóxido ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: Quercetina Pentóxido; QHS: Quercetina Hexóxido; QG: quercetina glucurónico; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. TPC_{HPLC}: Contenido fenólico total por HPLC. n.d: No detectado. Letras minúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). *: Diferencias de medias ($p < 0.05$) entre el mismo compuesto de las muestras USGS-N y USGS-E.

Las distintas fases digestivas simuladas, generaron variaciones significativas ($p < 0.05$) en la concentración de la mayoría de los compuestos fenólicos del extracto de GS. La fase gástrica (FG) generó reducciones entre el 11-75% para USGS-N siendo el compuesto PCH el más afectado en esta fase al reducir su concentración de 0.07 a 0.02 g Kg⁻¹ (Tabla 3.39). El ACL fue el compuesto de mayor estabilidad durante la FG con 0.08-0.09 g Kg⁻¹, siendo superior a lo reportado para el ácido clorogénico de la cáscara de

manzana “*Idared*” con 0.06 g Kg^{-1} en la FG (Istuk & Jakobek, 2021). La absorción de compuestos fenólicos en su gran mayoría se da en el intestino delgado, principalmente en el duodeno (González, 2017). Este es un proceso complejo y depende de varios factores, incluyendo la estructura química de los compuestos fenólicos, su solubilidad en agua y lípidos, y las interacciones con otros componentes presentes en la dieta, como se ha mencionado anteriormente en la presente tesis. Para los extractos obtenidos a partir de GS-R con UAE, la reducción en la concentración de los compuestos fenólicos se mostró en un rango de 18-71% en la FI donde los compuestos ACI y PCH llegaron a límites no detectables en esta fase, sin embargo, la Q3G y K3G fueron los compuestos de mayor concentración en la fase intestinal con 0.41 y 0.49 g Kg^{-1} , respectivamente, destacando que la Q3G tuvo un porcentaje de bioaccesibilidad promedio del 82%, siendo superior al 30% reportado por Ribas-Agustí et al. (2019) para quercetina glucósido de pulpa de manzana ‘Golden Delicious’. El total de los compuestos fenólicos presentes en USGS-N mostró una bioaccesibilidad promedio del 48.7% (Tabla 3.39), siendo superior al 25% mostrado por GS-N sin ningún tipo de tratamiento de biofortificación o extracción (Tabla 3.31).

La estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos y extracción asistida por ultrasonido (USGS-E) produjo extractos ricos en compuestos fenólicos que fueron afectados de manera diferente de acuerdo con las distintas fases de la digestión (Tabla 3.39). Para el caso de la FG, la concentración de los compuestos fenólicos de USGS-E presentó reducciones entre 7-86%, siendo en este caso también el PCH el compuesto más afectado al pasar de 0.57 g Kg^{-1} a 0.02 g Kg^{-1} . No obstante, la PACB2 tuvo la menor reducción de todos los compuestos en FG, solo del 7%, al pasar de 0.45 a 0.42 g Kg^{-1} . En la fase intestinal, se evidenció una mayor reducción de la concentración de los compuestos fenólicos que en el caso de USGS-N, entre el 20-93%, debido probablemente a que el proceso de biofortificación con aplicación de radiación UVA y daño mecánico por corte, genera diferentes hidrolisis de tipo enzimáticas que hacen que la estabilidad de los compuestos fenólicos se vea reducida, al dejarlos más expuestos luego de la extracción con US. Sin embargo, al contar con una mayor concentración inicial de compuestos fenólicos, la concentración de (+)CTQN, PACB2, (-)EPQN, PACT, PT, QHS, QG, K3G y los TPC_{HPLC} fue significativamente superior en la muestra USGS-E para la FG y, adicionalmente, en la FI la tendencia se mantuvo para (+)CTQN, PACB2, PCH, QHS y K3G, siendo este último compuesto junto a la (+)CTQN, los de mayor concentración en la FI, con 0.85 y 0.93 g Kg^{-1} , respectivamente. De igual forma, los TPC_{HPLC} de USGS-E fueron significativamente ($p < 0.05$) superiores (2.72 g Kg^{-1}) a los determinados en la muestra USGS-N, teniendo una bioaccesibilidad final de 42% y siendo 13% superior a lo

determinado para GS-E (29.2%) (Tabla 3.31). De esta manera, se puede considerar que la tecnología de ultrasonido no solo permite reducir los tiempos e incrementar los rendimientos de extracción, sino que también en conjunto con diferentes tecnologías de estrés abiótico como estrategia de biofortificación, favorecen la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos presentes en GS. Ribas-Agustí et al. (2019) reportaron el uso de pulsos eléctricos como elicitor en manzanas incrementando su contenido de compuestos fenólicos luego de 24 horas de almacenamiento, a su vez se mejoró la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en un 10% aproximadamente.

3.8. Caracterización de los bagazos residuales de la obtención de extractos rico en compuestos fenólicos de RF-E y GS-E por UAE

Luego de la obtención de los extractos ricos en compuestos fenólicos bajo las condiciones óptimas de biofortificación y extracción asistida por ultrasonido validadas para RF y GS, se concentraron dichos extractos y se recuperó el etanol de la solución de extracción mediante un rotavapor Buchi R-220 (Flawil, Suiza). Los extractos concentrados se llevaron a a -80°C para luego ser liofilizados hasta una humedad promedio del 7%. Este proceso permitió determinar el rendimiento de extracción como se puede observar en la Tabla 3.40. El extracto USRF-E tuvo un rendimiento del 6.1% es decir 6.1g de polvo de extracto liofilizado por cada 100g de RF fresco con el que se iniciaron la aplicación de las distintas estrategias de revalorización, a través de la biofortificación con compuestos fenólicos y la extracción asistida por ultrasonido. Como residuo del proceso de extracción de compuestos fenólicos, se obtiene un tejido vegetal agotado, que denominaremos bagazo. Para USRF-E, el bagazo mostró un alto contenido de proteína del 15.6%, así como de carbohidratos 34.4%, viendo que este tejido derivado del proceso de extracción se puede seguir analizando para dar un aprovechamiento integral que permita la transformación circular de las cadenas productivas de la frutilla y manzana. Actualmente existe una tendencia global hacia la transformación de la bioeconomía donde se reduzca, se reúsen y se reciclen la mayor cantidad de recursos disponibles, esto ha demostrado que las inversiones realizadas bajo esta premisa logran incrementar sus réditos monetarios hasta 9 veces (Campos et al., 2020). En la Figura 3.34-a, se muestra un posible esquema del proceso circular en la agroindustria de la frutilla donde a partir de su producción no solo para consumo en fresco si no para su transformación industrial donde allí se derivan residuos no evitables como el sépalo, el pedúnculo, hojas y resto de la fruta, los cuales se pueden emplear como fuente importante de compuestos nutraceuticos, mediante su extracción con solventes verdes como mezclas de etanol-agua, resaltando que el etanol proviene de base biológica de baja huella de carbono, ya que en la Argentina se ha desarrollado su producción a partir de maíz o caña de azúcar (INTA, 2019; Sánchez Riaño et al., 2010). Adicionalmente, el etanol se recupera en el proceso de obtención del extracto

rico en compuestos fenólicos, y puede ser empleado como combustible para el transporte y otras actividades. Este bagazo resultante, gracias a su alto contenido de carbohidratos también puede ser propuesto para ser sometido a un proceso de fermentación y obtener bioetanol, o como Maina et al. (2017) lo describieron, este tipo de residuos ricos en proteínas y carbohidratos son susceptibles a una biotransformación por acción de enzimas, bacterias o levaduras para la obtención de productos como biopesticidas, biogás o biofertilizantes que se pueden aplicar en los cultivos de frutilla o en otros, de esta forma cerrando el ciclo y abriendo la manera de monetizar cada uno de los derivado de valor que se generan en esta cadena productiva

Tabla 3.40. Rendimiento de los extractos obtenidos por ultrasonido a partir de los tejidos biofortificados de frutilla (USRF-E) y manzana (USGS-E) y composición del bagazo residual derivado del proceso de extracción.

Muestra	Rendimiento extracto (%)	Humedad Bagazo (%)	Proteína Bagazo BS (%)	Grasa cruda Bagazo BS (%)	Ceniza Bagazo BS (%)	Fibra cruda Bagazo BS (%)	Carbohidratos Bagazo BS (%)
USRF-E	6.1 ± 0.8	16 ± 0.2	15.64 ± 2.8	3.87 ± 0.7	8.2 ± 0.3	21.2 ± 0.4	34.37 ± 3.1
USGS-E	10.4 ± 0.5	12.2 ± 1.3	6.53 ± 0.4	4.80 ± 1.0	5.7 ± 0.3	24.94 ± 3.9	34.18 ± 7.0

En el caso de la agroindustria de la manzana “*Granny Smith*”, el aprovechamiento de uno de sus derivados del procesamiento industrial (la cáscara) mostró ser una excelente fuente de compuestos fenólicos, obteniéndose un rendimiento final promedio, luego del proceso de biofortificación con compuestos fenólicos y su extracción con UAE, del 10% es decir 10g de extracto liofilizado por cada 100g de cáscara fresca inicial (Tabla 3.40). Al igual que RF, en el proceso de extracción se genera un bagazo del cual se obtiene la pectina, la cual se puede utilizar en la obtención de algunos de los productos de consumo masivo de manzana, como es el caso de las mermeladas y jugos. Adicionalmente el bagazo de USGS-E, mostró también ser una fuente importante de fibra con cerca del 25%, además de carbohidratos del 34%. De esta manera, se abre la posibilidad de introducir este bagazo como ingrediente funcional para ser incorporado en distintas formulaciones alimentarias como fuente importante de fibra, como se han reportado en otras investigaciones (Coman et al., 2020). Adicionalmente, al observar la Figura 3.34b la circularización de la agroindustria de manzana ‘Granny Smith’ en Argentina, permite la generación de mayor valor agregado a la cadena a través de la elaboración de productos industriales de consumo masivo que provengan de un proceso circular, donde a partir de los residuos generados se puede obtener de manera sostenible, pectina, compuestos bioactivos, los cuales emplean solventes verdes recuperables y reusables, además los bagazos

resultantes, al igual que lo descrito para la frutilla, se pueden emplear para la bioconversión e introducirlos en el adecuado cultivo del fruto. De esta forma, se logra el incremento en los ingresos, el mercado, las ganancias y los puestos de trabajo no solo de mano de obra no calificada sino también calificada en cada uno de los procesos de valorización (Scarano et al., 2022).

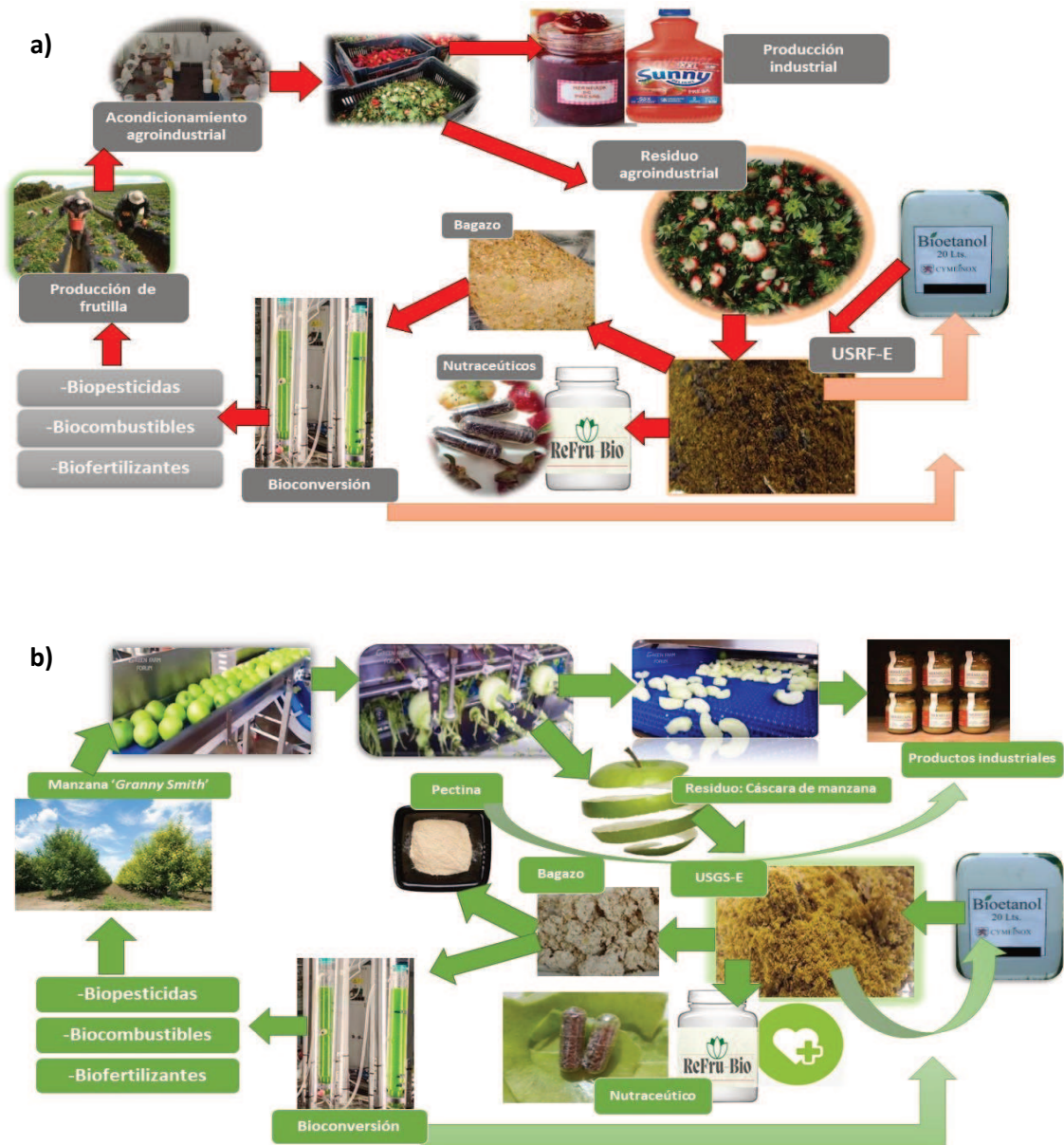


Figura 3.34. Transformación circular de la agroindustria de a) Frutilla y b) Manzana 'Granny Smith'.

3.9. Ensayos de bioactividad en cultivo celular, de las distintas estrategias de biofortificación y extracción asistida por ultrasonido de RF y GS.

3.9.1. Actividad anti proliferativa de la fracción digerida de RF sobre HDFa y células cancerígenas.

Existe poca información sobre el potencial anticancerígeno de los residuos agroindustriales de la frutilla. Los RF, al ser una fuente rica en compuestos fenólicos, durante el proceso digestivo tienen un tiempo de contacto en el colon, por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad anti proliferativa en líneas de cáncer de colon (Caco-2 y HT29) comparado con un control con líneas celulares HDFa sanas (Pacheco-Ordaz et al., 2018). La Figura 3.35 muestra el IC_{50} determinado para el extracto digerido biofortificado con compuestos fenólicos en condiciones óptimas (RF-E) comparado con el extracto digerido control (RF-N) en células de cáncer de colon, y como células control la línea celular HDFa (Fib). En las tres líneas celulares se observó una dependencia de la dosis frente a la proliferación de la viabilidad celular. Para Caco-2, ambos extractos mostraron un IC_{50} de 5.53 y 5.43 $mg\ mL^{-1}$ para RF-N y RF-E, respectivamente. Sin embargo, para HT29, el IC_{50} del extracto RF-E (2.73 $mg\ mL^{-1}$) fue significativamente inferior a la de RF-N (3.37 $mg\ mL^{-1}$). En comparación con el control con células sanas (Fib) con 11.97- 10.47 $mg\ mL^{-1}$ para RF-N y RF-E, respectivamente, se observó un IC_{50} significativamente mayor en comparación con el IC_{50} de las líneas de cáncer estudiadas, los cuales a su vez son inferiores a el IC_{50} reportado para el uso de compuestos fenólicos de arándano sobre células Caco-2 y HT29 (15-50 $mg\ mL^{-1}$) (Yi et al., 2005).

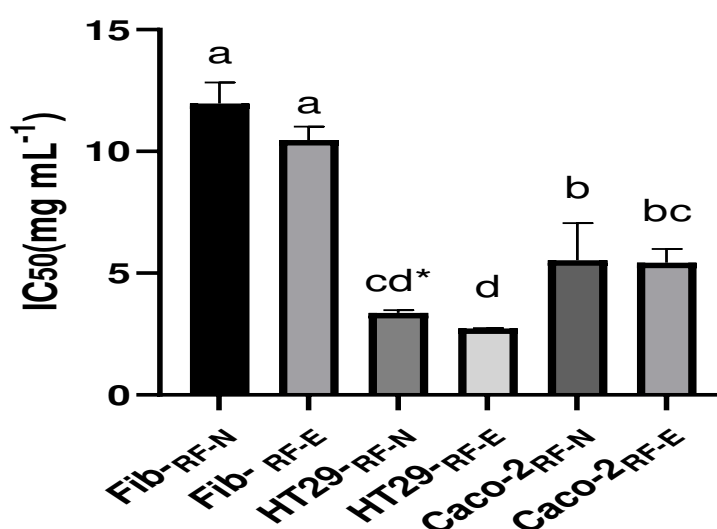


Figura 3.35. Determinación del IC_{50} del extracto digerido rico en compuestos fenólicos de residuos de frutilla sobre las líneas celulares HDFa y de Cáncer de colon Caco-2 y HT29. Letras diferentes indican diferencias significativas entre IC_{50} de diferentes líneas celulares, $p < 0.05$ por la prueba de Tukey. * Significa diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control de subproductos de frutilla (RF-N) y Subproducto de frutilla biofortificado (RF-E) según la t-test $p < 0.05$

Según los resultados de la Tabla 3.20, en los extractos RF-E, el principal compuesto fenólico de la fracción digerida fue el agrimoniin, un dímero compuesto por dos unidades α -1-O-galloil-2,3:4,6-bis-hexahidroxidifenoilD-glucosa unidas por un enlace C-O-C entre dos residuos de ácido gálico. En algunas bayas, el proceso digestivo potencia la actividad antiproliferativa de los glucósidos de quercetina y kaempferol (Seeram et al., 2006); sin embargo, para RF, la liberación de agliconas de los flavonoles a través del proceso digestivo, afectó negativamente a la estabilidad de estos compuestos. Varios estudios han corroborado el efecto antiproliferativo de los compuestos fenólicos presentes en el fruto de la frutilla (Seeram et al., 2006; Shi et al., 2015; Zhang et al., 2008) estableciendo un IC_{50} promedio para la línea celular HT29 de 114 mg mL^{-1} . No obstante, hasta la fecha, no se dispone de informes que aborden la actividad antiproliferativa de los compuestos fenólicos presentes en las partes no comestibles o no aprovechables de la frutilla. En este contexto, los hallazgos de la presente tesis revelan una notable bioactividad en estas partes no tradicionalmente consideradas, superando la eficacia, medida por el IC_{50} promedio, de la fruta entera sin digerir sobre las células HT29. Estos resultados muestran que el potencial antiproliferativo del subproducto agroindustrial de la frutilla sobre células de cáncer de colon, es más significativo en el extracto biofortificado mediante la aplicación de estrés abiótico con radiación UVA además de ser seguro en células de fibroblastos sanas (Fib). Dado que el cáncer colorrectal es el principal tipo de cáncer y tiene una de las tasas de mortalidad más altas de la sociedad, es importante revalorizar los subproductos agroindustriales de frutilla mediante biofortificación con compuestos fenólicos, extraer los compuestos y utilizar el extracto para prevenir esta enfermedad (Morgan et al., 2023).

3.9.2. Actividad antioxidante celular (%CAA) de los residuos agroindustriales de frutilla (RF).

Los subproductos del procesamiento de la frutilla tienen como compuestos principales los elagitaninos, los cuales, dependiendo de su grado de polimerización, tienen mejor bioactividad, ya que su carácter anfifílico les permite difundir pasivamente en la membrana celular y luego pasar al medio celular acuoso (Ky et al., 2015). Los desequilibrios entre especies prooxidantes y antioxidantes a nivel fisiológico desencadenan diversas condiciones que facilitan el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (Jacobo-Velázquez, 2022). La Figura 3.36-A muestra la capacidad antioxidante celular de los extractos digeridos de RF (2.2 mg mL^{-1}) para inhibir el radical APPH en la línea celular Caco-2. El RF-E mostró una capacidad antioxidante significativamente mayor (69%) que el extracto digerido de RF-N (58%), siendo un 11% superior, gracias al contenido de compuestos fenólicos que alcanzan bioaccesibilidad en el tejido biofortificado; siendo superior al reportado por Lang et al. (2021) para el extracto de arándano con 25% de CAA.

De acuerdo con el perfil fenólico identificado en la fracción digerida de la RF-E, los elagitaninos fueron los compuestos mayoritarios que han sido ampliamente reportados en las diferentes partes de la planta de frutilla, donde, además, se ha demostrado la capacidad inhibidora de radicales libres *in-vitro* (Villamil-Galindo et al., 2020). Las oxidasas son una de las fuentes primarias de ROS en la célula. La enzima óxido nítrico sintasa produce óxido nítrico a partir de L-arginina y oxígeno molecular. Al desencadenar una sobreproducción de ROS, los elagitaninos de los extractos digeridos de RF con sus grupos hidroxilo pueden neutralizar los radicales libres, especialmente el agrimoniin, que se ha descrito como un potente eliminador de radicales libres (Giampieri et al., 2012). Recientemente se ha informado que el consumo regular de frutilla reduce la producción de ROS y los niveles de biomarcadores oxidativos (Battino et al., 2009; Giampieri et al., 2016). Sin embargo, se dispone de poca información sobre el potencial antioxidante celular de las distintas partes de la planta de frutilla, como el sépalo, el pedúnculo y las hojas que constituyen el residuo del acondicionamiento agroindustrial de la frutilla. En este trabajo se demostró el potencial CAA de estos subproductos, permitiendo su utilización en la búsqueda de alternativas sostenibles para la obtención de compuestos bioactivos.

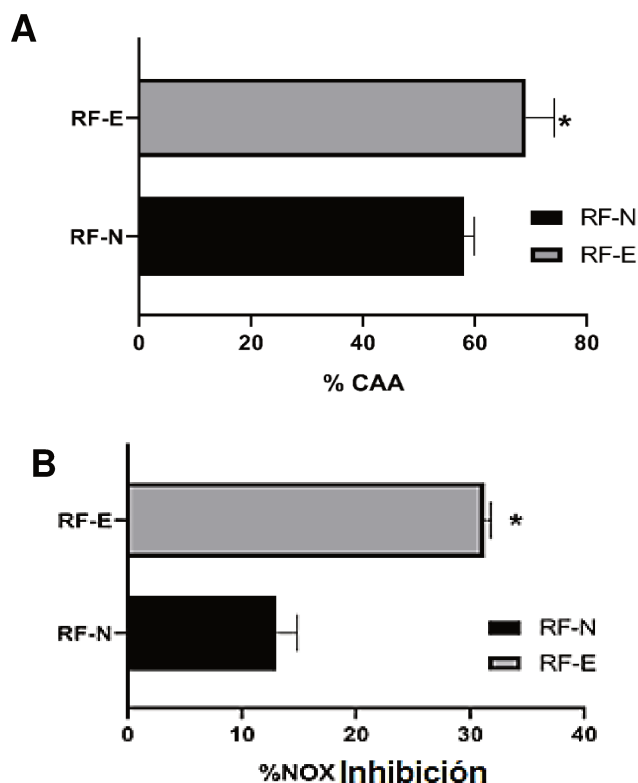


Figura 3. 36. Efecto de la fracción digerida de los residuos agroindustriales de frutilla (RF) biofortificados con compuestos fenólicos (A). Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH; (B) Inhibición de la producción celular de óxido nítrico (% NOX).

*: Significa diferencias significativas entre el control de subproductos de frutilla (RF-N) y las muestras biofortificadas de subproductos de frutilla (RF-E), según la t-test $p < 0.05$.

3.9.3. Potencial antiinflamatorio de los residuos agroindustriales de frutilla (RF).

El proceso de inflamación crónica está correlacionado con el desarrollo del síndrome metabólico, que se ha convertido en una de las principales causas de muerte en el mundo occidental debido a los malos hábitos de vida (Battino et al., 2021). Por lo tanto, actualmente se buscan compuestos con una actividad antiinflamatoria eficaz que impida el desarrollo de un estado previo a la enfermedad en una enfermedad crónica. El potencial antiinflamatorio de los compuestos fenólicos en la línea celular RAW muestra un comportamiento dependiente de la dosis. En este estudio, la concentración a la que la viabilidad de las células RAW no se vio afectada significativamente ($>80\%$) se determinó a una concentración de 1.1 mg mL^{-1} . La Figura 3.36-B muestra la capacidad de inhibición del óxido nítrico en las células RAW 264.7. El tejido digerido RF-N con una concentración de 1.1 mg mL^{-1} consiguió una inhibición del 13% de la producción de NOX, mientras que RF-E fue significativamente superior ($p<0.05$) con una inhibición del 31%. Fang et al. (2008) reportaron una reducción del 50% en la producción de NOX para los extractos purificados de oxi-resveratrol con una concentración de 6 mg/mL . Comparando estos resultados, con los obtenidos para el extracto crudo digerido de RF-E, que logró un 31%, es un resultado prometedor ya que el extracto no purificado tiene una buena actividad antiinflamatoria. Fumagalli et al. (2016) estudiaron el extracto digerido de frutilla ($10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), que tenía taninos como compuestos principales, y encontraron una potente inhibición de la secreción de IL-8, y las procianidinas mostraron prevención de la inducción de TNF- α . Los elagitaninos y sus metabolitos pueden controlar mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 mediante la inhibición de enzimas oxidasas (NOS) (Pap et al., 2021). Según la Tabla 3.20, el agrimoniin fue el compuesto principal tras el proceso de digestión de la RF y probablemente sea el compuesto con mayor bioactividad en los extractos de RF. Además, Hoffmann et al. (2016) informaron que las fracciones ricas en agrimoniin de la planta *Potentilla erecta* mostraron altos efectos antiinflamatorios en ensayos *in-vitro* e *in-vivo*. Los subproductos agroindustriales biofortificados tienen un potencial bioactivo relevante que permite una mayor revalorización de estos, mediante la obtención de extractos ricos en taninos hidrolizables de alto valor como el agrimoniin.

3.10. Bioactividad en cultivos celulares de los extractos de RF extraídos por UAE

3.10.1. Actividad antiproliferativa de fracciones de UAE digeridas de RF

Los sépalos, tallos y pedúnculos que constituyen RF normalmente no se consumen como parte de la dieta humana. Como resultado, hay información limitada disponible sobre su potencial nutracéutico y sus posibles interacciones fisiológicas cuando se utiliza RF como un posible suplemento o ingrediente nutracéutico. En consecuencia, es fundamental

investigar la seguridad y bioactividad de los extractos derivados de RF. El estudio de los aspectos de seguridad, incluidas las evaluaciones de toxicidad y las evaluaciones de posibles interacciones con procesos fisiológicos, contribuirá a una mejor comprensión de la bioactividad y las aplicaciones potenciales de los extractos de RF como suplementos o ingredientes nutraceuticos.

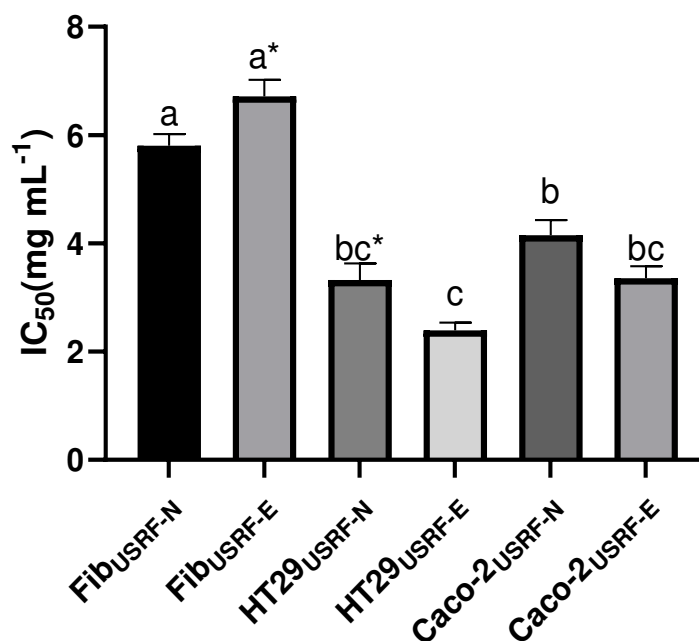


Figura 3. 37. Determinación del IC₅₀ del digerido del extracto rico en compuestos fenólicos obtenido a partir de residuos agroindustriales de frutilla (USRF) sobre las líneas celulares HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Caco-2: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.

*Letra distinta indica diferencias significativas entre IC₅₀ de distintas líneas celulares $p < 0.05$ por la prueba de Tukey. * Significa, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la fracción digerida del extracto óptimo de RF biofortificado (USRF-E) y su control (USRF-N) según el t-test ($p < 0.05$).*

La Figura 3.37 ilustra los valores de IC₅₀ determinados para las fracciones digeridas de USRF-N y USRF-E en líneas celulares de cáncer colorrectal HT29 y Caco-2, junto con un grupo de control de células sanas (HDFa, Fib). El IC₅₀ para Fib fue significativamente mayor tanto para FibUSRF-N (5.8 mg mL⁻¹) como para FibUSRF-E (6.7 mg mL⁻¹) en comparación con las líneas de células cancerosas. Entre las líneas celulares de cáncer, HT29USRF-E exhibió el valor IC₅₀ más bajo de 2.9 mg mL⁻¹, lo que indica una concentración más baja requerida para inhibir la proliferación celular. Le siguieron Caco-2USRF-N (4.1 mg mL⁻¹) y Caco-2USRF-E (3.4 mg mL⁻¹), no observándose diferencia significativa entre los dos últimos ($p > 0.05$). Estos hallazgos demuestran las posibles propiedades anticancerígenas de los compuestos fenólicos RF y su seguridad, ya que los

valores de IC_{50} en ambas líneas celulares de cáncer colorrectal fueron más bajos que en las células sanas (Fib). Es de destacar que el proceso de biofortificación, debido a su bioaccesibilidad mejorada de compuestos fenólicos, exhibió una capacidad antiproliferativa superior en la línea celular HT29.

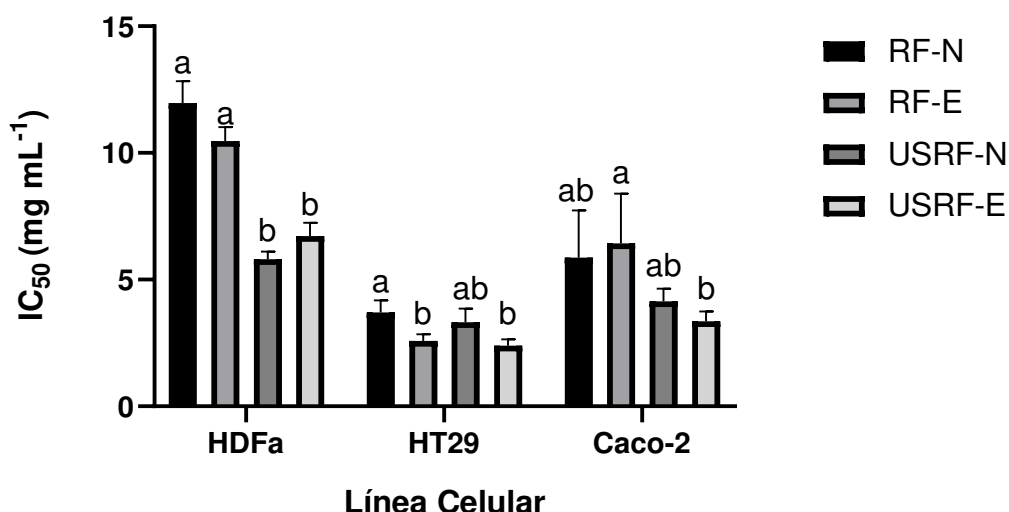


Figura 3. 38. Efecto del tratamiento de biofortificación con compuestos fenólicos y extracción asistida por ultrasonido sobre el IC_{50} digerido del tejido y el extracto rico en compuestos fenólicos obtenido a partir de residuos agroindustriales de frutilla en células HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: Línea celular de adenocarcinoma

*Letra distinta indica diferencias significativas entre IC_{50} de distintas líneas celulares $p < 0.05$ por la prueba de Tukey. * Significa, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la fracción digerida de RF biofortificado (RF-E), su control (RF-N) y el extracto óptimo de RF biofortificado (USRF-E) y su control (USRF-N) según el t-test ($p < 0.05$).*

La extracción asistida por ultrasonido de los compuestos fenólicos de RF mejoró su bioactividad, sin embargo, también se incrementó su potencial citotóxico al observar en la Figura 3.38 un descenso significativo ($p < 0.05$) del IC_{50} para el tejido biofortificado (USRF-E) y el control (USRF-N), con reducciones del 51.5 y 36% respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones inhibitorias fueron superiores a las determinadas para las líneas cancerígenas HT29 y Caco-2. Para las células de HT29 se mantuvo la tendencia en ambos casos con y sin extracción UAE, y como se describió previamente, el tejido biofortificado necesitó menor concentración para inhibir en un 50% el crecimiento de esta línea celular. Para la línea celular Caco-2, el proceso de extracción asistida por ultrasonido y la biofortificación con compuestos fenólicos del residuo agroindustrial de frutilla mediante radiación UVA (USRF-E) mejoró significativamente ($p < 0.05$) el potencial anticancerígeno de los compuestos fenólicos de RF, mayoritariamente los elagitaninos, para el cáncer de colorrectal con una dosis de 3.5 mg mL^{-1} para la línea Caco-2.

3.10.2. Actividad celular antioxidante y antiinflamatoria de las fracciones de UAE digeridas de RF.

Las enfermedades crónico-degenerativas se caracterizan por un deterioro paulatino de la salud humana debido a las alteraciones que inducen en diversos tejidos y órganos del cuerpo. Una característica destacada de estas enfermedades es la respuesta inflamatoria que, cuando se activa de manera persistente, promueve la progresión de la enfermedad, especialmente el cáncer (Lopez-Corona et al., 2022). Para evaluar la capacidad antiinflamatoria de RF se administró una dosis de 0.11 mg mL^{-1} , que no afectó significativamente la viabilidad de las células RAW 254.7 ($>80\%$). La Figura 3.39a ilustra los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición de la producción de NOX, comparando las fracciones digeridas de USRF-N y USRF-E. Demuestra que RF, sometida al proceso de biofortificación con compuestos fenólicos y extracción asistida por ultrasonido, mejoró significativamente su potencial antiinflamatorio al reducir la producción de NOX en un 42%, que es un 12% superior a la exhibida por USRF-N (30%). Esta mejora se puede atribuir a la presencia elevada de elagitaninos (EA, AGN, TGI), como se observa en la Tabla 3.35, junto con flavanolonas como Q3G en las fracciones digeridas de RF. El proceso de biofortificación no solo promueve la acumulación de estos compuestos, sino que también facilita su interacción con el metabolismo celular, lo que conduce a una reducción de las moléculas de señalización proinflamatoria como NOX. Un estudio de Bibi et al. (2018) demostraron que una dosis de 0.1 mg mL^{-1} de extracto de frambuesa, rico en elagitaninos y derivados del ácido elágico, aumentaba la liberación de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y disminuía los niveles de COX-2 e IL-1 β . Esto sugiere que el extracto de RF puede ejercer efectos similares, destacando su potencial como fuente nutracéutica, particularmente para los elagitaninos conocidos por sus potentes actividades antiinflamatorias en estudios *in-vivo* (Hou et al., 2005).

En cuanto a la capacidad antioxidante celular de los extractos de RF digeridos, se midió la inhibición del radical APPH. La Figura 3.39b demuestra que la fracción digerida de USRF-E retrasó significativamente el efecto prooxidante del radical APPH en la línea celular Caco-2 en un 74%, mayor que la inhibición de la fracción digerida de USRF-N (64%) ($p<0.05$). Un desequilibrio entre las especies prooxidantes y antioxidantes a nivel celular puede ser indicativo de enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, los compuestos fenólicos poseen una notable capacidad para donar electrones, lo que los convierte en potentes antioxidantes en el reino vegetal. El consumo regular de estos compuestos en la dieta humana se ha asociado con el control del estrés oxidativo celular (Forni et al., 2019).

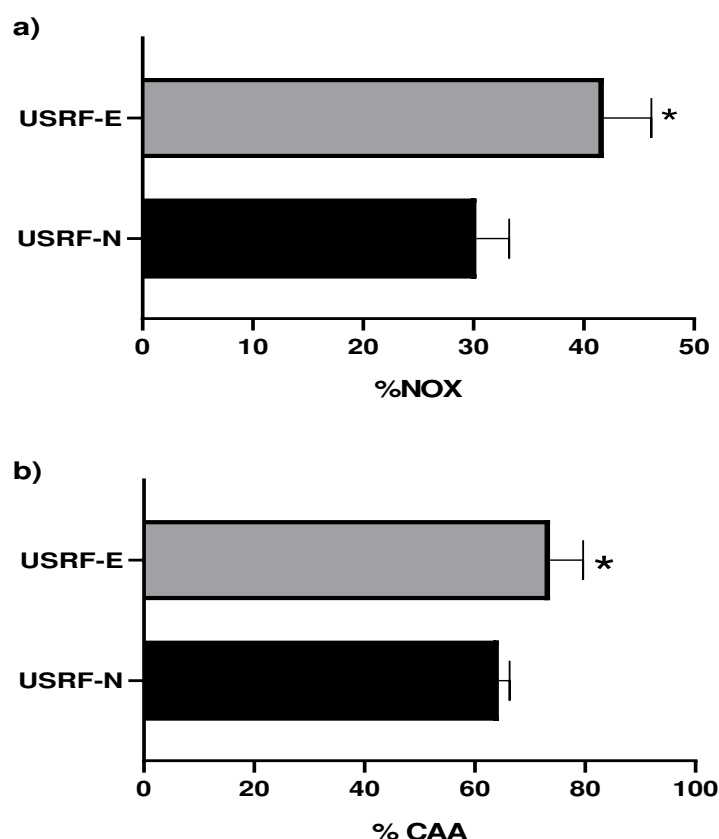


Figura 3. 39. Efecto de los digeridos de los extractos obtenidos por asistencia de ultrasonido de los residuos agroindustriales de frutilla (USRF) (a) Inhibición de la producción de células de óxido nítrico (NOX) (%). (b) Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH.

La barra indica la desviación estándar. *: Medias, diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la fracción digerida del extracto RF biofortificado óptimo (USRF-E) y su control (USRF-N), según prueba t ($p < 0.05$).

La fracción digerida de RF contiene varias clases de compuestos fenólicos, incluidos los elagitaninos, que pueden exhibir efectos antioxidantes por la capacidad oxidativa del ozono de los grupos galilo vecinos con radicales libres (Vogt, 2010). Además, los flavonoles como la quercetina poseen una alta capacidad de transferencia de electrones desde los grupos hidroxilo ubicados en el anillo B, por lo que regulan el estrés oxidativo celular (Hidalgo & Almajano, 2017). Este control del estrés oxidativo es crucial para revertir o prevenir estados previos a la enfermedad o alteraciones metabólicas (Forni et al., 2019). Al utilizar estos compuestos bioactivos, el RF ofrece nuevas fuentes de antioxidantes que actualmente se descartan, lo que genera impactos ambientales negativos.

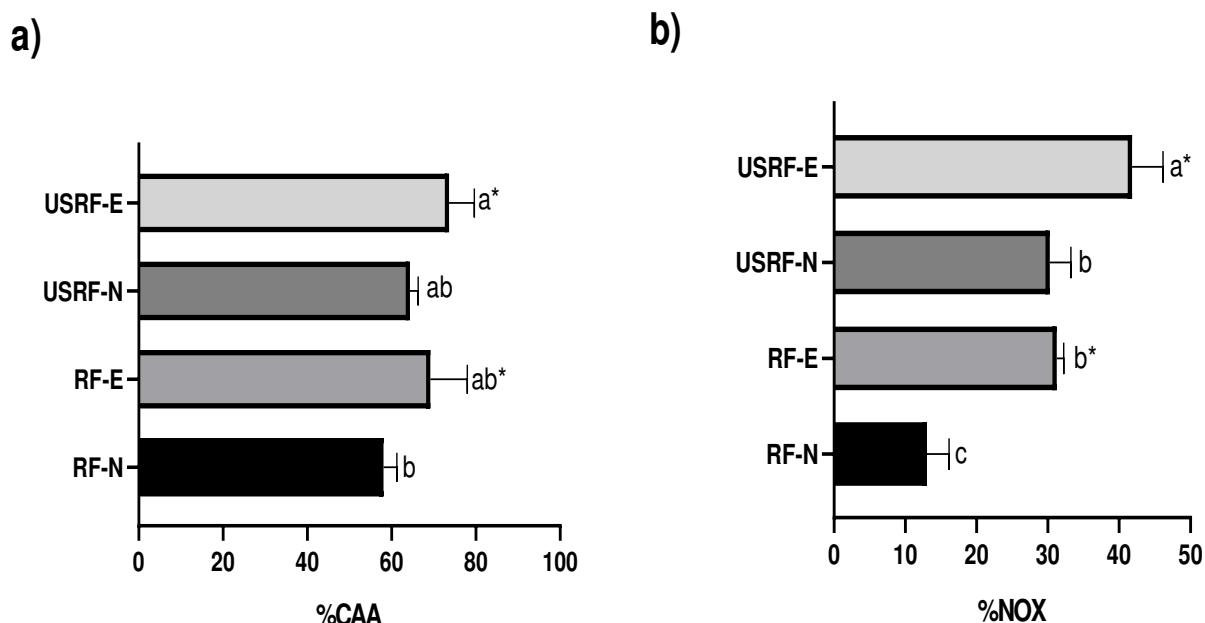


Figura 3. 40. Efecto de la biofortificación y la extracción asistida por ultrasonido de los extractos digeridos de los residuos agroindustriales de frutilla (RF) sobre a) Porcentaje de actividad antioxidante celular. (%CAA); b) Potencial inhibitorio de NOX (%NOX) de los distintos tratamientos de RF

El proceso de radiación UVA y posterior almacenamiento mejoró la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, esta tendencia fue mejorada significativamente ($p < 0.05$) con el proceso de extracción asistida por ultrasonido como se aprecia en la Figura 3.40a, donde el USRF-E mostró el mayor %CAA de todos los tratamientos a los que se sometió el RF con un 73.6%, mejorando en un 15.5 % para el residuo de frutilla sin ningún tipo de tratamiento de extracción ni biofortificación (RF-N). Este efecto fue más pronunciado en el potencial antiinflamatorio (%NOX) de RF-N al incrementarse un 29% con el proceso de biofortificación con compuestos fenólicos sumados a la extracción asistida por ultrasonido (USRF-E) (Figura 3.40b). Nakajima et al. (2017) reportaron que la biotransformación de los compuestos fenólicos de los residuos agroindustriales de cítricos a través de la fermentación, generaron un incremento del 14% en el potencial antiinflamatorio en células RAW264.7. Estas tecnologías alternativas, permiten agregar un valor a este tipo de residuos, incrementando su efectividad, mostrando ser una excelente fuente de compuestos fenólicos con potencial nutraceutico. Considerando que el mercado de los nutraceuticos genera millones de dólares es una excelente opción para generar valor en la cadena agroindustrial de la frutilla, en un país como Argentina al pasar de ser un proveedor mundial de materias primas a ser un exportador de productos industriales con alto valor biológico y monetario (Basak & Gokhale, 2022).

3.10.3. Actividad antiadipogénica de los compuestos fenólicos de RF.

Los adipocitos desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis lipídica y el equilibrio energético en los vertebrados, ya sea almacenando triglicéridos o liberando ácidos grasos libres en respuesta a cambios en la demanda de energía (Frühbeck et al., 2001). No obstante, la obesidad se relaciona con una serie de trastornos patológicos, tales como la diabetes no insulino dependiente, la hipertensión, la hiperlipidemia y las enfermedades cardiovasculares (Lee et al., 2009). Además, diversas evidencias han sugerido que la acumulación de triglicéridos en los músculos esqueléticos y en los islotes pancreáticos está directamente relacionada con la resistencia a la insulina en los músculos esqueléticos y con la disfunción de las células β pancreáticas en pacientes obesos (Tysoe, 2021). La obesidad no surge únicamente debido a la hipertrofia del tejido adiposo, sino también a través de la hiperplasia del mismo, proceso mediante el cual los preadipocitos se transforman en adipocitos.. Se ha denominado que la prevalencia de la obesidad es una pandemia actual con incrementos significativos, si observamos el caso de Estado Unidos donde paso del 19% en 1990 a 42% para el 2017 (Mozaffarian, 2022). Por ello, es importante encontrar estrategias alternativas que contribuyan a la problemática de salud pública moderna como lo es la obesidad.

En la Figura 3.41 y 3.42 se muestran los resultados observados en la diferenciación de las células 3T3 acumulando lípidos. Las fracciones digeridas de RF-N y RF-E no mostraron un efector reductor significativo en la acumulación de lípidos en las células diferenciadas. No obstante, al liberar los compuestos fenólicos de su matriz vegetal a través de la extracción asistida por ultrasonido empleando como solvente etanol 46% permitió que los compuestos fenólicos inhibieran la acumulación de lípidos en las células 3T3 en un 15% para USRF-N y un 11.4% para USRF-E, notando que el proceso de biofortificación por sí solo, no generó un efecto positivo sobre el potencial anti adipogénico de las células 3T3, sino que junto con la UAE se mejoró este potencial en comparación con las células control y el control del buffer fosfato (VH) en el cual se disolvió la fase intestinal de los distintos tratamientos de RF. El consumo habitual de frutilla ha sido reportado con grandes beneficios inmunológicos además de contribuir en el control del peso y obesidad (Basu et al., 2021). Sin embargo, las partes no consumibles del fruto como los RF terminan en los rellenos sanitarios, perdiendo el potencial bioactivo que puede tener la extracción sus compuestos fenólicos. Zhu et al. (2015) estudiaron el efecto antiadipogénico en células 3T3 del extracto etanolico de frutilla, tallo, sépalo, reportando rangos de inhibición entre 23-

39%, siendo mayores a los reportados en la presente tesis, sin embargo, en este estudio no realizaron ningún tipo de digestión del extracto, se aplicaba directamente. Como se ha determinado previamente, la estabilidad y contenido de compuestos fenólicos se ve severamente afectada durante el proceso de digestión. Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de los extractos digeridos son más cercanos a lo que ocurre realmente a nivel fisiológico con los compuestos fenólicos de RF, donde el ácido elágico y sus derivados son fundamentales, ya que se ha reportado su potencial como inhibidor en la expresión de diferentes genes y enzimas fundamentales en el metabolismo de los lípidos tal como la enzima ácido graso sintasa (Wu et al., 2013).

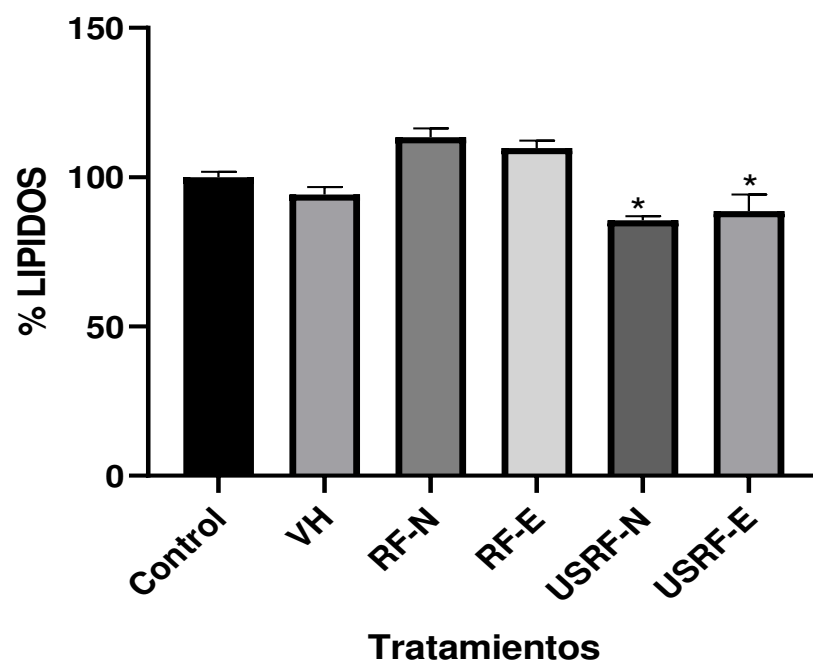


Figura 3. 41. Efecto de los digeridos de los compuestos fenólicos de los residuos agroindustriales de frutilla con y sin proceso de biofortificación en el porcentaje de lípidos acumulados y medidos en células 3T3-L1.

VH: Control vehículo, PBS; *: significa diferencias significativas entre la fracción digerida de RF biofortificado (RF-E), su control (RF-N) y el extracto óptimo de RF biofortificado (USRF-E) y su control (USRF-N) según el *t-test* ($p < 0.05$)

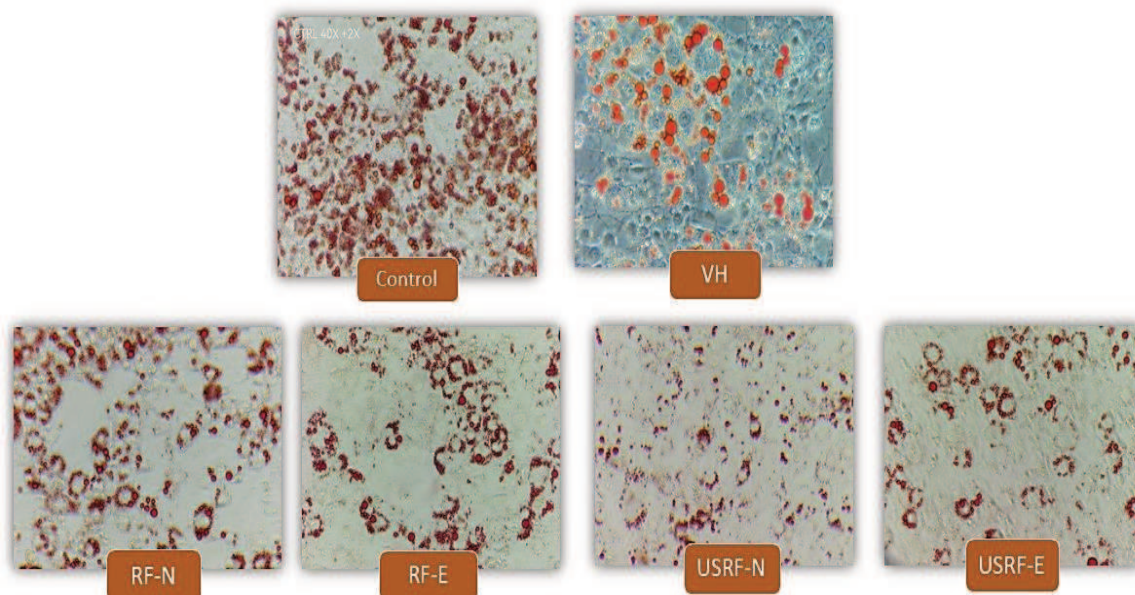


Figura 3. 42. Fotografías de la línea celular 3T3-L1 bajo el efecto de los distintos digeridos de los compuestos fenólicos de los residuos agroindustriales de frutilla con y sin proceso de biofortificación.

VH: Control vehículo, PBS; RF-E: fracción digerida de RF biofortificado; RF-N: fracción digerida de RF control extracto USRF-E: fracción digerida del extracto óptimo de RF biofortificado; USRF-N: fracción digerida del extracto de RF control.

3.11. Estudio de la bioactividad de los compuestos fenólicos de la cáscara de manzana “Granny Smith”

3.11.1. Actividad anti proliferativa de la fracción digerida de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ biofortificada con compuestos fenólicos.

El cáncer colorrectal es una de las enfermedades más prevalentes y mortales en el mundo occidental, que está altamente correlacionada con el síndrome metabólico (Harlid et al., 2017). Se ha demostrado que una dieta rica en compuestos fenólicos tiene un efecto preventivo en etapas previas a la enfermedad para los trastornos metabólicos, participando en diferentes mecanismos metabólicos y reduciendo la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas (Ambroselli et al., 2023). El proceso de biofortificación con compuestos fenólicos utilizado en este estudio ha mejorado significativamente el potencial antioxidante y antiinflamatorio de GS, lo que podría contribuir a la regulación del estrés oxidativo y la inflamación, ambos asociados a la patogénesis del cáncer colorrectal (Harlid et al., 2017). La Figura 3.43 muestra las concentraciones inhibitorias mínimas (IC_{50}) de la fracción digerida de GS-E y GS-N sobre la viabilidad de las células HDFa de control sanas (Fib) y las líneas celulares cancerosas (Caco-2 y HT29). El valor IC_{50} para Caco-2GS-E (11.9 mg mL^{-1}) fue significativamente inferior al de Caco-2GS-N (14.6 mg mL^{-1}). Además, para Fib-GS-E no se pudo determinar un valor de IC_{50} ($>49 \text{ mg mL}^{-1}$) respecto al control con células sanas, lo que indica una baja citotoxicidad en células sanas. Para la línea celular HT29, no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre GS-N y

GS-E; sin embargo, el IC_{50} para HT29-GS-E (30 mg mL^{-1}) fue inferior al de Fib-GS-E (Figura 3.43). Además, estos valores de IC_{50} fueron inferiores a los comunicados para extractos crudos de compuestos fenólicos de frutilla en células HT29 ($>250 \text{ mg mL}^{-1}$) Zhang et al., 2008).

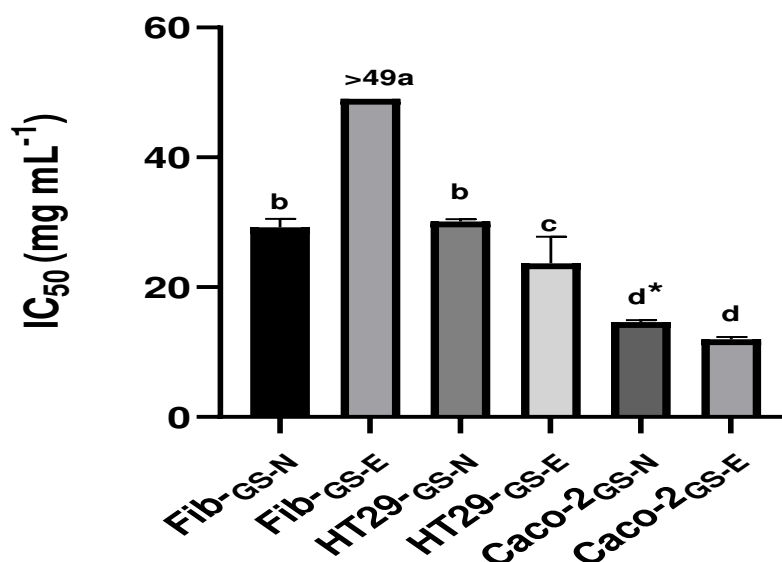


Figura 3. 43. Valores IC_{50} de los extractos digeridos del tejido residual cascara de manzana 'Granny Smith' con (GS-E) y sin biofortificación (GS-N) con compuestos fenólicos para las líneas celulares HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Caco-2: línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los IC_{50} de las distintas líneas celulares ($p < 0.05$) mediante la prueba de Tukey. *: Medias, diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control de subproducto de cáscara de manzana "Granny Smith" (GS-N) y Subproducto de cáscara de manzana "Granny Smith" biofortificado (GS-E) según el t-test ($p < 0.05$).

Este comportamiento puede atribuirse a la elevada concentración de compuestos, como (-)EPQN (0.07 g Kg^{-1}) y (+)CTQN (0.09 g Kg^{-1}), presentes en la fracción GS-E digerida. La literatura sugiere que estos compuestos tienen la capacidad de inducir la expresión de microARNs Let-b, los cuales son una familia de microARNs que funcionan como reguladores negativos de la expresión génica en células eucariotas. Se ha demostrado que los miembros de esta familia están involucrados en diversos procesos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y la respuesta inmune que actúan como supresores del desarrollo tumoral mediante la regulación a la baja del grupo de alta movilidad A2 (HMGA2) de una manera dependiente de la dosis (Yamada et al., 2016). Además, también inhiben la expresión del gen bcl-2 en células como las HT29, que a su vez inhibe la activación del gen NFkB, los cuales desempeñan un papel vital en la proliferación celular y actúan como moduladores de la apoptosis celular (Ding et al., 2020). La fracción GS-E mostró una menor citotoxicidad en células sanas y un mayor

efecto inhibidor en líneas celulares cancerosas en comparación con GS-N, lo que puede deberse a una mayor concentración de compuestos específicos como (-)EPQN y (+)CTQN que han reportado potencial bioactivo (Gadkari & Balaraman, 2015). De esta manera, se demuestra el uso potencial que tienen los residuos agroindustriales del procesado de la manzana como fuente de compuestos bioactivos con potenciales beneficios para la salud.

3.11.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la cáscara de manzana (GS)

Dentro de los procesos fisiológicos, la inflamación es una respuesta protectora desencadenada por posibles infecciones o alteraciones de la integridad celular, que da lugar a la liberación de sustancias proinflamatorias como las interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 y el factor de necrosis tumoral (TNF). Este proceso es una de las principales manifestaciones del síndrome metabólico y un aspecto clave en su prevención y tratamiento (Gómez-Fernández et al., 2021; Green et al., 1994). Se ha descrito que los compuestos fenólicos poseen un alto potencial antiinflamatorio. Sin embargo, su potencial antiinflamatorio está influenciado por factores como la bioaccesibilidad y la citotoxicidad (Antunes-Ricardo et al., 2015; Coman et al., 2020). La línea celular RAW 264.7 mostró una respuesta dependiente de la dosis, con más del 80% de células viables a una concentración de 7.5 mg mL^{-1} , de acuerdo con ensayos preliminares. La Figura 3.44a demuestra que el proceso de biofortificación con compuestos fenólicos, mejoró significativamente ($p < 0.05$) el potencial de inhibición de NOX de la fracción digerida de GS-E (37.3%), que fue un 107% superior al del subproducto sin tratamiento de biofortificación, GS-N (18%). Estos resultados obtenidos en GS fueron superiores a los reportados para la fracción digerida de sépalos y tallos de frutilla, ricos en elagitaninos (30%) descritas en la estrategia de biofortificación de residuos de frutilla con radiación UVA (Figura 3.36-B), al extracto de compuestos fenólicos de cítricos ricos en flavonoles (23%) (Nakajima et al., 2017), y similares a los obtenidos en la fracción enriquecida en proantocianidinas de frutilla (36%) (Van de Velde et al., 2019b). Estudios *in-vivo* han demostrado que ciertos compuestos fenólicos pueden estimular la activación de moléculas que modulan la inflamación, como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β (factor de crecimiento transformante β) 2.4. Además, se ha informado de que las matrices que contienen una amplia gama de compuestos fenólicos pueden mostrar un efecto sinérgico en la regulación de la inflamación (Antunes-Ricardo et al., 2015; Chlif et al., 2022). Los compuestos fenólicos de GS-E no solo mostraron una buena estabilidad gástrica, sino que también demostraron una bioactividad potencial como agente antiinflamatorio. Estos compuestos se obtuvieron a partir de una materia prima secundaria, como la cáscara de manzana 'Granny Smith', utilizando tecnologías seguras y de bajo costo.

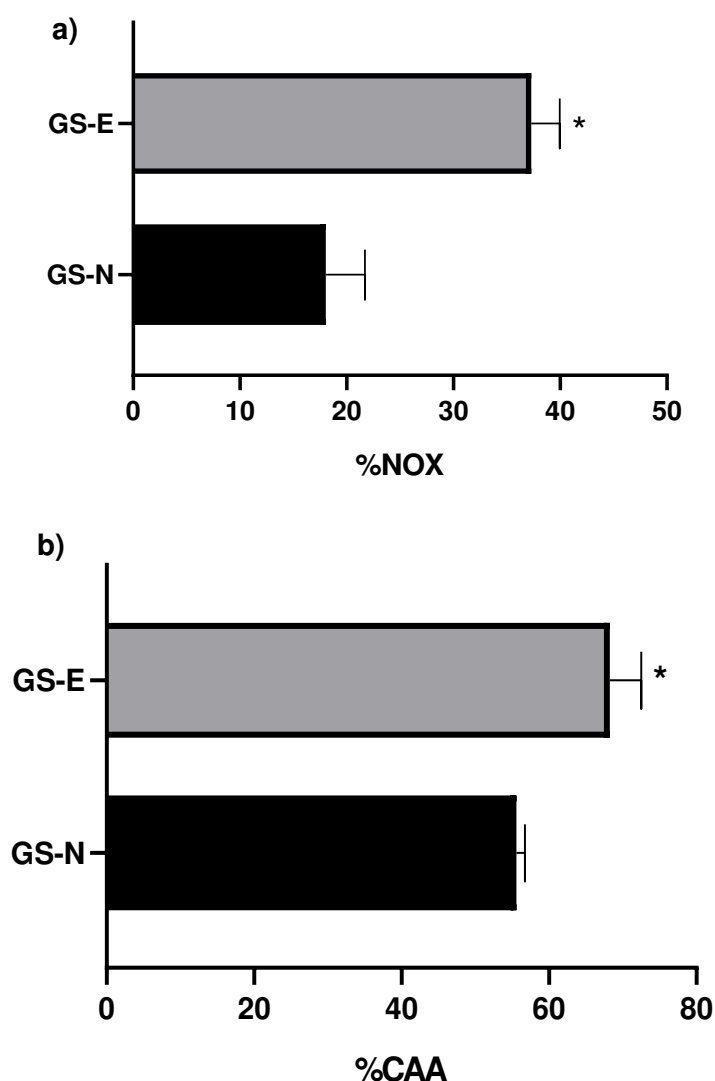


Figura 3. 44. Efecto de los extractos digeridos de cáscara de manzana con (GS-E) y sin (GS-N) proceso de biofortificación con compuestos fenólicos (a) Inhibición de la producción celular de óxido nítrico (NOX). (b) Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH.

La barra indica la desviación estándar. *: Significa diferencias significativas entre el control de subproducto de cáscara “Granny Smith” (GS-N) y las muestras biofortificados de cáscara de manzana “Granny Smith (GS-E), según el *t*-test ($p < 0.05$).

3.11.3. Evaluación actividad antioxidante celular (%CAA) de la cáscara de manzana (GS)

La capacidad *in-vitro* de la fracción digerida del subproducto cáscara de manzana ‘Granny Smith’, biofortificado con compuestos fenólicos (GS-E) y su control sin biofortificación (GS-N), para reducir los radicales libres AAPH, se probó en la línea celular Caco-2 (Figura 3.44b). El objetivo de la revalorización de estos subproductos es obtener compuestos bioactivos que puedan ser ingeridos por vía oral y absorbidos en el tracto intestinal. La aplicación de estrés abiótico mediante cortes y radiación UVA en el GS condujo a una mejora en su potencial antioxidante celular (%CAA), lo que se tradujo en una capacidad antioxidante celular para GS-E que fue un 22.8% mayor que la observada

en GS-N. Moreno-García et al. (2022) informaron que los extractos de subproductos del frijol negro ricos en compuestos fenólicos presentan una capacidad antioxidante de entre el 48.7 y el 74.7%, similar a la del GS-E (Figura 3.44b), para una concentración de 3.75 mg mL⁻¹. El extracto digerido de GS-E inhibió el 68.3% del radical APPH, lo que se consiguió gracias al proceso de biofortificación que mejoró la bioaccesibilidad de algunos compuestos, como la Q3G (Tabla 3.31). A nivel fisiológico, Q3G no solo actúa como donante de electrones para neutralizar ROS, sino que, a altas concentraciones, también induce la activación de la enzima glutatión (GHS), que es vital para mantener el equilibrio oxidativo dinámico en la célula a través de su capacidad para donar hidrógeno (Xu et al., 2019). Además, compuestos como las procianidinas y chalconas como la floretina, aunque presentes en menores concentraciones en la fracción digerida, pueden ejercer un efecto sinérgico sobre el potencial de estos metabolitos secundarios para neutralizar ROS y modular el equilibrio metabólico (Rammohan et al., 2020; Rue et al., 2018). Estos hallazgos confirman que los residuos generados en el procesamiento agroindustrial de la manzana no solo son una fuente importante de pectina y compuestos fenólicos, sino que también tienen una bioactividad de alto valor biológico, lo que abre el camino hacia un uso integrado de estos residuos que puede beneficiar a los consumidores y evitar que acaben en los vertederos de las regiones productoras.

3.12. Bioactividad en cultivos celulares de los extractos de GS extraídos por ultrasonido.

3.12.1. Actividad antiproliferativa de fracciones de UAE digeridas de GS.

La cáscara de manzana ‘Granny Smith’ ha mostrado ser una excelente fuente de compuestos fenólicos especialmente la procianidina B2 y la quercetina. No obstante, su bioaccesibilidad promedio del 40% produjo un efecto bioactivo especialmente en la inhibición de la proliferación de cáncer de colon, este tipo de cáncer es uno de los más prevalentes y mortales en el mundo occidental con 930,000 muertes reportadas para el 2020 (Morgan et al., 2023). Encontrar alternativas para su prevención y control en materias primas secundarias como lo son los residuos agroindustriales es un paso importante no solo para la sostenibilidad de la cadena productiva de la manzana sino para la salud pública.

Para la fracción digerida del extracto UAE de GS la Figura 3.45 muestra los IC₅₀ calculados para las líneas de cáncer HT29 y Caco-2 y un control en células sanas como las HDFa. El ultrasonido sumado a la estrategia de biofortificación con compuestos fenólicos de GS (USGS-E) generó que el IC₅₀ para HT29 fuera 28% inferior en comparación con USGS-N, no obstante, el IC₅₀ para ambos extractos fue significativamente superior ($p < 0.05$) al IC₅₀ del control con fibroblastos (Fib) para el tejido con y sin biofortificación,

mostrando un riesgo de ser citotóxicos a partir de concentraciones promedio de 11 mg/mL. No obstante, para Caco-2 las concentraciones necesarias para inhibir el 50% de la proliferación celular fueron de 4.9 y 3.8 mg mL⁻¹ para USGS-N y USGS-E, respectivamente, siendo este último el menor IC₅₀ en todas las líneas celulares estudiadas en esta tesis para la matriz GS (Figura 3.45). De esta manera se puede distinguir el potencial anticancerígeno de colorrectal de los extractos ricos en compuestos fenólicos de GS. Estos resultados brindan importante información para comprender cómo las tecnologías alternativas pueden mejorar el potencial bioactivo de los compuestos fenólicos de residuos agroindustriales, y de esta forma continuar explorando y estudiando en modelos *in-vivo* este potencial bioactivo.

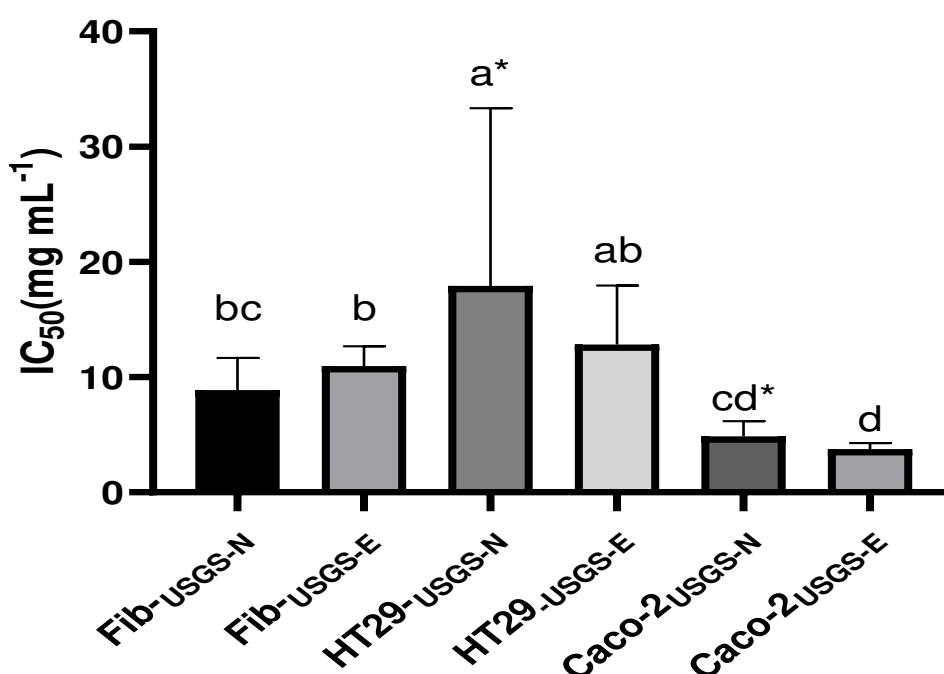


Figura 3. 45. Valores IC₅₀ de los digeridos de los extractos con y sin biofortificación de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ para las líneas celulares HDFa y Cáncer. Fib: Línea celular de fibroblastos dérmicos primarios adultos. HT29: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Caco-2: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los IC₅₀ de las distintas líneas celulares ($p < 0.05$) mediante la prueba de Tukey. *: Indica medias, diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control (USGS-N) y: el extracto biofortificado (USGS-E) según el t-test ($p < 0.05$).

Al comparar los resultados para las fracciones digeridas del tejido de GS sin proceso de extracción asistida por ultrasonido, en la Figura 3.46 se puede observar que para las células Fib no hubo grandes diferencias entre los distintos tratamientos, sólo se determinó que para USGS-N el IC₅₀ fue significativamente menor con 8.9 mg mL⁻¹, lo cual

indica que la citotoxicidad de los compuestos fenólicos de GS no varió con los tratamientos a los cuales fue sometido el tejido. Por otra parte, cabe destacar que el proceso de extracción por ultrasonido generó una reducción significativa del IC_{50} requerido para las células HT29, con una reducción del 57% al comparar GS-N con USGS-E. En cuanto al IC_{50} para las Caco-2, esta reducción fue del 74% al pasar de 14.6 mg mL⁻¹ con GS-N a 3.8 mg mL⁻¹ con USGS-E (Figura 3.46).

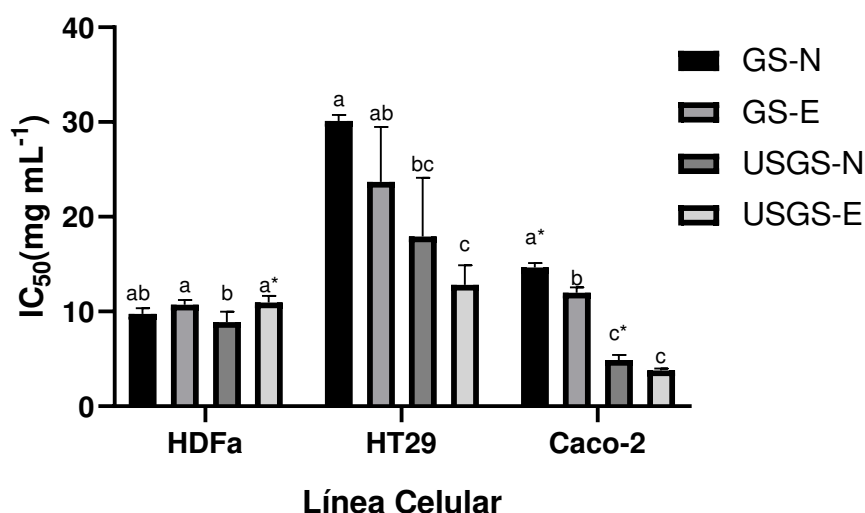


Figura 3. 46. Efecto del tratamiento de biofortificación con compuestos fenólicos y extracción asistida por ultrasonido sobre el IC_{50} para los digeridos de cáscara de manzana 'Granny Smith' GS.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los IC_{50} de las distintas líneas celulares ($p < 0.05$) mediante la prueba de Tukey. *: Indica medias, diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control de subproducto de cáscara "Granny Smith" (GS-N) y las muestras biofortificados de cáscara de manzana "Granny Smith" (GS-E) y entre el control (USGS-N) y: el extracto biofortificado (USGS-E) según el t-test ($p < 0.05$).

3.12.2. Actividad celular antioxidante y antiinflamatoria de las fracciones de UAE digeridas de GS

El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos es una de las bioactividades más reportadas y estudiadas, no obstante es una de las más afectadas por la estabilidad de los compuestos fenólicos en función de los tratamientos y procesos a los que estos pueden ser sometidos (Kamiloglu et al., 2015). Por ello, al pasar el extracto UAE de GS por el proceso de digestión, es importante conocer cómo la capacidad antioxidante celular (%CAA) de la fracción digerida se puede ver afectada. En la Figura 3.47-a se puede observar que para USGS-N y USGS-E no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en su %CAA con una actividad del 59 y 60.9%, respectivamente. Se observa que, en este caso, el proceso de biofortificación no generó ningún efecto sobre esta bioactividad de los compuestos fenólicos de GS, manteniendo su capacidad antioxidante durante todos los tratamientos. Wan et al. (2015) estudiaron la concentración mínima para tener un 50% de %CAA en células Caco-2 de varios compuestos fenólicos puros, reportando 100 μ M para

la quercetina, 67 μM para kaempferol y 0.15 μM para la (+) catequina, los cuales son compuestos que están presentes en la fracción digerida de GS. En la Figura 3.47-a se puede observar que la fracción digerida de GS-E sin extracción UAE mostró la mayor %CAA siendo 8% superior a las fracciones con UAE. Esto representa también una ventaja debido a que se puede contar con un material con alto %CAA con menos procesos de extracción y deshidratación, lo que reduce costos y consumos energéticos. En consecuencia, se debería encontrar una estrategia adecuada de formulación de este producto, tanto como un suplemento nutracéutico o un ingrediente funcional en alguna matriz alimentaria para este tipo de productos con potencial bioactivo.

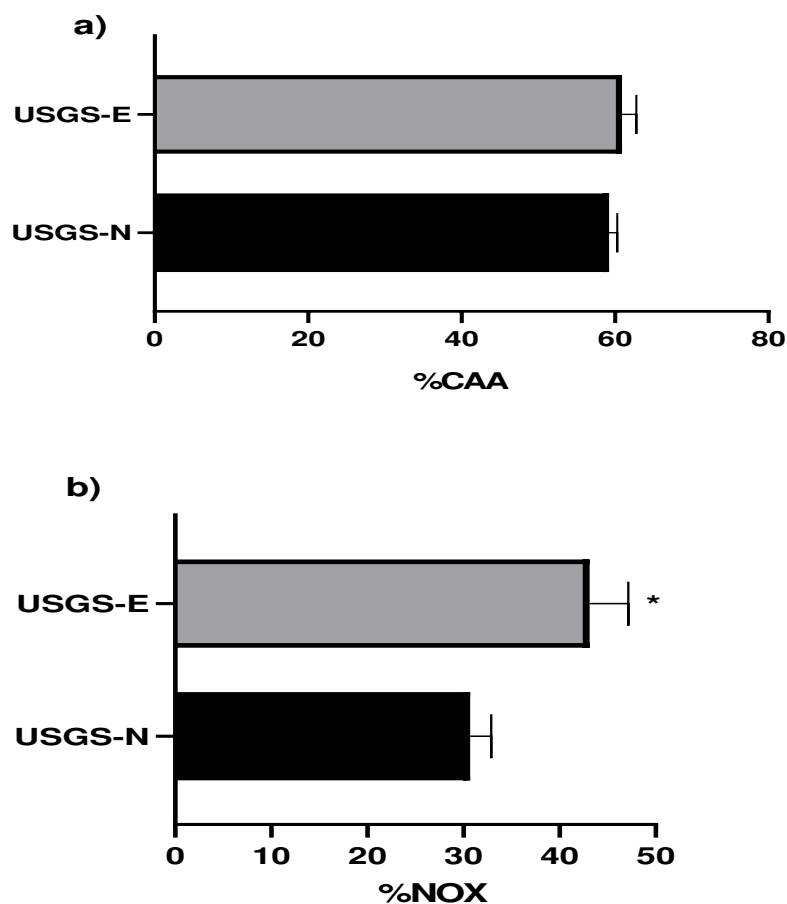


Figura 3. 47. Efecto de los extractos digeridos obtenidos por asistencia de ultrasonido de la cáscara de manzana con (USGS-E) y sin proceso de biofortificación (USGS-N) (a) Inhibición de la capacidad antioxidante celular (%CAA) por el radical APPH. (b) Inhibición de la producción celular de óxido nítrico (NOX).

La barra indica la desviación estándar. *: Significa diferencias significativas entre el extracto control (USGS-N) y el extracto biofortificado (USGS-E), según el *t-test* ($p < 0.05$).

Actualmente, encontrar enfoques terapéuticos efectivos y seguros para controlar la inflamación crónica es de suma importancia en el campo de la medicina (Harlid et al., 2017). El potencial antiinflamatorio medido a través de la inhibición en la producción de NOX se ilustró en la Figura 3.47b para las fracciones digeridas de USGS-N y USGS-E, notando que la fracción digerida del extracto biofortificado con compuestos fenólicos mejoró significativamente ($p<0.05$) el potencial antiinflamatorio en un 13.1% para USGS-E, el cual no presentó diferencias significativas ($p>0.05$) con la fracción digerida de GS-E, como se observa en la Figura 3.48b. El extracto rico en compuestos fenólicos de la cáscara de manzana 'Granny Smith' muestra un potencial prometedor como agente antiinflamatorio. Los compuestos fenólicos presentes en el extracto pueden modular vías inflamatorias, reducir la producción de moléculas inflamatorias y proteger contra el estrés oxidativo, como se ha descrito previamente. Sin embargo, se necesitan más investigaciones, incluidos ensayos clínicos, para comprender mejor los mecanismos de acción y confirmar su eficacia y seguridad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias en humanos.

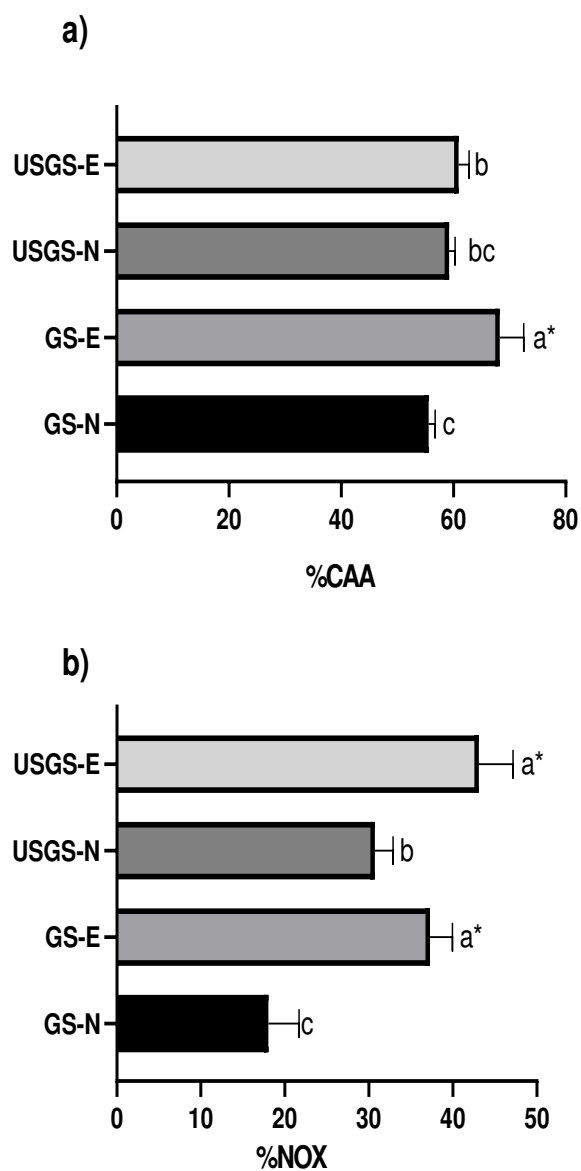


Figura 3. 48. Efecto de la biofortificación y la extracción asistida por ultrasonido de los extractos digeridos de cáscara de manzana (GS) sobre a) Porcentaje de actividad antioxidante celular. B) Potencial inhibitorio de NOX de los distintos tratamientos de GS.

3.12.3. Actividad antiadipogénica de los compuestos fenólicos de GS

La prevalencia de la obesidad en América del Sur viene en aumento en países como Colombia 20%, Chile 25% Argentina 28% y Brasil 22% (Blüher, 2019), principalmente debido a los estilos de vida, los patrones de alimentación y factores socioeconómicos de nuestra región, por ello es imperativo ampliar el mercado de alimentos y suplementos funcionales y nutraceúticos con un bajo costo, seguros y sostenibles que permitan que la buena alimentación no sea un lujo de pocos en esa región. El residuo de la cáscara de manzana 'Granny Smith' permite su revalorización mediante la obtención de compuestos de alto valor nutraceútico, y junto a la aplicación estrategias como la biofortificación con estrés abiótico por corte y radiación UVA y la extracción asistida por ultrasonido con solventes verdes como el agua y etanol, permiten obtener de manera sostenible y rentable compuestos fenólicos nutraceúticos. En las Figuras 3.49 y 3.50 se puede observar el potencial anti-obesidad de GS. Los tejidos digeridos de GS-N y GS-E no mostraron una reducción significativa en la acumulación de lípidos en la línea celular 3T3, sin embargo, al realizar el proceso de extracción por ultrasonido en condiciones óptimas, la fracción digerida de USGS-N mostró una reducción significativa ($p<0.05$) del 15%, que fue incrementada al 19% cuando se aplicó USGS-E, viendo que la acumulación de compuestos fenólicos y su posterior extracción asistida por ultrasonido favoreció la liberación de compuesto fenólicos que inhiben la acumulación de lípidos en la células 3T3. Shoji et al. (2000) reportaron una reducción del 32% para un extracto crudo de manzanas sobre células 3T3 sin digerir, así como también reportaron la importancia de los compuestos como la (-)epicatequina y la (+)catequina como anti adipogénicos, al igual que los flavonoles de gran importancia identificados en GS, son capaces de modular la expresión de enzimas y genes involucrados en el metabolismo de los lípidos como la lipoproteína lipasa, glicoproteínas como la CD36 y receptores nucleares como el receptor X hepático- α . Se ha demostrado que interactúan en la homeostasis de lípidos en el cuerpo. La lipoproteína lipasa es una enzima que hidroliza los triglicéridos de las lipoproteínas en ácidos grasos y glicerol, mientras que las glicoproteínas como la CD36 son importantes en la captación celular de ácidos grasos y otros lípidos. Los receptores nucleares, como el receptor X hepático- α , actúan como factores de transcripción que regulan la expresión génica relacionada con el metabolismo de lípidos en diferentes tejidos, incluyendo el hígado (Lee et al., 2009).

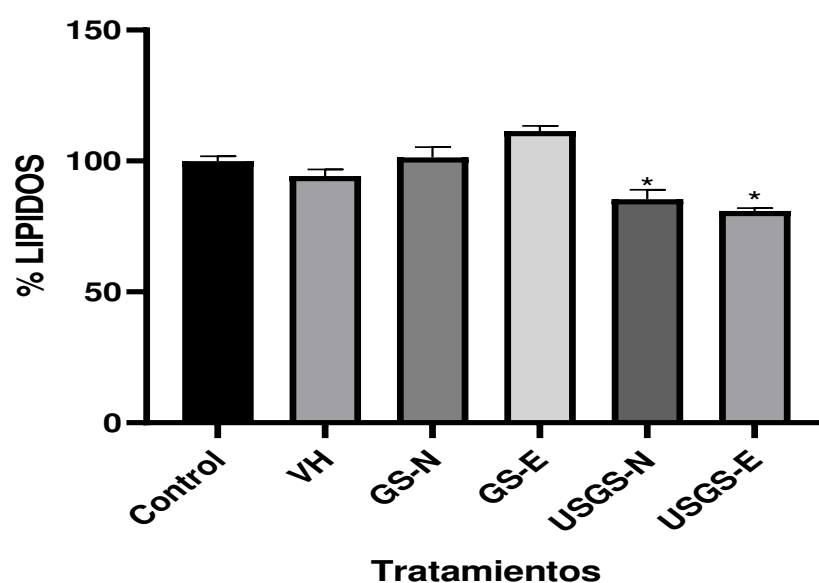


Figura 3. 49. Efecto de la biofortificación y la extracción asistida por ultrasonido sobre la actividad antiadipogénica de los compuestos fenólicos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ medidos en células 3T3-L1.

VH: Control vehículo, PBS; *: significa diferencias significativas entre la fracción digerida de GS biofortificado (GS-E), su control (GS-N) y el extracto óptimo de GS biofortificado (USGS-E) y su control (USGS-N) según el *t-test* ($p < 0.05$).

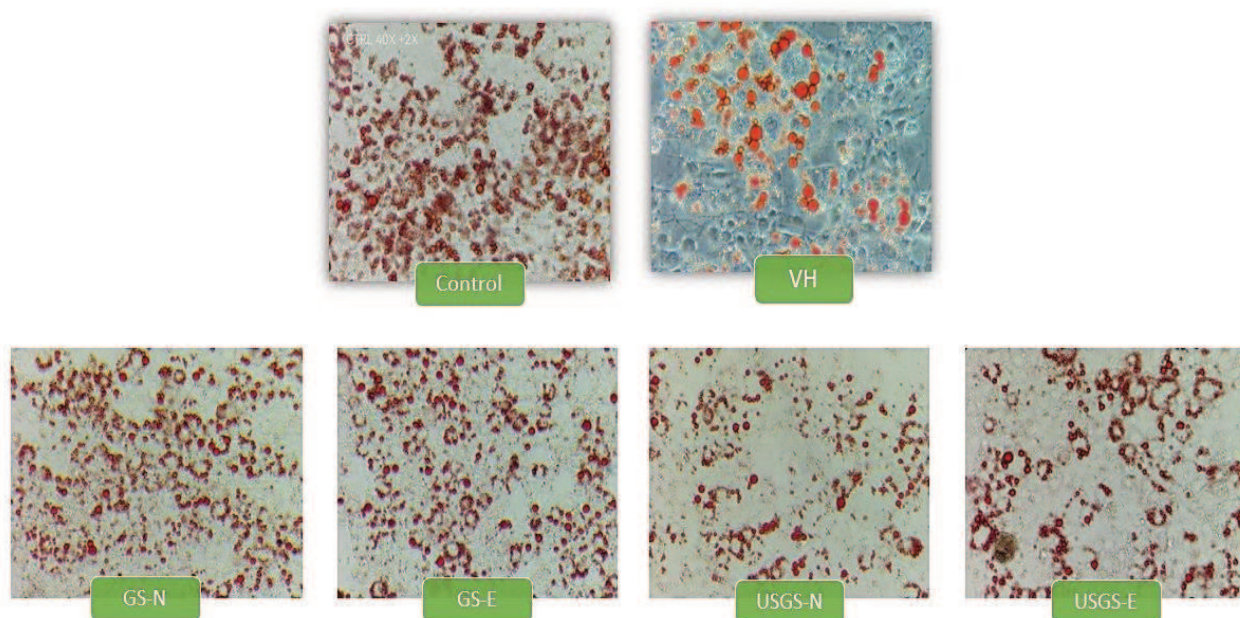


Figura 30.50. Fotografías de la línea celular 3T3-L1 bajo el efecto de los distintos tratamientos con GS.

VH: Control vehículo, PBS; *: significa diferencias significativas entre la fracción digerida de GS biofortificado (GS-E), su control (GS-N) y el extracto óptimo de GS biofortificado (USGS-E) y su control (USGS-N) según el *t-test* ($p < 0.05$).

3.13. Encapsulación de los extractos ricos en compuestos fenólicos obtenidos

Si bien los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes en el reino vegetal y su ingesta diaria ha demostrado grandes beneficios biológicos en los humanos, en términos generales, presentan diversas limitaciones para alcanzar resultados estándar y seguros. Como se discutió previamente en los ensayos de bioaccesibilidad de distintas estrategias de biofortificación y extracción, los compuestos fenólicos son vulnerables a las condiciones de la digestión. Además, estos compuestos suelen tener baja permeabilidad intestinal debido a su baja solubilidad en agua y su rápida eliminación del cuerpo (Garavand et al., 2021).

Por ello, la microencapsulación de extractos ricos en compuestos fenólicos es una técnica que ha ganado gran importancia en la industria de alimentos y suplementos nutraceúticos, debido a su capacidad para garantizar una mejor bioaccesibilidad de estos valiosos compuestos (Ferreira-Santos et al., 2021). Durante la encapsulación, el material de la pared es el revestimiento de los materiales del núcleo, de modo que se construye un sistema de suministro de carga de ingredientes sensibles o activos, como es el caso de los compuestos fenólicos. El material de la pared actúa como una barrera protectora frente a la degradación y a las condiciones adversas, mejorando de esta manera la estabilidad y la liberación controlada de los mismos (Garavand et al., 2021).

3.13.1. Encapsulación del extracto USRF-E

La solución de alginato de sodio 2% con 1% del extracto USRF-E liofilizado fue puesta en contacto por goteo con una solución del 4% de cloruro de calcio en agitación constante. Se observó que inmediatamente después de que las gotas entraban en contacto con la solución de ClCa_2 se formaba el gel en la interface, sin embargo, para garantizar una adecuada gelificación y obtener una textura adecuada de las microcápsulas, se dejaron en contacto 15 minutos y de esta forma garantizar una difusión adecuada del ion calcio para ir formando la estructura tridimensional con el alginato de sodio (Deladino et al., 2008). Comparando la concentración inicial de TPC en la solución de alginato más USRF-E (91.02 ± 2.5 g AGE Kg^{-1} de extracto liofilizado) con la concentración de las microcápsulas disueltas en la solución de citrato de sodio pH 7.5 (66.44 ± 2.2 g AGE Kg^{-1} de extracto liofilizado), se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) del $73 \pm 3.0\%$ con un peso promedio por microcápsula de 1.2 ± 0.5 mg, siendo similar a los rangos reportados por Tomé & da Silva (2022), quienes estudiaron la encapsulación de extractos hidroalcohólicos de tomillo, albahaca, romero, perejil y perifollo, empleando alginato de sodio, logrando eficiencias de encapsulación del 68 al 93%. La caracterización morfológica de las microcápsulas de RF (CapUSRF-E) se realizó mediante las microfotografías tomadas por el SEM (Figura 3.52), las cuales mostraron partículas con morfología de

esferas irregulares con un diámetro promedio $758 \pm 18 \mu\text{m}$ (Figura 3.51). Las imágenes de mayor magnificación del análisis SEM permiten observar que las partículas son sólidas y que la superficie es irregular, es decir, no lisa; con presencia de grietas, pero sin poros (Figura 3.52-a). El alginato de sodio es uno de los materiales ampliamente usados como material de pared para distintos principios activos, ya que ofrece ventajas significativas en términos de protección, liberación controlada y estabilidad. Su biocompatibilidad, capacidad de formar geles y facilidad de uso lo convierten en una elección popular en la industria de alimentos, suplementos nutraceúticos y farmacéutica para mejorar la bioaccesibilidad y aprovechar los beneficios de los compuestos fenólicos (Deladino et al., 2008; Tomé & da Silva, 2022).

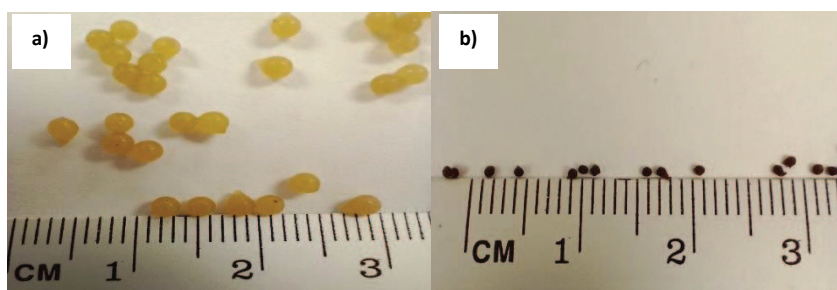


Figura 3.51. Microcápsulas de alginato del extracto obtenido por ultrasonido de residuo agroindustrial de frutilla (USRF-E). a) filtradas y lavadas. B) Secadas

En la figura 3.52-c y 3.52-d del SEM también se observaron partículas de tamaño menor a $1 \mu\text{m}$, con morfologías rectangulares o cúbicas, sugiriendo que son de composición diferente a las partículas más grandes, las cuales pueden pertenecer a partículas del extracto liofilizado que no fueron completamente disueltas en la solución de alginato, debido a la baja polaridad de algunos compuestos fenólicos del extracto USRF-E, que no lograron adecuada interacción ni con el agua ni con las moléculas de alginato (Figura 3.36). Esta situación podría generar alteraciones en la estabilidad de los compuestos fenólicos de RF al no liberarse adecuadamente o al estar en contacto directo con oxígeno, favoreciendo su degradación (Dalponte Dallabona et al., 2020). Para estudiar la protección del alginato como material de pared, tanto las capsulas del extracto (CapUSRF-E) como el extracto sin encapsular fueron sometidas al proceso de digestión *in-vitro* comparando su bioaccesibilidad.

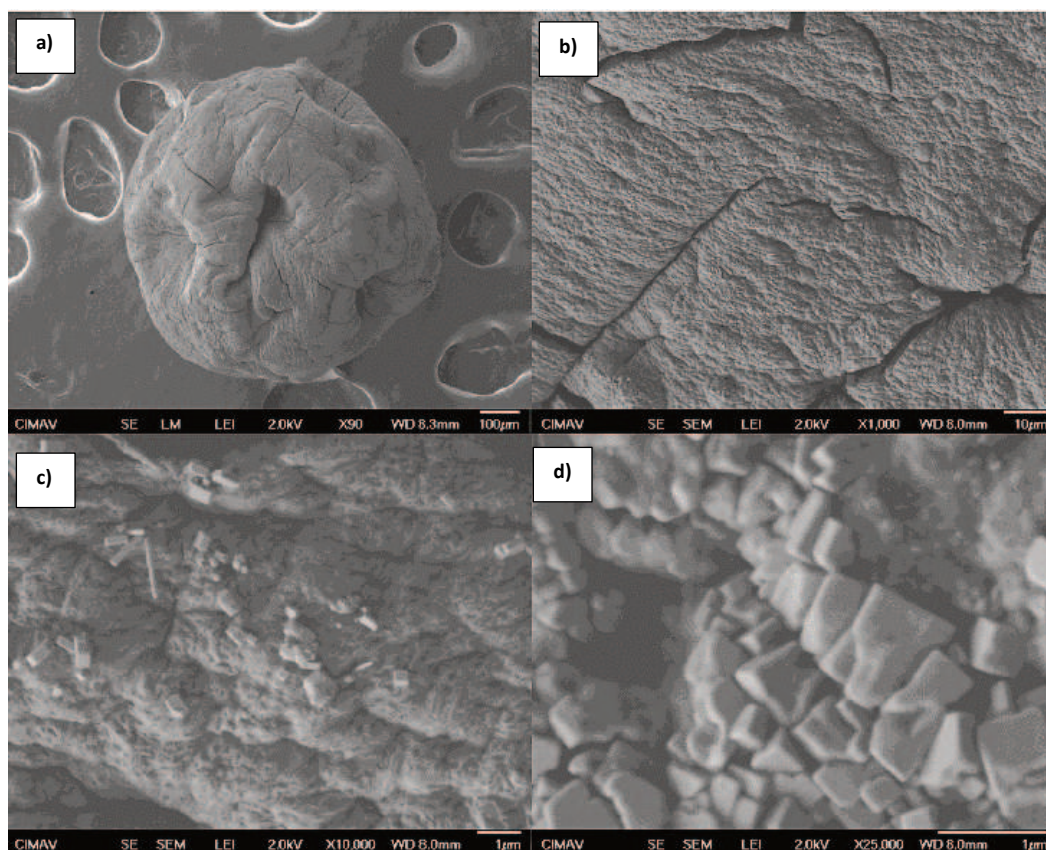


Figura 3.52. Micrografías microscopio electrónico de barrido a diferentes aumentos de las microcápsulas de alginato con extracto biofortificado de residuos agroindustriales de frutilla RF-E.

(a) Imagen con aumento 90X. (b) imagen con aumento 1kX. (c): imagen con aumento 10kX. (d): imagen con aumento 25kX.

3.13.1.1. Estabilidad de las microcápsulas del extracto rico en compuestos fenólicos de RF durante el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*

En la tabla 3.41 se muestran los resultados del proceso de digestión *in-vitro* de las CapUSRF-E, comparado con la digestión del extracto liofilizado sin encapsular (USRF-E).. En la fase salival, la concentración de los distintos compuestos fenólicos fue significativamente mayor ($p<0.05$) para USRF-E comparado con CapUSRF-E, a pesar de ser un tiempo corto de contacto, las microcápsulas liberaron bajas concentraciones de los compuestos fenólicos. Para la fase gástrica, donde el pH desciende abruptamente y la matriz es afectada por enzimas como la pepsina, se determinó una liberación de compuestos fenólicos significativamente menor ($p<0.05$) en CapUSRF-E, exceptuando para los compuestos TGI, PT P3G, donde no se presentaron diferencias significativas entre USRF-E y CapUSRF-E.

Tabla 3.41. Estabilidad de las capsulas de alginato de sodio del extracto biofortificado de residuos agroindustriales de frutilla (USRF-E) durante el proceso de digestión *in-vitro*.

Muestra	Compuesto	Concentración (g Kg ⁻¹)			Bioaccesibilidad (%)	
		Fase salival (FS)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)
USRF-E	TGI	2.15±0.24a*	1.85± 0.22a	1.19± 0.31b	70.08	45.08
	PT	1.11± 0.04a*	0.66± 0.02b	0.65± 0.26b	48.53	47.79
	SG	1.62± 0.16a*	1.44± 0.20a*	0.42± 0.15b*	52.75*	15.38*
	PCT	2.41± 0.01a*	1.62± 0.07b*	0.66± 0.43c	72.00*	29.33
	BHDP	0.63± 0.15a*	0.49± 0.02a*	0.04± 0.03b	58.33*	4.76
	EAP	1.17± 0.08a*	0.93± 0.09b*	0.29± 0.42c*	83.04*	25.89*
	AGN	8.13± 0.84a*	6.21± 0.37ab*	4.12± 1.30b	47.30*	31.38
	EA	1.42± 0.15a	0.25± 0.01c*	0.56± 0.57b	32.89*	73.68
	Q3G	2.64± 0.02a*	0.85± 0.16b*	0.42± 0.04c	48.57*	24.00
	K3G	1.98±0.03a*	0.98± 0.05b*	0.70± 0.08c*	71.53*	51.09*
	KCH	0.94± 0.01a*	0.40± 0.07b*	n,d	53.33*	n,d
	P3G	0.02± 0.001a	0.02± 0.003a	n,d	33.33	n,d
	TPC _{HPLC}				54.59*	31.47*
CapUSRF-E	TGI	0.08± 0,01c	1.66± 0.19a	1.00± 0.20b	89.83	54.11
	PT	0.05± 0,01c	0.66± 0.20b	0.99± 0.13b*	69.33	103.99*
	SG	0.01± 0,001b	0.33± 0.09a	0.06± 0.01b	17.27	3.14
	PCT	0.01± 0,001c	0.26± 0.003b	0.64± 0.02a	16.51	40.63
	BHDP	0.04± 0,03a	0.06± 0.01a	0.08± 0.01a*	10.20	13.61*
	EAP	0.01± 0,004c	0.06± 0.001a	0.04± 0.01b	7.65	5.10
	AGN	0.08± 0,02c	1.42± 0.21b	2.24± 0.01a	15.45	24.37
	EA	n,d	0.07± 0.04b	0.38± 0.14a	13.16	71.43
	Q3G	0.01± 0,002b	0.25± 0.07b	0.82± 0.26a*	20.41	66.94*
	K3G	0.02± 0,01c	0.15± 0.05b	0.36± 0.05a	15.64	37.54
	KCH	0.01± 0,004b	0.13± 0.02b	0.45± 0.05a	24.76	85.71
	P3G	n,d	n,d	n,d	0.00	47.62
	TPC _{HPLC}				25.13	38.69

USRF-E, Extracto asistido por ultrasonidos a partir de subproducto de frutilla en condiciones óptimas de biofortificación. CapUSRF-E: Microcapsulas del extracto biofortificado con compuestos fenólicos de RF. TGI, tetragalloilglucosa isómero; PT, procianidina trómero; SG, saguinn; PCT, procianidina tetrómero; BHDP, bis-HHDP-glucosa isómero; EAP, ácido elágico pentóxido; AGN, agrimoniin; EA, ácido elágico libre. Q3, quercetina 3-o-glucurónido; K3G, kaempferol-3-o-glucurónido; KCH, kaempferol-cumaroil hexóxido; P3G, pelargonidina-3-o-glucurónido de; TPC_{HPLC}, contenido fenólico total por HPLC. n,d, no detectado. Letras minúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas mediante la prueba de Tukey ($p<0.05$). *: Diferencias de medias ($p<0.05$) entre el mismo compuesto de las muestras USRF-N y USRF-E.

En la fase intestinal, el pH del medio se incrementa a un valor cercano a 7, donde el alginato incrementa su solubilidad, lo cual permite una mayor retención de agua facilitando la solvatación de los compuestos fenólicos de la estructura tridimensional formada por el alginato de calcio, llamada ‘caja de huevo’ (Tomé & da Silva, 2022), esto permitió que los compuestos PT (0.99 g Kg⁻¹), BHDP (0.08 g Kg⁻¹) y Q3G (0.82 g Kg⁻¹) fueran significativamente superiores ($p<0.05$) en CapUSRF-E comparado con la concentración liberada por USRF-E en FI. Adicionalmente para los compuestos TGI, PCT, AGN EA, KCH y P3G no se evidenciaron diferencias significativas ($p<0.05$) en las concentraciones entre las microcápsulas y el extracto en la FI. Sin embargo, partiendo de

la comparación con la concentración inicial de cada tratamiento, los porcentajes fueron superiores en un 9.1% para TGI, 56.2% para PT, 11.3% para PCT, 8.8% para BHDP, 43% para Q3G, 85.7% para KCH y 7.2% para los TPC_{HPLC} para CapUSRF-E, resaltando que los compuestos KCH en USRF-E se redujeron en la FI a niveles no detectables por HPLC. Los resultados de la presente tesis son acordes a lo reportado en la literatura acerca del mejoramiento en la liberación de compuestos bioactivos durante la fase intestinal y no en la fase gástrica (Dalponte Dallabona et al., 2020; Garavand et al., 2021)

3.13.2. Encapsulación del extracto USGS-E.

En la Figura 3.53 se puede apreciar las microcápsulas de alginato con el extracto obtenido por extracción asistida por ultrasonido a partir de residuos de cáscara de manzana ‘*Granny Smith*’ biofortificada con compuestos fenólicos a través de la aplicación de estrés abiótico por corte y radiación UVA (CapUSGS-E). Al comparar la concentración inicial de TPC de la solución de alginato 2% más USGS-E 1% de 47.03 ± 0.56 g AGE/Kg de extracto liofilizado y los TPC determinados a la solución de microcápsulas en citrato de sodio 5% de 41.09 ± 2.25 g AGE Kg⁻¹ extracto liofilizado se determinó una %EE promedio de $87.4 \pm 4.4\%$, siendo superior a lo determinado para el extracto USRF-E (73%). Como se ha reportado en la literatura, este proceso depende de muchos factores como la naturaleza y propiedades fisicoquímicas de los principios activos a encapsular, de la concentración de alginato de sodio, la concentración de cloruro de sodio, la velocidad de agitación, las características del goteo, entre otros (Ortiz-Romero et al., 2021). Adicionalmente, la posible presencia de fructanos como la inulina debido a la naturaleza de la composición de la manzana ‘*Granny Smith*’, puede favorecer la eficiencia de encapsulación. Esto se debe a que los compuestos fenólicos tienen una mayor afinidad e interacción por el complejo alginato-inulina, en comparación con el alginato de sodio por sí solo, debido a que los compuestos fenólicos interaccionan con los grupos hidroxilos de la inulina mediante su grupos polares, estando presentes en el extracto a encapsular (Ćujić, Trifković, et al., 2016; Strieder et al., 2023).

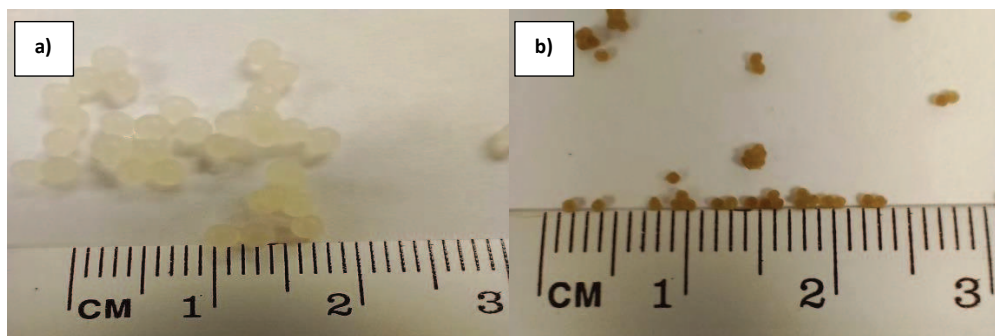


Figura 3.53. Microcápsulas de extracto bofortificado asistido por ultrasonido de cáscara de manzana 'Granny smith' (USGS-E). a) filtradas y lavadas. B) Secadas

La Figura 3.54 muestra las imágenes adquiridas por SEM a diferentes magnificaciones de las CapUSGS-E, en ellas se observaron partículas con morfología de esferas irregulares con un diámetro y peso promedio de $783 \pm 79 \mu\text{m}$ y $0.7 \pm 0.2 \text{ mg}$, respectivamente. Las imágenes de mayor magnificación permiten observar las microcápsulas de característica sólidas y con superficie irregular, es decir, no lisa (Figura 3.54 a-b. Así mismo, se observan partículas incrustadas de tamaño alrededor de $1 \mu\text{m}$, las cuales presentan un contraste menor, sugiriendo que al igual que con RF son cristales de extracto liofilizado no disuelto (Figura 3.54c-d). Adicionalmente, también se pueden observar unas grietas en las microesferas de ambos residuos agroindustriales estudiados, esto se puede atribuir al proceso de secado lento, por ello, alguno autores recomiendan el proceso de liofilización para eliminar la humedad de las microcápsulas, sin embargo, este proceso incrementaría los costos y consumos energéticos del proceso (Tomé & da Silva, 2022). No obstante, la efectividad del alginato como protector del proceso gástrico de los compuestos fenólicos de GS, se validó mediante la prueba de estabilidad de digestión *in-vitro* para determinar la capacidad de las capsulas obtenidas con estas características para proteger los compuestos fenólicos de GS. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados, se requiere profundizar en el efecto de los factores que gobiernan el proceso de encapsulación de compuestos fenólicos con alginato de sodio para futuras investigaciones y desarrollos con este producto.

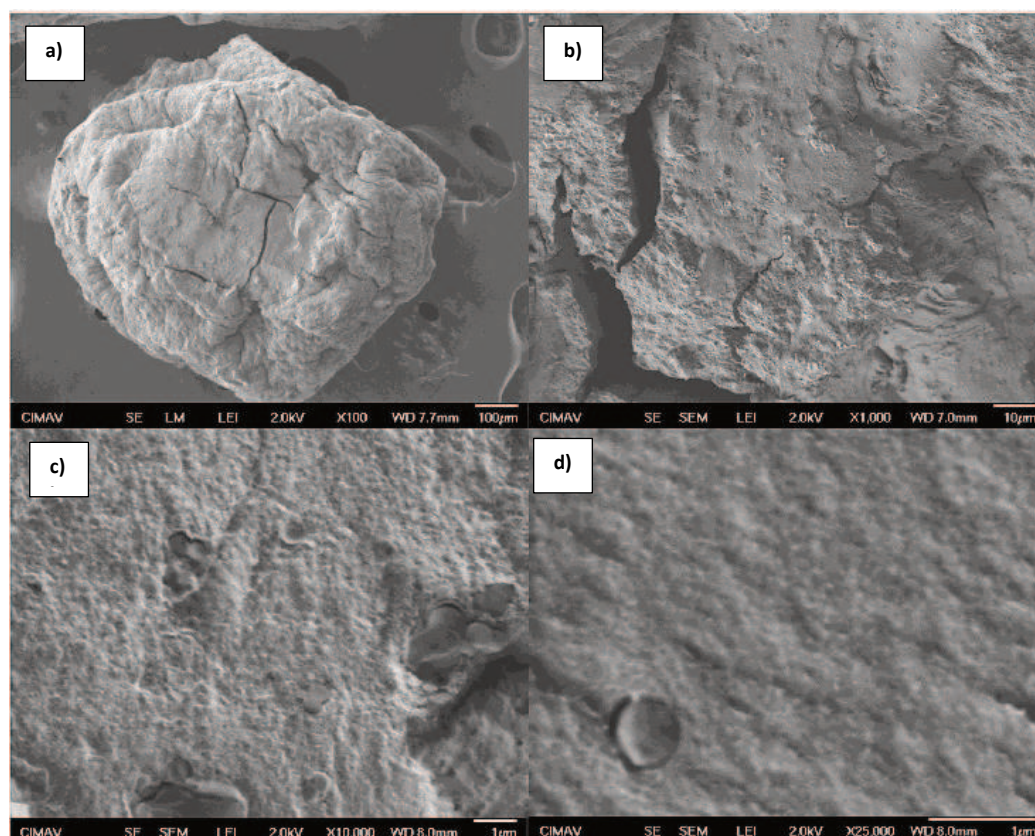


Figura 3.54. Micrografías del microscopio electrónico de barrido a diferentes aumentos de las microcápsulas de alginato con extracto biofortificado de residuos de cáscara de manzana ‘Granny Smith’ GS-E.

(a): Imagen con aumento 90X. (b): imagen con aumento 1kX. (c): imagen con aumento 10kX. (d): imagen con aumento 25kX.

3.13.2.1. Estabilidad de las microcápsulas del extracto rico en compuestos fenólicos de GS durante el proceso de digestión gastrointestinal *in-vitro*

El alginato de sodio se caracteriza por su estabilidad a diferentes condiciones adversas como los cambios de pH y temperatura (Ortiz-Romero et al., 2021). Para el caso de las CapUSGS-E obtenidas en la presente tesis, en la tabla 3.42 se puede apreciar como para la FS la liberación de compuestos fue significativamente ($p < 0.05$) menor por parte de CapUSGS-E en comparación con el extracto sin encapsular USGS-E. Para la FG el USGS-E tuvo reducciones en sus compuestos fenólicos individuales entre el 6-86% y la concentración de estos compuestos fue significativamente superior ($p < 0.05$) a CapUSGS-E, excepto para PACT de CapUSGS-E que mostró una concentración de 0.06 g Kg^{-1} mientras que para USGS-E fue de 0.04 g Kg^{-1} en la FG, destacando la protección del alginato como material de pared en compuestos de alto valor biológico como la (-)EPQN donde se redujeron sus pérdidas en un 29% con el proceso de encapsulación en la FG.

Para la FI, las CapUSGS-E mostraron un efecto protector significativamente mayor en comparación con el USGS-E, especialmente las flavanonas (Tabla 3.42).

Tabla 3.42. Estabilidad de las capsulas de alginato de sodio del extracto USGS-E durante el proceso de digestión *in-vitro*.

Muestra	Compuesto	Concentración (gKg ⁻¹)			Bioaccesibilidad (%)	
		Fluido Salival (FS)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)	Fase gástrica (FG)	Fase intestinal (FI)
USGS-E	CTQ	1.13 ± 0.54a*	1.04 ± 0.16a*	0.94 ± 0.08a	71.3*	68.4
	PACB2	0.73 ± 0.07a	0.44 ± 0.05b*	0.37 ± 0.05b	93.3*	80.0
	EPQN	1.82 ± 0.26a*	1.06 ± 0.11b*	0.62 ± 0.07b	92.7*	54.5
	PACT	0.24 ± 0.19a*	0.04 ± 0.004a	0.03 ± 0.01a	23.5	17.6
	PT	0.27 ± 0.02a	0.07 ± 0.003b*	0.03 ± 0.01c	15.9*	6.8
	PCH	0.57 ± 0.11a	0.02 ± 0.003b	0.02 ± 0.003b	14.3	14.3
	ACL	0.73 ± 0.08a	0.09 ± 0.02b*	n.d	64.3*	n.d
	Q3G	1.35 ± 0.02a*	0.57 ± 0.06b*	0.37 ± 0.06c	54.5*	42.6
	QP	0.42 ± 0.06a*	0.16 ± 0.02b*	0.02 ± 0.02c	80.0*	15.0
	QHS	0.54 ± 0.03a*	0.22 ± 0.005b*	0.18 ± 0.02b	84.6*	69.2
	QG	0.64 ± 0.07a*	0.27 ± 0.02b	0.20 ± 0.04b	81.8	60.6
	K3G	2.05 ± 0.15a*	1.23 ± 0.26b*	0.85 ± 0.03b*	89.6*	62.9*
	TPC _{HPLC}				58.4*	39.1
CapUSGS-E	CTQ	0.01 ± 0.004c	0.35 ± 0.09b	0.88 ± 0.11a	36.8	92.4
	PACB2	n.d	0.22 ± 0.002b	0.30 ± 0.02a	69.8	95.4
	EPQN	0.03 ± 0.003b	0.49 ± 0.06a	0.72 ± 0.22a	63.6	93.5
	PACT	0.01 ± 0.0005c	0.06 ± 0.006b*	0.08 ± 0.01a*	50.4*	67.2*
	PT	n.d	0.02 ± 0.016b	0.09 ± 0.02a*	6.50	29.2*
	PCH	n.d	0.03 ± 0.005b	0.09 ± 0.03a*	30.6	91.8*
	ACL	n.d	0.06 ± 0.0002a	0.01 ± 0.002b*	61.2	10.2*
	Q3G	0.02 ± 0.002b	0.37 ± 0.002a	0.38 ± 0.04a	52.3	53.7
	QP	0.01 ± 0.001b	0.11 ± 0.01a	0.13 ± 0.02a*	78.6	92.8*
	QHS	0.01 ± 0.001b	0.14 ± 0.01a	0.18 ± 0.05a	76.9	98.9
	QG	0.01 ± 0.001b	0.24 ± 0.06a	0.19 ± 0.06a	103.9	82.3
	K3G	0.02 ± 0.0004c	0.37 ± 0.01b	0.43 ± 0.03a	39.2	45.5
	TPC _{HPLC}				43.3	53.8

USGS-E, Extracto asistido por ultrasonidos a partir de subproducto de manzana en condiciones óptimas de biofortificación. CapUSGS-E: Microcapsulas del extracto biofortificado con compuestos fenólicos de GS. (+)CTQN: (+) Catequina; PACB2: Procianidina B2; (-)EPQN: (-) Epicatequina; PACT: procianidina Tetramero; PT: Procianidina trimero; ACL: Ácido clorogénico; Q3G: Quercetina-3-o-glucurónido; QPN: quercetina Pentóxido; QHS: quercetina Hexóxido; QG: Quercetina glucuronido; K3G: Kaempferol-3-o-glucurónido. TPC_{HPLC}: Contenido fenólico total por HPLC. n.d: No detectado. Letras minúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($p<0.05$). *: Diferencias de medias ($p<0.05$) entre el mismo compuesto de las muestras GS-N y GS-E

Derivados de la procianidina como la PACT, PT, PCH y compuestos como el ACL y la QP mostraron una concentración significativamente ($p<0.05$) superior en las CapUSGS-E en la FI comparado con el USGS-E. Adicionalmente, en FI, todos los compuestos de CapUSGS-E tuvieron un porcentaje mayor de bioaccesibilidad *in-vitro* llegando a ser hasta un 77% superior para el caso de PCT y QP, excepto para K3G el cual fue 17% inferior. Para el caso de TPC_{HPLC} se liberaron en fase intestinal concentraciones

similares para USGS-E (2.7 g Kg^{-1}) y para CapUSGS-E (2.6 g Kg^{-1}). Las microcápsulas de alginato mostraron inestabilidad cuando son sumergidas en una solución buffer fosfato con un pH de 7.4 debido al intercambio de iones que ocasiona la desintegración de la cadena polimérica. Los iones Ca^{2+} que se encuentran unidos a las unidades $-\text{COO}-$ de la secuencia de polimanuronato (bloques M) en la estructura de alginato, son reemplazados por los iones Na^+ presentes en la solución salina. Como resultado, se produce un aumento en la repulsión electrostática entre las cargas negativas de los grupos $-\text{COO}-$, lo que provoca la relajación de la cadena y el incremento del hinchamiento del gel. Esta relajación de la cadena permite la interacción de los iones del buffer fosfato con los iones Ca^{2+} , formando fosfato cálcico. Además, los iones Ca^{2+} que estaban previamente unidos a las unidades $-\text{COO}-$ del poliguluronato (bloques G) también comienzan a ser intercambiados por los iones Na^+ del buffer fosfato. Dado que las secuencias de poliguluronato desempeñan un papel crucial en la unión a los iones de calcio, formando una estructura compacta, las microcápsulas empiezan a desintegrarse (Bajpai & Sharma, 2004; Ortiz-Romero et al., 2021), liberando así el extracto de USGS-E en el medio, siendo la encapsulación con alginato de sodio una estrategia eficiente para proteger los diferentes compuestos fenólicos presentes en el residuo de cáscara de manzana 'Granny Smith'. Para el caso del aprovechamiento y estabilización de los compuestos fenólicos de los residuos agroindustriales de frutilla y de manzana no se tiene reportes específicos, sin embargo otros autores han reportado la revalorización de otros subproductos de grandes industrias como la industria del vino, que genera grandes cantidades de biomasa que puede ser usadas como fuente de compuestos bioactivos, los cuales han sido encapsulados con alginato con una eficiencia del 79% y una estabilidad a temperatura ambiente superior a los 6 meses (Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Moschona & Liakopoulou-Kyriakides, 2018).

4.CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

En la presente tesis se determinó que el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) de la cáscara de manzana 'Granny Smith' (GS) varió significativamente con el tipo de solvente de extracción utilizado, el número de etapas de extracción y la concentración de ácido fórmico (C_{FA}). Se determinó que en la extracción con acetona (80%) en dos etapas con C_{FA} = 0%, se extrajeron los mayores TPC (3.47 g AGE Kg⁻¹). Los flavan-3-oles fueron la clase mayoritaria de compuestos fenólicos determinados en los extractos de GS, representando el 59% del total de los compuestos fenólicos. La procianidina B2 fue el principal compuesto fenólico extraído y se correlacionó significativamente con la capacidad antioxidante de DPPH (R^2 0.86) y FRAP (R^2 0.88). Para la completa valorización de las cáscaras de manzana desechadas se evaluó el efecto de la secuencia de extracción de compuestos fenólicos y pectina, utilizando tecnologías alternativas como el ultrasonido. La extracción asistida por ultrasonido mejoró significativamente los rendimientos de pectina (22%). La pectina obtenida después de la extracción de compuestos fenólicos (proceso de extracción de pectina AE, ambos asistidos por ultrasonidos) aumentó el rendimiento de pectina de 5.35 a 6.38 % y el rendimiento de TPC de 1.37 a 11.92 g AGE Kg⁻¹ bs para los procesos de extracción de pectina antes (BE) y después (AE) de la extracción de compuestos fenólicos, respectivamente. Las procianidinas fueron los compuestos más afectados por el proceso de secado de GS, con reducciones de hasta el 96%, reduciendo así el contenido de compuestos fenólicos totales en el proceso de extracción de pectina BE (antes de la extracción de compuestos fenólicos).

Se estudió el potencial de los solventes verdes (agua y etanol) para la recuperación de compuestos fenólicos a partir de residuos agroindustriales de frutilla (RF) y de cáscara de manzana (GS). Utilizando el proceso de extracción mediante la tecnología tradicional del Soxhlet, se determinó que los extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se obtuvieron utilizando etanol al 80% y una relación de extracción entre 1:10 y 1:40 (peso/volumen) para RF, resultando en valores promedio de 15.37 g AGE Kg⁻¹ y una capacidad antioxidante máxima de 19 mmol TE Kg⁻¹ con un R de 1:40 p/v. Para GS, la relación óptima de extracción fue de 1:40 (peso/volumen), obteniendo valores de 11.9 g AGE Kg⁻¹ y 20.5 mmol TE Kg⁻¹. Además, se identificaron y cuantificaron ocho compuestos fenólicos principales en ambos residuos empleando esta tecnología de extracción. Los taninos hidrolizables, como el isómero de Tetragaloil glucosa (TGI: 0.83 g Kg⁻¹) y el dímero de galoil-bis-HHDP-glucosa (isómero de agrimoniin, AGN: 0.44 g Kg⁻¹) fueron los principales compuestos fenólicos extraídos de RF, mientras que los flavonoles representaron el 83.7% del total de compuestos fenólicos extraídos de GS, obteniéndose para la Quercetina-3-O-glucurónido el mayor rendimiento (Q3G: 0.43 g Kg⁻¹).

La extracción de compuestos fenólicos por maceración con solventes verdes como agua y etanol 80% (EtOH) mostró ser efectiva para ambos tejidos vegetales. El proceso de extracción de compuestos fenólicos y la variación de la capacidad antioxidante de los extractos de RF y GS fueron adecuadamente modeladas por el modelo de Peleg y el modelo empírico tanto a 20°C como a 70°C. Se determinó que los factores que afectaron significativamente al proceso fueron el tipo de solvente utilizado y la relación de extracción. La variación de la temperatura afectó significativamente a la capacidad antioxidante de los extractos. Adicionalmente, se determinó que después de 90 min no hubo incremento significativo en el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante para la extracción a 20°C, y 60 min para la extracción a 70°C. El etanol al 80% fue el disolvente con mayor rendimiento, alcanzando el mayor contenido de TPC para la RF con una relación de extracción de 1:30 a 70°C (38 g AGE Kg⁻¹). En términos de capacidad antioxidante, se alcanzó un valor de 119 µmol TEg⁻¹ con EtOH 1:30 a 20°C. Del mismo modo, para GS el mayor TPC fue de 12.2 g AGE Kg⁻¹ con EtOH 1:30 a 70°C, y la CA fue de 25 µmol TE g⁻¹ con EtOH 1:40 a 20°C. Por otra parte, para esta tecnología de extracción se identificaron 9 compuestos fenólicos tanto para RF como para GS. El agrimoniin fue el compuesto mayoritario en RF alcanzando la máxima recuperación (0.49 g Kg⁻¹) con la extracción con EtOH 1:20 a 70°C. Para GS, la quercetina pentóxido fue el principal compuesto fenólico con una recuperación máxima de 0.23 g/Kg utilizando EtOH 1:40 a 20°C. De esta forma, se demuestra la viabilidad de añadir valor a este tipo de subproductos mediante una tecnología de extracción convencional, segura y eficiente utilizando disolventes de bajo impacto ambiental, obteniendo metabolitos secundarios con potencial bioactivo.

Los residuos agroindustriales de frutilla respondieron al efecto elicitor de la radiación UVA y al almacenamiento a diferentes temperaturas, lo cual activó su metabolismo secundario y llevó a un aumento en la actividad PAL, la PPO y la síntesis de compuestos fenólicos. El proceso de biofortificación fue optimizado con éxito, y se determinaron las condiciones óptimas de biofortificación con compuestos fenólicos mediante la aplicación de una radiación UVA de 86 KJ m⁻² junto con un almacenamiento a 15°C durante 46 h. El uso combinado de radiación UVA y condiciones de almacenamiento controladas como herramientas de biofortificación con compuestos fenólicos para la revalorización de subproductos agroindustriales de frutilla demostró ser una tecnología alternativa que indujo eficazmente el metabolismo secundario de estos tejidos de desecho, obteniéndose incrementos del 184% en compuestos fenólicos respecto al control. El agrimoniin (AGN) fue el compuesto principalmente incrementado al aplicar el estrés (1.9 g Kg⁻¹ RF) con un 25% de bioaccesibilidad. El proceso de biofortificación aplicado mejoró significativamente la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos totales y sus bioactividades, como la

capacidad antiproliferativa en células de cáncer colorrectal Caco-2 y HT29, y la seguridad del extracto de RF demostrada en la línea celular HDFa (Fib), ya que los IC_{50} para Fib fueron significativamente superiores (10 mg mL^{-1}) a los mostrados para Caco2 y HT29 ($5.43\text{-}2.73 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente), y la capacidad antioxidante celular, y la actividad antiinflamatoria, donde la RF-E (69 y 31% respectivamente) mostró superioridad sobre el residuo control, RF-N (58 y 13% respectivamente). Estos resultados transforman a estos subproductos en una fuente sostenible y de bajo coste de valiosos compuestos bioactivos con aplicaciones preventivas en enfermedades crónicas degenerativas.

La optimización de extracción de compuestos fenólicos mediante ultrasonido mejoró la concentración de los extractos de RF ($>103 \text{ g AGE Kg}^{-1}$). La relación de extracción y la potencia ultrasónica influyeron positivamente en la velocidad y capacidad de extracción, especialmente con 40% de etanol. El modelo de Peleg permitió determinar las condiciones óptimas: relación 1:30 p/v, 40% etanol y 100% potencia ultrasónica (400W). En estas condiciones de extracción con RF biofortificado se obtuvo un rendimiento del 6.1% (p/p) de extracto liofilizado con un contenido promedio de TPC de $117 \text{ g AGE Kg}^{-1}$ de RF seco, 6 veces mayor que con Soxhlet con etanol 80% y relación 1:40 p/v ($15.8 \text{ g AGE Kg}^{-1}$ RF seco). La bioaccesibilidad fue mayor en el extracto ultrasónico (TPC_{HPLC} 36.5%) para USRF-E, siendo 14.5% superior a la bioaccesibilidad del tejido residual biofortificado (RF-E). Se observó actividad anticancerígena en células de cáncer colorrectal (IC_{50} HT29_{USRF-E} 2.4 mg mL^{-1}), mientras que células sanas tuvieron IC_{50} Fib_{USRF-E} $6.7\text{-}2.4 \text{ mg mL}^{-1}$). Las fracciones digeridas mostraron propiedades antiinflamatorias (42% reducción de NOX) y capacidad antioxidante (74% USRF-E) en células Caco-2. La extracción asistida por ultrasonido también produjo extractos con potencial antiobesidad, con reducciones de lípidos en adipocitos (15% y 11% para USRF-N y USRF-E, respectivamente).

La estrategia de biofortificación en GS mostró una respuesta dependiente de la intensidad del corte y el tiempo de almacenamiento. El corte C3 (1.5 mm) y la temperatura de almacenamiento de 15°C produjeron incrementos significativos en PAL (1201%), PPO (308%), TPC (108%), PACB2 (22%), y TPC_{HPLC} (118%) a las 48 horas de almacenamiento. Las condiciones óptimas de biofortificación fueron C3, temperatura de almacenamiento de 17°C y tiempo de almacenamiento de 56 h. En estas condiciones validadas se obtuvieron $2.7 \text{ g AGE Kg}^{-1}$, 0.26 g Kg^{-1} GS y 0.90 g Kg^{-1} GS para TPC, PACB2 y TPC_{HPLC}, respectivamente.

La aplicación secuencial del estrés por corte y radiación UVA en la cáscara de la manzana 'Granny Smith' activaron sinérgicamente el metabolismo secundario. El estrés abiótico causado por el corte mecánico (1.5 mm), la radiación UVA (66 KJ m^{-2}) y el

almacenamiento a 17°C generaron una acumulación de compuestos fenólicos de hasta el 174% en comparación al contenido inicial. Se observó un alto contenido de flavan-3-oles, procianidinas y flavonoles, siendo la procianidina B2 (0.78 g Kg⁻¹) el compuesto con mayor acumulación durante el proceso de biofortificación. Además, la bioaccesibilidad de (+)CTQN, (-)EPQN, PACT, ACI, Q3G, QPN y K3G mejoró significativamente, lo que resultó en una mayor bioactividad, incluyendo una mayor capacidad antioxidante celular y una mayor capacidad antiinflamatoria (67.3 y 37.3%, respectivamente).

La asistencia de ultrasonido optimizó la extracción de compuestos fenólicos de la manzana GS. La relación de extracción 1:36 p/v, etanol 76% y potencia de 208 W lograron el mejor rendimiento de extracción del 10% p/p con un contenido de TPC promedio de 23.3 g AGE Kg⁻¹, 96% superior a la extracción por Soxhlet (11.9 g AGE Kg⁻¹). La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en USGS-E fue significativamente superior para (+)CTQN (68%), PACB2 (80%), PCH (14.3%), QHS (69%) y K3G (63%) y los TPC_{HPLC} mostraron un 14% más de bioaccesibilidad cuando son extraídos por la asistencia de ultrasonido.

La extracción por ultrasonido de GS no afectó el IC₅₀ para la línea celular HDFa y, además, potenció la actividad antiproliferativa en las células de cáncer colorrectal Caco-2 y HT29 en comparación con el control de células HDFa sanas. Las fracciones digeridas del extracto USGS-E generaron una reducción significativa del IC₅₀ necesario para las células HT29, con una disminución del 57% en comparación con GS-N. Para las células Caco-2, esta reducción fue del 74%, disminuyendo de 14.6 mg mL⁻¹ con GS-N a 3.8 mg mL⁻¹ con USGS-E. La fracción digerida de GS-E y USGS-E mostraron el potencial antiinflamatorio más alto con un 37% y un 43%, respectivamente. La fracción digerida del tejido GS-E mostró el mayor %CAA (68.3%), siendo un 8% superior al de las fracciones de los extractos obtenidos con ultrasonido. Sin embargo, el extracto US de GS mostró potencial antiobesidad al reducir en un 15% y un 19% la concentración de lípidos en las células 3T3 para USGS-N y USGS-E, respectivamente.

El alginato de sodio al 2% se mostró como un eficaz agente de encapsulación para el extracto rico en compuestos fenólicos de los residuos agroindustriales de frutilla y cáscara de manzana 'Granny Smith', logrando una eficiencia de encapsulación del 73% para USRF-E y del 87% para USGS-E, con microcápsulas de diámetros entre 700-800 µm. Estas microcápsulas mejoraron la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en un 2% para CapUSRF-E y un 12% para CapUSGS-E. Esto contribuye a preservar la bioactividad de los compuestos fenólicos utilizando un material ecológico no tóxico y con bajo impacto ambiental como el alginato de sodio.

Los resultados obtenidos muestran que cada residuo agroindustrial ofrece un sin número de posibilidades para su aprovechamiento y adecuado manejo, siendo importante estudiar su potencial y funcionalidades adecuadamente, ya que cada uno aporta actividades biológicas diferentes. Adicionalmente, estos resultados permiten modular y controlar los diferentes procesos de biofortificación con compuestos fenólicos en función de la capacidad operativa y tecnológica. El aprovechamiento de los residuos agroindustriales de frutilla y manzana a través de la biofortificación con compuestos fenólicos, seguido de la extracción utilizando solventes verdes y asistencia por ultrasonido, ofrece una alternativa prometedora de obtener extractos ricos en compuestos fenólicos con propiedades bioaccesibles y potencialmente beneficiosas para la prevención y el tratamiento del cáncer colorrectal, así como para combatir la inflamación y la adipogénesis. Estas investigaciones abren nuevas posibilidades en la utilización de estos residuos y promueven la aplicación de prácticas más sostenibles y rentables en la industria agroalimentaria.

Las estrategias utilizadas permitieron aumentar el potencial bioactivo de estos residuos, contribuyendo a la transformación circular de los procesos agroindustriales y a la reducción de los impactos ambientales. El uso de tecnologías sostenibles como el ultrasonido, la radiación UVA y los solventes eco-amigables demuestran ser eficaces y de bajo costo en la obtención de compuestos fenólicos. Estos compuestos tienen un papel importante en la prevención y control de enfermedades como el cáncer y la obesidad. De esta manera, se impulsa a ampliar los mercados de compuestos nutracéuticos, promoviendo el acceso de un mayor número de personas a productos beneficiosos para la salud, a través de alternativas sostenibles que fomentan la valorización de los residuos agroindustriales y promueven un enfoque más ecológico y económicamente viable en las industrias agrícola y alimentaria.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., & Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 132(1), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>
- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2018). Solid waste issue: Sources, composition, disposal, recycling, and valorization. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27(4), 1275–1290. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2018.07.003>
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Agnolet, S., Ciesa, F., Soini, E., Cassar, A., Matteazzi, A., Guerra, W., Robatscher, P., Storti, A., Baric, S., Dalla Via, J., & Oberhuber, M. (2017). Makroelemente und Qualitätsparameter von 34 alten und acht kommerziellen Apfelsorten angebaut am selben Standort in Südtirol, Italien. *Erwerbs-Obstbau*, 59(3), 171–183. <https://doi.org/10.1007/s10341-017-0336-8>
- Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Food Chemistry*, 190, 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.117>
- AL Juhaimi, F. (2014). Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 1459–1462.
- Alara, O., Abdurahman, N., & Ukaegbu, C. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11(July), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.07.003>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4(December 2020), 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Almeida, D. P. F., Gião, M. S., Pintado, M., & Gomes, M. H. (2017). Bioactive phytochemicals in apple cultivars from the Portuguese protected geographical indication “Maçã de Alcobaça.” Basis for market segmentation. *International Journal of Food Properties*, 20(10), 2206–2214. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1233431>
- Ambroselli, D., Masciulli, F., Romano, E., Catanzaro, G., Besharat, Z. M., Massari, M. C., Ferretti, E., Migliaccio, S., Izzo, L., Ritieni, A., Grosso, M., Formichi, C., Dotta, F., Frigerio, F., Barbiera, E., Giusti, A. M., Ingallina, C., & Mannina, L. (2023). New Advances in Metabolic Syndrome, from Prevention to Treatment: The Role of Diet and Food. *Nutrients*, 15(3), 1–39. <https://doi.org/10.3390/nu15030640>
- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Asch, M., Assaf-ducrocq, C., & Gontier, E. (2018). The Desirability Optimization Methodology; a Tool to Predict Two Antagonist Responses in Biotechnological Systems: Case of Biomass Growth and Hyoscyamine Content in Elicited *Datura stramonium* Hairy Roots. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16(1), 11–19. <https://doi.org/10.21859/ijb.1339>
- Amiri, F., Moghadam, A., Tahmasebi, A., & Niazi, A. (2023). Identification of key genes involved in secondary metabolite biosynthesis in *Digitalis purpurea*. In *PLoS ONE* (Vol. 18, Issue 3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277293>

- Angelino, D., Cossu, M., Marti, A., Zanoletti, M., Chiavaroli, L., Brighenti, F., Del Rio, D., & Martini, D. (2017). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: A review. *Food and Function*, 8(7), 2368–2393. <https://doi.org/10.1039/c7fo00574a>
- Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. A., López-Pacheco, F., Alvarez, M. M., & Serna-Saldívar, S. O. (2015). In vivo anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill cladodes. *Industrial Crops and Products*, 76, 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.08>
- Antunes-Ricardo, M., Rodríguez-Rodríguez, C., Gutiérrez-Urbe, J. A., Cepeda-Cañedo, E., & Serna-Saldívar, S. O. (2017). Bioaccessibility, intestinal permeability and plasma stability of isorhamnetin glycosides from *Opuntia ficus-indica* (L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081816>
- AOAC, I. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In W. Horwitz & G. Latimer (Eds.), *AOAC* (18th ed., Issue February). AOAC international.
- Araji, S., Grammer, T. A., Gertzen, R., Anderson, S. D., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Phu, M. L., Solar, A., Leslie, C. A., Dandekar, A. M., & Escobar, M. A. (2014). Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant Physiology*, 164(3), 1191–1203. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228593>
- Ariza, M., Forbes-Hernández, T., Reboredo-Rodríguez, P., Afrin, S., Gasparrini, M., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., Battino, M., & Giampieri, F. (2018). Strawberry and Achenes Hydroalcoholic Extracts and Their Digested Fractions Efficiently Counteract the AAPH-Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2180. <https://doi.org/10.3390/ijms19082180>
- Arrieta-Guevara, M. A., Higuera-Mancipe, B. L., & Martínez-Peralta, S. T. (2010). Induction of phenylalanine ammonia lyase and variation in phenolic compounds content in lulo fruits (*Solanum quitoense* Lam) infected by *Colletotrichum acutatum*. *Acta Biologica Colombiana*, 15(1), 129–144.
- Arshad, F., Rehman, S., Imran, M., Saqib, S., Kanwal, A., Batool, N., & Mitu, L. (2018). Antioxidant potential of apple's peel extract and its efficiency in stabilization of sunflower oil. *Romanian Agricultural Research*, 2018(35), 249–254.
- Axel, E. (2016). *Cultivos anuales y bianuales de frutilla en el Sudeste de la provincia de Buenos Aires: Modificaciones en los parámetros de crecimiento* [Universidad Nacional del Litoral]. <http://hdl.handle.net/11185/851>
- Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03), 3–8. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Azzini, E., Intorre, F., Vitaglione, P., Napolitano, A., Foddai, M. S., Durazzo, A., Fumagalli, A., Catasta, G., Rossi, L., Venneria, E., Testa, M. F., Raguzzini, A., Palomba, L., Fogliano, V., & Maiani, G. (2010). Absorption of strawberry phytochemicals and antioxidant status changes in humans. *Journal of Berry Research*, 1(2), 81–89. <https://doi.org/10.3233/BR-2010-009>
- Babaoglu Aydaş, S., Ozturk, S., & Aslim, B. (2013). Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chemistry*, 136(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.119>
- Babarinde, G. O., Olatunde, S. J., Adebisi-Olabode, A., Siddiqui, M. W., Zavala, J. F. A., Escobedo-avellaneda, Z., Guerrero-beltrán, J. Á., Company, F., For, A., To, E., Market, T. H. E. U. S., Fulton, S. L., McKinley, M. C., Young, I. S., Cardwell, C. R., & Woodside,

- J. V. (2015). Technologies in Fresh-Cut Fruit and Vegetables. In *Fruit Preservation* (Vol. 48, Issue 5, pp. 802–816). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10677-9>
- Bajpai, S. K., & Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59(2), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002>
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- Barba, F. J., Chemat, F., Muneke, P. E. S., Cravotto, G., & Rodriguez, J. M. L. (2020). Design and Optimization of Innovative Food Processing Techniques Assisted by Ultrasound: Developing Healthier and Sustainable Food Products. In *Design and Optimization of Innovative Food Processing Techniques Assisted by Ultrasound: Developing Healthier and Sustainable Food Products*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818275-8.09999-2>
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>
- Basak, S., & Gokhale, J. (2022). Immunity boosting nutraceuticals: Current trends and challenges. *Journal of Food Biochemistry*, 46(3), 1–29. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13902>
- Basu, A., Izuora, K., Betts, N. M., Kinney, J. W., Salazar, A. M., Ebersole, J. L., & Scofield, R. H. (2021). Dietary Strawberries Improve Cardiometabolic Risks in Adults with Obesity and Elevated Serum LDL Cholesterol in a Randomized Controlled Crossover Trial. *Nutrients*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/nu13051421>
- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M., & Lyons, T. J. (2014). Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), 790–806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>
- Battino, M., Beekwilder, J., Denoyes-Rothan, B., Laimer, M., McDougall, G. J., & Mezzetti, B. (2009). Bioactive compounds in berries relevant to human health. *Nutrition Reviews*, 67(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00178.x>
- Battino, M., Giampieri, F., Cianciosi, D., Ansary, J., Chen, X., Zhang, D., Gil, E., & Forbes-Hernández, T. (2021). The roles of strawberry and honey phytochemicals on human health: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of oxidative stress and inflammation. *Phytomedicine*, 86(December 2019), 153170. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153170>
- Becerra-Moreno, A., Redondo-Gil, M., Benavides, J., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2015). Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. *Frontiers in Plant Science*, 6(OCTOBER). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00837>
- BeMiller, J. N. (1986). An Introduction to Pectins: Structure and Properties. In *Chemistry and Function of Pectins* (Vol. 310, pp. 1–2). American Chemical Society. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-1986-0310.ch001>
- Ben Amor, B., & Allaf, K. (2009). Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Food Chemistry*, 115(3), 820–825.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.094>

- Bengardino, M. B., Fernandez, M. V., Nutter, J., Jagus, R. J., & Agüero, M. V. (2019). Recovery of bioactive compounds from beet leaves through simultaneous extraction: Modelling and process optimization. *Food and Bioprocess Processing*, 118, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.013>
- Bhatia, S., Sharma, H., & Alam, M. S. (2016). Pectin from agricultural by-products: Structure, methods of extraction, physiological benefits and applications. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 29(1), 1–8. <https://doi.org/10.5958/0974-4479.2016.00001.0>
- Bibi, S., Du, M., & Zhu, M. J. (2018). Dietary red raspberry reduces colorectal inflammation and carcinogenic risk in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Journal of Nutrition*, 148(5), 667–674. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy007>
- Birner, R. (2017). Bioeconomy concepts. In *Bioeconomy: Shaping the Transition to a Sustainable, Biobased Economy* (pp. 17–38). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68152-8_3
- Bitalebi, S., Nikoo, M., Rahmanifarah, K., Noori, F., & Ahmadi Gavligi, H. (2019). Effect of apple peel extract as natural antioxidant on lipid and protein oxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mince. *International Aquatic Research*, 11(2), 135–146. <https://doi.org/10.1007/s40071-019-0224-y>
- Blancas-Benitez, F. J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A. E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáyo-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican “Ataulfo” mango (*Mangifera indica* L.) by-products. *Food & Function*, 6(3), 859–868. <https://doi.org/10.1039/c4fo00982g>
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Borges, G., Ottaviani, J. I., van der Hooft, J. J. J., Schroeter, H., & Crozier, A. (2018). Absorption, metabolism, distribution and excretion of (–)-epicatechin: A review of recent findings. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.002>
- Bosch, E., & Rosés, M. (1992). Relationship between ET polarity and composition in binary solvent mixtures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 88(24), 3541–3546. <https://doi.org/10.1039/FT9928803541>
- Bouis, H. E., & Saltzman, A. (2017). Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security*, 12(January), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.009>
- Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M. L., & Leibman, M. (2006). Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 27–38. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9000-x>
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Buendía, B., Gil, M. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., López, J. M., & Tomás-Barberán, F. A. (2010). HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3916–3926. <https://doi.org/10.1021/jf9030597>

- Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermáková, A., Réblová, Z., Jurček, O., Kolehmainen, E., Verhé, R., & Kvasnička, F. (2011). Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(2), 181–189. <https://doi.org/10.17221/300/2010-cjfs>
- Bush, P. L. (2014). *Pectin: Chemical Properties, Uses and Health Benefits* (P. Bush (ed.); first edit). nova publishers.
- Campos, D. A., Gómez-García, R., Vilas-Boas, A. A., Madureira, A. R., & Pintado, M. M. (2020). Management of fruit industrial by-products—a case study on circular economy approach. *Molecules*, 25(2). <https://doi.org/10.3390/molecules25020320>
- Cano-Lamadrid, M., & Artés-Hernández, F. (2021). *By-Products Revalorization with Non-Thermal Treatments to Enhance Phytochemical Compounds of Fruit and Vegetables Derived Products: A Review*. <https://doi.org/10.3390/foods11010059>
- Carciochi, R., Sologubik, C., Fernández, M., Manrique, G., & D'Alessandro, L. (2018). Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Brewer's Spent Grain: Optimization and Kinetics Modeling. *Antioxidants*, 7(4), 45. <https://doi.org/10.3390/antiox7040045>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.032>
- Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., & Ariza, M. T. (2020). Bioavailability of phenolic compounds in strawberry, raspberry and blueberry: Insights for breeding programs. *Food Bioscience*, 37(July), 100680. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100680>
- Chan, C. H., Yusoff, R., & Ngoh, G. C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169–1186. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2013.10.001>
- Charpe, T. W., & Rathod, V. K. (2016). Kinetics of ultrasound assisted extraction of wedelolactone from eclipta alba. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4), 1003–1010. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160334s20140234>
- Chatel, G. (2018). How sonochemistry contributes to green chemistry? *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.029>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chen, M., Zhao, Y., & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.110>
- Chen, Y., Fanourakis, D., Tsaniklidis, G., Aliniaiefard, S., Yang, Q., & Li, T. (2021). Low UVA intensity during cultivation improves the lettuce shelf-life, an effect that is not sustained at higher intensity. *Postharvest Biology and Technology*, 172(September 2020), 111376. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111376>

- Chen, Y., Li, T., Yang, Q., Zhang, Y., Zou, J., Bian, Z., & Wen, X. (2019). UVA Radiation Is Beneficial for Yield and Quality of Indoor Cultivated Lettuce. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01563>
- Cheng, C.-S. (2016). *Theory of Factorial Design*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/b16253>
- Chlif, N., Bouymajane, A., Oulad El Majdoub, Y., Diouri, M., Rhazi Filali, F., Bentayeb, A., Altemimi, A. B., Mondello, L., & Cacciola, F. (2022). Phenolic compounds, in vivo anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the aqueous extracts from fresh and dry aerial parts of *Brocchia cinerea* (Vis.). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 213(January), 114695. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114695>
- Chordi, S. (2014). *Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimamente procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de luz de alta intensidad*. 45. <https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/47159/schordib.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chukwumah, Y. C., Walker, L. T., Verghese, M., & Ogutu, S. (2009). Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(2), 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.07.007>
- Clementine. O, F. H. T. Q. (2021). Food Waste Index Report 2021. In *Unep*.
- Clodoveo, M. L., Paduano, A., Di Palmo, T., Crupi, P., Moramarco, V., Distaso, E., Tamburrano, P., Amirante, R., Sacchi, R., Corbo, F., & Pesce, V. (2017). Engineering design and prototype development of a full scale ultrasound system for virgin olive oil by means of numerical and experimental analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.004>
- Colak, A. M. (2019). Morphological and Biochemical Diversity in Fruits of *Arbutus unedo* L. from East Aegean Region in Turkey. *Erwerbs-Obstbau*, 61(4), 379–383. <https://doi.org/10.1007/s10341-019-00450-4>
- Colizzi, C. (2019). The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 5(October), 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.09.002>
- Coman, V., Teleky, B. E., Mitrea, L., Martău, G. A., Szabo, K., Călinoiu, L. F., & Vodnar, D. C. (2020). Bioactive potential of fruit and vegetable wastes. *Advances in Food and Nutrition Research*, 91, 157–225. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.07.001>
- Constenla, D., Ponce, A. G., & Lozano, J. E. (2002). Effect of pomace drying on apple pectin. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 216–221. <https://doi.org/10.1006/fstl.2001.0841>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5, p. 87). <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Cravotto, G., & Cintas, P. (2006). Power ultrasound in organic synthesis: Moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. *Chemical Society Reviews*, 35(2), 180–196. <https://doi.org/10.1039/b503848k>
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016a). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 194, 135–142.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>

- Ćujić, N., Trifković, K., Bugarski, B., Ibrić, S., Pljevljakušić, D., & Šavikin, K. (2016b). Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. *Industrial Crops and Products*, 86, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.045>
- Cvejić, J. H., Krstonošić, M. A., Bursác, M., & Miljić, U. (2017). Polyphenols. In *Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805257-0.00007-7>
- da Silva Pinto, M., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107(4), 1629–1635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038>
- Dalponete Dallabona, I., de Lima, G. G., Cestaro, B. I., Tasso, I. de S., Paiva, T. S., Laureanti, E. J. G., Jorge, L. M. de M., da Silva, B. J. G., Helm, C. V., Mathias, A. L., & Jorge, R. M. M. (2020). Development of alginate beads with encapsulated jabuticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1421–1432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.256>
- Darré, M., Vicente, A. R., Cisneros-Zevallos, L., & Artés-Hernández, F. (2022). Postharvest Ultraviolet Radiation in Fruit and Vegetables: Applications and Factors Modulating Its Efficacy on Bioactive Compounds and Microbial Growth. In *Foods* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/foods11050653>
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2018). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 253–271). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- De Laurentiis, V., Corrado, S., & Sala, S. (2018). Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. *Waste Management*, 77, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.001>
- de Souza, M. C., de Castilho, A. L. T., Tarran, C. M., Zabeu, M. S., Teixeira, L. de L., & Rozza, A. L. (2021). Antiinflammatory activity of natural dietary flavonoids. In S. Gopi, A. Amalraj, A. Kunnumakkara, & S. B. T.-I. and N. P. Thomas (Eds.), *Inflammation and Natural Products* (pp. 113–125). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819218-4.00008-0>
- De Taeye, C., Kankolongo Cibaka, M. L., Jerkovic, V., & Collin, S. (2014). Degradation of (-)-epicatechin and procyanidin b2 in aqueous and lipidic model systems. First evidence of “chemical” flavan-3-ol oligomers in processed cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(36), 9002–9016. <https://doi.org/10.1021/jf502016z>
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., & Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.030>
- Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2014). Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Research International*, 65(PB), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.025>
- Delorme, M. M., Guimarães, J. T., Coutinho, N. M., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, R., Margalho, L. P., Pimentel, T. C., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Granato, D., Sant’Ana,

- A. S., Duarte, M. C. K. H., & Cruz, A. G. (2020). Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 102, pp. 146–154). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.001>
- Dhyani, P., Bahukhandi, A., Rawat, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2018). Diversity of bioactive compounds and antioxidant activity in Delicious group of apple in Western Himalaya. *Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 2587–2599. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3179-x>
- Ding, P., & Ling, Y. S. (2014). Browning assessment methods and polyphenol oxidase in UV-C irradiated Berangan banana fruit. *International Food Research Journal*, 21(4), 1667–1674.
- Ding, S., Xu, S., Fang, J., & Jiang, H. (2020). The Protective Effect of Polyphenols for Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01407>
- Doesburg, J. (1966). Pectic Substances in Fresh and Preserved Fruits and Vegetables. *Chemistry & Industry*, 31, 1329.
- Dranca, F., & Oroian, M. (2018). Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Research International*, 113(June), 327–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065>
- Drogoudi, P. D., & Pantelidis, G. (2011). Effects of position on canopy and harvest time on fruit physico-chemical and antioxidant properties in different apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 752–760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.036>
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- E.A de Magalhaes, B., & Dos Santos, W. (2020). Phenolic content and antioxidant capacity of infusions herbs : Optimization of phenolic extraction and HPLC-DAD method. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 92(3), 1–17. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020190646>
- Edashige, Y., Murakami, N., & Tsujita, T. (2008). Inhibitory Effect of Pectin from the Segment Membrane of Citrus Fruits on Lipase Activity. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 54(5), 409–415. <https://doi.org/10.3177/jnsv.54.409>
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A. L., & Aktas, L. (2007). Stress-protective role of secondary metabolites: Diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, 34.
- Edyta, Ł., & Iwona, C. (2012). Plant Responses to Wounding. In *Biological diversity - from cell to ecosystem*. (Issue May, pp. 73–85). Wiley. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001321>
- El Seoud, O. A. (2009). Understanding solvation. *Pure and Applied Chemistry*, 81(4), 697–707. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-09-27>
- Elger, A., Lemoine, D. G., Fenner, M., & Hanley, M. E. (2009). Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. *Oikos*, 118(5), 767–773. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17206.x>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators,

- and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. *Plant Physiology*, 184(1), 39–52. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00433>
- Eroglu, E., & Girgin, S. N. (2021). A unique phenolic extraction method from olive oil macerate of *Hypericum perforatum* using DMSO: Assessment of in vitro anticancer activity, LC-MS/MS profile, total phenolic content and antioxidant capacity. *South African Journal of Botany*, 139, 6–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.015>
- Escarpa, A., & González, M. C. (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A*, 823(1–2), 331–337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00294-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00294-5)
- Esposito, K., Chiodini, P., Capuano, A., Bellastella, G., Maiorino, M. I., Rafaniello, C., Panagiotakos, D. B., & Giugliano, D. (2013). Colorectal cancer association with metabolic syndrome and its components: a systematic review with meta-analysis. *Endocrine*, 44(3), 634–647. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-9939-5>
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Faicán, M. A., Cortez, J. D., Piagentini, A. M., & Pirovani, M. É. (2018). Impregnación por vacío: Impacto de las variables tecnológicas para la obtención de manzanas mínimamente procesadas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541007>
- Fang, S. C., Hsu, C. L., & Yen, G. C. (2008). Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of *Artocarpus heterophyllus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4463–4468. <https://doi.org/10.1021/jf800444g>
- FAO. (2021). Food Waste Index Report 2021. In *Unep*.
- Feliciano, R. P., Antunes, C., Ramos, A., Serra, A. T., Figueira, M. E., Duarte, C. M. M., Carvalho, A. de, & Bronze, M. R. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 - Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.12.004>
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentão, P., Andrade, P. B., González-álvarez, J., & Pereira, J. A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>
- Fernando, C. D., & Soysa, P. (2015). Extraction Kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewing. *Nutrition Journal*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0060-x>
- Ferreira-Santos, P., Ibarz, R., Fernandes, J.-M., Pinheiro, A. C., Botelho, C., Rocha, C. M. R., Teixeira, J. A., & Martín-Belloso, O. (2021). Encapsulated Pine Bark Polyphenolic Extract during Gastrointestinal Digestion: Bioaccessibility, Bioactivity and Oxidative Stress Prevention. *Foods*, 10(2), 328. <https://doi.org/10.3390/foods10020328>
- Ferrentino, G., Morozova, K., Mosibo, O. K., Ramezani, M., & Scampicchio, M. (2018). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*, 186, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.165>
- Flannigan, D. J., & Suslick, K. S. (2010). Inertially confined plasma in an imploding bubble. *Nature Physics*, 6(8), 598–601. <https://doi.org/10.1038/nphys1701>

- Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B., & Kong, F. (2014). Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 153, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.063>
- Formica-Oliveira, A. C., Martínez-Hernández, G. B., Aguayo, E., Gómez, P. A., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2016). UV-C and hyperoxia abiotic stresses to improve healthiness of carrots: study of combined effects. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3465–3476. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2321-x>
- Formica-Oliveira, A. C., Martínez-Hernández, G. B., Díaz-López, V., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2017). Effects of UV-B and UV-C combination on phenolic compounds biosynthesis in fresh-cut carrots. *Postharvest Biology and Technology*, 127, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.12.010>
- Forni, C., Facchiano, F., Bartoli, M., Pieretti, S., Facchiano, A., D'Arcangelo, D., Norelli, S., Valle, G., Nisini, R., Beninati, S., Tabolacci, C., & Jadeja, R. N. (2019). Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. In *BioMed Research International* (Vol. 2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8748253>
- Fotirić Akšić, M., Dabić Zagorac, D., Sredojević, M., Milivojević, J., Gašić, U., Meland, M., & Natić, M. (2019). Chemometric Characterization of Strawberries and Blueberries according to Their Phenolic Profile: Combined Effect of Cultivar and Cultivation System. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules24234310>
- Francini, A., Giro, A., & Ferrante, A. (2019). Biochemical and molecular regulation of phenylpropanoids pathway under abiotic stresses. In *Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00011-3>
- Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J., & Burrell, M. A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280(6), E827–47. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.6.E827>
- Fumagalli, M., Sangiovanni, E., Vrhovsek, U., Piazza, S., Colombo, E., Gasperotti, M., Mattivi, F., De Fabiani, E., & Dell'Agli, M. (2016). Strawberry tannins inhibit IL-8 secretion in a cell model of gastric inflammation. *Pharmacological Research*, 111, 703–712. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.028>
- Gadkari, P. V., & Balaraman, M. (2015). Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioprocess Processing*, 93(August 2013), 122–138. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.004>
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, 26(2), 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- Galván D'Alessandro, L., Dimitrov, K., Vauchel, P., & Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from Aronia melanocarpa (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818–1826. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.020>
- Galván D'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation Science and Technology*, 93, 42–47.
- Garavand, F., Jalai-Jivan, M., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2021). Encapsulation of

- phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. *Food Chemistry*, 364(June), 130376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130376>
- Garcia-Amezquita, L. E., Tejada-Ortigoza, V., Serna-Saldivar, S. O., & Welte-Chanes, J. (2018). Dietary fiber concentrates from fruit and vegetable by-products: Processing, modification, and application as functional ingredients. *Food and Bioprocess Technology*, 11(8), 1439–1463. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2117-2>
- Gazala, K., Masoodi, F. A., Masarat, H. D., Rayees, B., & Shoib, M. W. (2017). Extraction and characterisation of pectin from two apple juice concentrate processing plants. *International Food Research Journal*, 24(2), 594–599.
- Gerke, I. B. B., Hamerski, F., de Paula Scheer, A., & da Silva, V. R. (2018). Solid–liquid extraction of bioactive compounds from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves: Experimental study, kinetics and modeling. *Journal of Food Process Engineering*, 41(8), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12892>
- Gesek, J., Jakimiuk, K., Atanasov, A. G., & Tomczyk, M. (2021). Sanguinins—promising molecules with broad biological potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312972>
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Ghasemzadeh, A., & Jaafar, H. Z. E. (2014). Optimization of reflux conditions for total flavonoid and total phenolic extraction and enhanced antioxidant capacity in Pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) using response surface methodology. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 523120. <https://doi.org/10.1155/2014/523120>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Afrin, S., Bompadre, S., Rubini, C., Zizzi, A., Astolfi, P., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2016). Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.003>
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J., Quiles, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Giltekin-Özgiiven, M., Berktaş, I., & Özçelik, B. (2016). Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>
- Giroto, F., Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, 45, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.008>
- Glaucus, R., Case, B., Lizcano, S. C., Dávila, J. A., & Hernández, V. (2019). *Rubus glaucus* benth). In *production and management of Beverages* (Elsevier). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00005-5>
- Gómez-Fernández, A. R., Santacruz, A., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2021). The complex relationship between metabolic syndrome and sweeteners. *Journal of Food Science*, 86(5), 1511–1531. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15709>
- Gómez-Maqueo, A., Antunes-Ricardo, M., Welte-Chanes, J., & Cano, M. P. (2020).

- Digestive stability and bioaccessibility of antioxidants in prickly pear fruits from the Canary Islands: Healthy foods and ingredients. *Antioxidants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/antiox9020164>
- Gonçalves, J., Ramos, R., Luís, Â., Rocha, S., Rosado, T., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2019). Assessment of the Bioaccessibility and Bioavailability of the Phenolic Compounds of *Prunus avium* L. by in Vitro Digestion and Cell Model. *ACS Omega*, 4(4), 7605–7613. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03499>
- Goni, I., & Hervert-Hernandez, D. (2011). By-Products from Plant Foods are Sources of Dietary Fibre and Antioxidants. *Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health*, December 2011. <https://doi.org/10.5772/27923>
- González-Centeno, M. R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., & Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.027>
- Goula, A. M., Ververi, M., Adamopoulou, A., & Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.07.022>
- Green, S. J., Scheller, L. F., Marletta, M. A., Seguin, M. C., Klotz, F. W., Slayter, M., Nelson, B. J., & Nacy, C. A. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters*, 43(1–2), 87–94. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(94\)00158-8](https://doi.org/10.1016/0165-2478(94)00158-8)
- Grochowski, D. M., Skalicka-Woźniak, K., Orhan, I. E., Xiao, J., Locatelli, M., Piwowarski, J. P., Granica, S., & Tomczyk, M. (2017). A comprehensive review of agrimoniin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401(1), 166–180. <https://doi.org/10.1111/nyas.13421>
- Guan, Y., Hu, W., Jiang, A., Xu, Y., Zhao, M., Yu, J., Ji, Y., Sarengaowa, Yang, X., & Feng, K. (2020). The effect of cutting style on the biosynthesis of phenolics and cellular antioxidant capacity in wounded broccoli. *Food Research International*, 137(April), 109565. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109565>
- Guan, Y., Hu, W., Xu, Y., Sarengaowa, Ji, Y., Yang, X., & Feng, K. (2021a). Proteomic analysis validates previous findings on wounding-responsive plant hormone signaling and primary metabolism contributing to the biosynthesis of secondary metabolites based on metabolomic analysis in harvested broccoli (*Brassica oleracea* L. var. i. *Food Research International*, 145(October 2020), 110388. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110388>
- Guan, Y., Hu, W., Xu, Y., Yang, X., Ji, Y., Feng, K., & Sarengaowa. (2021b). Metabolomics and physiological analyses validates previous findings on the mechanism of response to wounding stress of different intensities in broccoli. *Food Research International*, 140(December 2020), 110058. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110058>
- Guandalini, B. B. V., Rodrigues, N. P., & Marczak, L. D. F. (2019). Sequential extraction of phenolics and pectin from mango peel assisted by ultrasound. *Food Research International*, 119, 455–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.011>
- Guiné, R., Correia, P., Ferrão, A., Gonçalves, F., Lerat, C., El-Idrissi, T., & Rodrigo, E. (2020). Evaluation of phenolic and antioxidant properties of strawberry as a function of extraction conditions. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23.

<https://doi.org/10.1590/1981-6723.14219>

- Gündüz, K. (2015). Strawberry: Phytochemical Composition of Strawberry (*Fragaria × ananassa*). In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00030-1>
- Guo, J., & Wang, M. H. (2010). Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis and PAL expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Growth Regulation*, 62(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9472-y>
- Guyot, S., Le Bourvellec, C., Marnet, N., & Drilleau, J. F. (2002). Procyanidins are the most Abundant Polyphenols in Dessert Apples at Maturity. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 289–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/food.2001.0843>
- Güzel, M., & Akpınar, Ö. (2019). Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. *Food and Bioprocess Technology*, 115, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.03.009>
- Gyula, P., Schäfer, E., & Nagy, F. (2003). Light perception and signalling in higher plants. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 6, Issue 5, pp. 446–452). [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00082-7)
- Hanhineva, K., Rogachev, I., Kokko, H., Mintz-Oron, S., Venger, I., Kärenlampi, S., & Aharoni, A. (2008). Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria × ananassa*) flowers. *Phytochemistry*, 69(13), 2463–2481. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.07.009>
- Harbourne, N., Marete, E., Jacquier, J. C., & O’Riordan, D. (2013). Stability of phytochemicals as sources of anti-inflammatory nutraceuticals in beverages - A review. In *Food Research International* (Vol. 50, Issue 2, pp. 480–486). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.009>
- Harlid, S., Myte, R., & Van Guelpen, B. (2017). The Metabolic Syndrome, Inflammation, and Colorectal Cancer Risk: An Evaluation of Large Panels of Plasma Protein Markers Using Repeated, Prediagnostic Samples. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4803156>
- He, Q., & Luo, Y. (2007). Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce. *Stewart Postharvest Review*, 3, 1–7. <https://doi.org/10.2212/spr.2007.6.3>
- He, X., & Liu, R. H. (2008). Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9905–9910. <https://doi.org/10.1021/jf8015255>
- Helsper, J. P. F. G., De Vos, C. H. R., Maas, F. M., Jonker, H. H., Van Den Broeck, H. C., Jordi, W., Pot, C. S., Keizer, L. C. P., & Schapendonk, A. H. C. M. (2003). Response of selected antioxidants and pigments in tissues of *Rosa hybrida* and *Fuchsia hybrida* to supplemental UV-A exposure. *Physiologia Plantarum*, 117(2), 171–178. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00037.x>
- Henríquez, C., Córdova, A., Almonacid, S., & Saavedra, J. (2014). Kinetic modeling of phenolic compound degradation during drum-drying of apple peel by-products. *Journal of Food Engineering*, 143, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.037>
- Heras-Ramírez, M. E., Quintero-Ramos, A., Camacho-Dávila, A. A., Barnard, J., Talamás-Abbud, R., Torres-Muñoz, J. V., & Salas-Muñoz, E. (2012). Effect of Blanching and Drying Temperature on Polyphenolic Compound Stability and Antioxidant Capacity of Apple Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2201–2210. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0583-x>

- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2012). Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 4, 159–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00132-0>
- Hidalgo, G.-I., & Almajano, M. (2017). Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. *Antioxidants*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>
- Hidayat, N., Yati, K., Krisanti, E., & Gozan, M. (2019). Extraction and antioxidant activity test of black Sumatran incense. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2193). <https://doi.org/10.1063/1.5139354>
- Hill, G. D. (2003). PLANT ANTINUTRITIONAL FACTORS | Characteristics. In B. B. T.-E. of F. S. and N. (Second E. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (second, pp. 4578–4587). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01318-3>
- Hoffmann, J., Casetti, F., Bullerkotte, U., Haarhaus, B., Vagedes, J., Schempp, C. M., & Wölflé, U. (2016). Anti-inflammatory effects of agrimoniin-enriched fractions of *Potentilla erecta*. *Molecules*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060792>
- Hollá, M., Pilařová, V., Švec, F., & Sklenářová, H. (2023). Green Solvents in the Extraction of Bioactive Compounds from Dried Apple Cultivars. *Foods*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/foods12040893>
- Hou, D.-X., Yanagita, T., Uto, T., Masuzaki, S., & Fujii, M. (2005). Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure–activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical Pharmacology*, 70(3), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.003>
- Hu, W., Guan, Y., Wang, Y., & Yuan, N. (2023). Effect of Wounding Intensity on Edible Quality by Regulating Physiological and ROS Metabolism in Fresh-Cut Pumpkins. *Horticulturae*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040512>
- Huaman-Castilla, N. L., Martínez-Cifuentes, M., Camilo, C., Pedreschi, F., Mariotti-Celis, M., & Pérez-Correa, J. R. (2019). The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on Carménère pomace extracts. *Molecules*, 24(17), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24173145>
- Ibanez, F., Bang, W. Y., Lombardini, L., & Cisneros-Zevallos, L. (2019). Solving the controversy of healthier organic fruit: Leaf wounding triggers distant gene expression response of polyphenol biosynthesis in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*). *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55033-w>
- INTA. (2019). *BIOETHANOL CARBON FOOTPRINT INTEGRATED 2019 REPORT Bioethanol carbon footprint* (Vol. 2).
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Istuk, J., & Jakobek, L. (2021). Determination of polyphenols bioaccessibility by in vitro gastrointestinal digestion of apple pee. *Food in Health and Disease, Scientific-Professional Journal of Nutrition and Dietetics*, 10(202 1), 45–52.
- Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M., Gao, M. Y., Shirley, R. B., Stoffel, M. T., Kumar, M. V., & Mohnen, D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 17(8), 805–819. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm054>

- Jacobo-Velázquez, D. A. (2022). Definition of Biofortification Revisited. In *ACS Food Science and Technology* (Vol. 2, Issue 5, pp. 782–783). <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00110>
- Jacobo-Velázquez, D. A., González-Aguëro, M., & Cisneros-Zevallos, L. (2015). Cross-talk between signaling pathways: The link between plant secondary metabolite production and wounding stress response. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08608>
- Jacobo-Velázquez, D. A., Moreira-Rodríguez, M., & Benavides, J. (2022). UVA and UVB Radiation as Innovative Tools to Biofortify Horticultural Crops with Nutraceuticals. *Horticulturae*, 8(5), 387. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050387>
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., S, T., Jokic, S., Velic, D., Bilic, M., Ana Bucic-Kojic, Planinic, M., & Tomas, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(3), 206–212.
- Joshi, D. R., & Adhikari, N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, June, 1–18. <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v28i330203>
- Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Belščak Cvitanović, A., Valinger, D., Jurina, T., & Gajdoš Kljusurić, J. (2016). Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from Asteraceae plants. *Industrial Crops and Products*, 91, 205–214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.015>
- Kaeswurm, J. A. H., Burandt, M. R., Mayer, P. S., Straub, L. V., & Buchweitz, M. (2022). Bioaccessibility of Apple Polyphenols from Peel and Flesh during Oral Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(14), 4407–4417. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c08130>
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 169e188-188. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.006>
- Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., Van Camp, J., & Capanoglu, E. (2015). Influence of different processing and storage conditions on in vitro bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. *Food Chemistry*, 186, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.046>
- Kang, H. M., & Saltveit, M. E. (2002). Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7536–7541. <https://doi.org/10.1021/jf020721c>
- Karlińska, E., Masny, A., Cieślak, M., Macierzyński, J., Pecio, Ł., Stochmal, A., & Kosmala, M. (2021). Ellagitannins in roots, leaves, and fruits of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) vary with developmental stage and cultivar. *Scientia Horticulturae*, 275(May 2020). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109665>
- Kasikci, M. B., & Bagdatlioglu, N. (2016). Bioavailability of quercetin. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 4(SpecialIssue2), 146–151. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.20>
- Kaur, J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>

- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Khanal, R. C., Howard, L. R., Brownmiller, C. R., & Prior, R. L. (2009). Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science*, 74(2), H52-8. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01063.x>
- Kimmel, E. M., Jerome, M., Holderness, J., Snyder, D., Kemoli, S., Jutila, M. A., & Hedges, J. F. (2011). Oligomeric procyanidins stimulate innate antiviral immunity in dengue virus infected human PBMCs. *Antiviral Research*, 90(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.02.011>
- Kingori, S. M., Ochanda, S. O., & Koech, R. K. (2021). Variation in Levels of Flavonols Myricetin, Quercetin and Kaempferol — In Kenyan Tea (*Camellia sinensis* L.) with Processed Tea Types and Geographic Location. *Open Journal of Applied Sciences*, 11, 736–749. <https://doi.org/10.4236/ojapps.2021.116054>
- Koch, W., Baj, T., Kukula-Koch, W., & Marzec, Z. (2015). Dietary intake of specific phenolic compounds and their effect on the antioxidant activity of daily food rations. *Open Chemistry*, 13(1), 869–876. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0100>
- Kong, J.-Q. (2015). Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. *RSC Advances*, 5(77), 62587–62603. <https://doi.org/10.1039/C5RA08196C>
- Krygowski, T. M., Wrona, P. K., Zielkowska, U., & Reichardt, C. (1985). Empirical parameters of lewis acidity and basicity for aqueous binary solvent mixtures. *Tetrahedron*, 41(20), 4519–4527. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)82346-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)82346-2)
- Kschonsek, J., Wolfram, T., Stöckl, A., & Böhm, V. (2018). Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the in vitro antioxidant capacity. *Antioxidants*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/antiox7010020>
- Kumar, A., & Chauhan, G. S. (2010). Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.001>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 70, p. 105325). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Kumar, S., Ozukum, R., & Mathad, G. (2020). Extraction, characterization and utilization of pectin from apple peels. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Vol. 9, Is, 2599–2604. <https://doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i5aj.12736>
- Ky, I., Le Floch, A., Zeng, L., Pechamat, L., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2016). *Tannins* (B. Caballero, P. M. Finglas, & F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá (eds.); pp. 247–255). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8>
- Ky, I., Le Floch, A., Zeng, L., Pechamat, L., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2015). Tannins. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 247–255). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00683-8>

- Lachowicz, S., Oszmiański, J., Rapak, A., & Ochmian, I. (2020). Profile and content of phenolic compounds in leaves, flowers, roots, and stalks of *sanguisorba officinalis* L. Determined with the LC-DAD-ESI- QTOF-MS/MS analysis and their in vitro antioxidant, antidiabetic, antiproliferative potency. *Pharmaceuticals*, 13(8), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ph13080191>
- Lajoie, L., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2022). Water as Green Solvent: Methods of Solubilisation and Extraction of Natural Products—Past, Present and Future Solutions. *Pharmaceuticals*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/ph15121507>
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>
- Lang, Y., Li, B., Gong, E., Shu, C., Si, X., Gao, N., Zhang, W., Cui, H., & Meng, X. (2021). Effects of α -casein and β -casein on the stability, antioxidant activity and bioaccessibility of blueberry anthocyanins with an in vitro simulated digestion. *Food Chemistry*, 334(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127526>
- Lante, A., Tinello, F., & Nicoletto, M. (2016). UV-A light treatment for controlling enzymatic browning of fresh-cut fruits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.029>
- Łata, B., Trampczynska, A., & Paczesna, J. (2009). Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*, 121(2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.038>
- Lee, J., Jung, E., Lee, J., Kim, S., Huh, S., Kim, Y., Kim, Y., Byun, S. Y., Kim, Y. S., & Park, D. (2009). Isorhamnetin represses adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Obesity*, 17(2), 226–232. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.472>
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219–232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
- Lim, Y. J., Lyu, J. II, Kwon, S. J., & Eom, S. H. (2021). Effects of UV-A radiation on organ-specific accumulation and gene expression of isoflavones and flavonols in soybean sprout. *Food Chemistry*, 339(August 2020), 128080. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128080>
- Lin, D., Xia, J., & Wan, S. (2010). Climate warming and biomass accumulation of terrestrial plants: a meta-analysis. *New Phytologist*, 188(1), 187–198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03347.x>
- Liu, Y., Shi, J., & Langrish, T. A. G. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*, 120(3), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.02.015>
- Loconsole, D., & Santamaria, P. (2021). UV Lighting in Horticulture: A Sustainable Tool for Improving Production Quality and Food Safety. In *Horticulturae* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7010009>
- Lončarić, A., Matanović, K., Ferrer, P., Kovač, T., Šarkanj, B., Babojelić, M. S., & Lores, M. (2020). Peel of traditional apple varieties as a great source of bioactive compounds: Extraction by micro-matrix solid-phase dispersion. *Foods*, 9(1), 4–6. <https://doi.org/10.3390/foods9010080>
- Lopez-Corona, A. V., Valencia-Espinosa, I., González-Sánchez, F. A., Sánchez-López, A. L., Garcia-Amezquita, L. E., & Garcia-Varela, R. (2022). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries

- (*Rubus idaeus*): A General Review. *Antioxidants*, 11(6).
<https://doi.org/10.3390/antiox11061192>
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurements by Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 266–275.
- Lucas González, R. (2017). Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. *Revista Doctorado UMH*, 2(2), 5.
<https://doi.org/10.21134/doctumh.v2i2.1278>
- Luo, S., Chen, R., Huang, L., Liang, R., Liu, C., & Chen, J. (2017). Investigation on the influence of pectin structures on the pasting properties of rice starch by multiple regression. *Food Hydrocolloids*, 63, 580–584.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.016>
- Lurie, S., & Pedreschi, R. (2014). Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research*, 1, 14030. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.30>
- Madani, B., Shekari, A. M., & Imahori, Y. (2018). Physiological responses to stress. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00020-8>
- Maina, S., Kachrimanidou, V., & Koutinas, A. (2017). A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. In *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (Vol. 8, pp. 18–23). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.07.007>
- Manasa S, L., Panigrahy, M., Panigrahi, K. C. S., & Rout, G. R. (2022). Overview of Cold Stress Regulation in Plants. *The Botanical Review*, 88(3), 359–387.
<https://doi.org/10.1007/s12229-021-09267-x>
- Maran, J. P., Priya, B., Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., Moorthy, I. G., & Sivarajasekar, N. (2017). Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of *Musa balbisiana*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 204–209.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.09.019>
- Mariadoss, A. V. A., Vinyagam, R., Rajamanickam, V., Sankaran, V., Venkatesan, S., & David, E. (2019). Pharmacological Aspects and Potential Use of Phloretin: A Systemic Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(13), 1060–1067.
<https://doi.org/10.2174/1389557519666190311154425>
- Mariz-Ponte, N., Martins, S., Gonçalves, A., Correia, C. M., Ribeiro, C., Dias, M. C., & Santos, C. (2019). The potential use of the UV-A and UV-B to improve tomato quality and preference for consumers. *Scientia Horticulturae*, 246(November 2018), 777–784.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.058>
- Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J. J., Watson, N. J., Ruiz-López, I. I., Che-Galicia, G., & Corona-Jiménez, E. (2020). Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food and Bioproducts Processing*.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.011>
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.099>
- Mason, T. J. (2007). Sonochemistry and the environment - Providing a “green” link between chemistry, physics and engineering. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(4), 476–483.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.10.008>

- Massini, L., Rico, D., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2016). Apple peel flavonoids as natural antioxidants for vegetable juice applications. *European Food Research and Technology*, 242(9), 1459–1469. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2646-8>
- Massolo, J. F., Concellón, A., Chaves, A. R., & Vicente, A. R. (2011). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 59(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.08.007>
- Mendoza Vargas, L., Jiménez Forero, J., & Ramírez Niño, M. (2017). Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cáscaras del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 20(1), 131–138. <https://doi.org/10.31910/rudca.v20.n1.2017.70>
- Mercado-Mercado, G., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2018). Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from mango (*Mangifera indica* L. 'Ataulfo') by-products on in vitro bioaccessibility. *Food Bioscience*, 21(January), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.012>
- Mieszczakowska-Frąc, M., Dyki, B., & Konopacka, D. (2016). Effects of Ultrasound on Polyphenol Retention in Apples After the Application of Predrying Treatments in Liquid Medium. *Food and Bioprocess Technology*, 9(3), 543–552. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1648-z>
- Migues, I., Baenas, N., Gironés-Vilaplana, A., Cesio, M. V., Heinzen, H., & Moreno, D. A. (2018). Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) Samples Collected in Different Uruguayan Locations. *Foods*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/foods7050067>
- Milić, P. S., Rajković, K. M., Stamenković, O. S., & Veljković, V. B. (2013). Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 20, Issue 1, pp. 525–534). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.017>
- Ministerio de economía. (2023). *Pera Y Manzana*. www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sagyp-pera_y_manzana_situacion_2023_01.pdf
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., & Rosselló, C. (2014). Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, 106(1), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.013>
- Montero, L., Herrero, M., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2013). Profiling of phenolic compounds from different apple varieties using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1313, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.015>
- Morales, L. O., Tegelberg, R., Brosché, M., Keinänen, M., Lindfors, A., & Aphalo, P. J. (2010). Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiology*, 30(7), 923–934. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq051>
- Morata, A., González, C., Tesfaye, W., Loira, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Maceration and Fermentation: New Technologies to Increase Extraction. *Red Wine Technology*, 35–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00003-7>
- Mordi, R. C., Fadiaro, A. E., Owoeye, T. F., Olanrewaju, I. O., Uzoamaka, G. C., & Olorunshola, S. J. (2016). Identification by GC-MS of the components of oils of banana

- peels extract, phytochemical and antimicrobial analyses. *Research Journal of Phytochemistry*, 10(1), 39–44. <https://doi.org/10.3923/rjphyto.2016.39.44>
- Moreira-Rodríguez, M., Nair, V., Benavides, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2017). UVA, UVB light doses and harvesting time differentially tailor glucosinolate and phenolic profiles in broccoli sprouts. *Molecules*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/molecules22071065>
- Moreno-García, K. L., Antunes-Ricardo, M., Martínez-Ávila, M., Milán-Carrillo, J., & Guajardo-Flores, D. (2022). Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antihyperglycemic activities of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by-product extracts obtained by supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 183, 105560. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105560>
- Moreno-González, M., & Ottens, M. (2021). A Structured Approach to Recover Valuable Compounds from Agri-food Side Streams. In *Food and Bioprocess Technology* (Vol. 14, Issue 8, pp. 1387–1406). <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02647-6>
- Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., & Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72(2), 338–344. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>
- Moschona, A., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2018). Encapsulation of biological active phenolic compounds extracted from wine wastes in alginate-chitosan microbeads. *Journal of Microencapsulation*, 35(3), 229–240. <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1462415>
- Mourtzinou, I., & Goula, A. (2019). Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste. In *Polyphenols in Plants* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00002-5>
- Mozaffarian, D. (2022). Perspective: Obesity - An unexplained epidemic. *American Journal of Clinical Nutrition*, 115(6), 1445–1450. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqac075>
- Mudnic, I., Modun, D., Brizic, I., Vukovic, J., Generalic, I., Katalinic, V., Bilusic, T., Ljubenkov, I., & Boban, M. (2009). Cardiovascular effects in vitro of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves. *Phytomedicine*, 16(5), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.11.004>
- Mukherjee, P. K. (2019). Chapter 6 - Extraction and Other Downstream Procedures for Evaluation of Herbal Drugs (P. K. B. T.-Q. C. and E. of H. D. Mukherjee (ed.); pp. 195–236). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00006-5>
- Müller, A., Noack, L., Greiner, R., Stahl, M. R., & Posten, C. (2014). Effect of UV-C and UV-B treatment on polyphenol oxidase activity and shelf life of apple and grape juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.05.014>
- Munekata, P. E. S., Alcántara, C., Žugčić, T., Abdelkebir, R., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Jambrak, A. R., Gavahian, M., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2020). Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. *Food Research International*, 134, 109242. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109242>
- Muzolf-Panek, M., Kaczmarek, A., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2021). A predictive approach to the antioxidant capacity assessment of green and black tea infusions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 1422–1436. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00727-3>

- Nakajima, V. M., Moala, T., Caria, C. R. e. P., Moura, C. S., Amaya-Farfan, J., Gambero, A., Macedo, G. A., & Macedo, J. A. (2017). Biotransformed citrus extract as a source of anti-inflammatory polyphenols: Effects in macrophages and adipocytes. *Food Research International*, 97, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.034>
- Nguyen, C. T. T., Kim, J., Yoo, K. S., Lim, S., & Lee, E. J. (2014). Effect of prestorage UV-A, -B, and -C radiation on fruit quality and anthocyanin of “Duke” blueberries during cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(50), 12144–12151. <https://doi.org/10.1021/jf504366x>
- Niazi, S., Hashemabadi, S. H., & Noroozi, S. (2014). NUMERICAL SIMULATION OF OPERATIONAL PARAMETERS AND SONOREACTOR CONFIGURATIONS FOR THE HIGHEST POSSIBILITY OF ACOUSTIC CAVITATION IN CRUDE OIL. *Chemical Engineering Communications*, 201(10), 1340–1359. <https://doi.org/10.1080/00986445.2013.808999>
- Nollet, L., & Gutierrez-Urbe, J. (2017). *Phenolic Compounds in Food Characterization and Analysis* (CRC press). Taylor & Francis. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781315120157>
- Nowicka, A., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., & Fecka, I. (2019). Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch. *Food Chemistry*, 270(July 2018), 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.015>
- Oliveira, T. Í. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Pereira, P. H. F., Moates, G. K., Wellner, N., Mazzetto, S. E., Waldron, K. W., & Azeredo, H. M. C. (2016). Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry*, 198, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.080>
- Olivero-David, R., Ruiz-Roso, M. B., Caporaso, N., Perez-Olleros, L., De las Heras, N., Lahera, V., & Ruiz-Roso, B. (2018). In vivo bioavailability of polyphenols from grape by-product extracts, and effect on lipemia of normocholesterolemic Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5581–5590. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9100>
- Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Vree, T. B., & Katan, M. B. (2000). Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *Journal of Nutrition*, 130(5), 1200–1203. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1200>
- Ortega-Hernández, E., Nair, V., Serrano-Sandoval, S. N., Welte-Chanes, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2020). Wounding and UVB light synergistically induce the postharvest biosynthesis of indicaxanthin and betanin in red prickly pears. *Postharvest Biology and Technology*, 167, 111247. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111247>
- Ortega-Hernández, E., Nair, V., Welte-Chanes, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). Wounding and UVB light synergistically induce the biosynthesis of phenolic compounds and ascorbic acid in red prickly pears (*Opuntia ficus-indica* cv. Rojo Vigor). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms20215327>
- Ortega-Hernández, E., Welte-Chanes, J., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2018). Effects of UVB Light, Wounding Stress, and Storage Time on the Accumulation of Betalains, Phenolic Compounds, and Ascorbic Acid in Red Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica* cv. Rojo Vigor). *Food and Bioprocess Technology*, 11(12), 2265–2274. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2183-5>
- Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O.

- M., & Gallegos-Infante, J. A. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *TecnoLógicas*, 24(52), e1962. <https://doi.org/10.22430/22565337.1962>
- Pacheco-Ordaz, R., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J., & González-Aguilar, G. (2018). Intestinal Permeability and Cellular Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Mango (*Mangifera indica* cv. Ataulfo) Peels. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 514. <https://doi.org/10.3390/ijms19020514>
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., & McHugh, T. H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 1249–1257. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.01.005>
- Panadare, D., & Rathod, V. K. (2018). Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14(February), 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.010>
- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- Pap, N., Fidelis, M., Azevedo, L., do Carmo, M. A. V., Wang, D., Mocan, A., Pereira, E. P. R., Xavier-Santos, D., Sant'Ana, A. S., Yang, B., & Granato, D. (2021). Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. *Current Opinion in Food Science*, 42, 167–186. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.06.003>
- Paśko, P., Tyszcza-Czochara, M., Namieśnik, J., Jastrzębski, Z., Leontowicz, H., Drzewiecki, J., Martínez-Ayala, A. L., Nemirovski, A., Barasch, D., & Gorinstein, S. (2019). Cytotoxic, antioxidant and binding properties of polyphenols from the selected gluten-free pseudocereals and their by-products: In vitro model. *Journal of Cereal Science*, 87(April), 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.04.009>
- Patel, K., Panchal, N., & Ingle, P. (2019). Techniques Adopted for Extraction of Natural Products Extraction Methods: Maceration, Percolation, Soxhlet Extraction, Turbo distillation, Supercritical Fluid Extraction. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 6(4), 1–12. <https://doi.org/10.20431/2349-0403.0604001>
- Peleg, M. (1988). An Empirical Model for the Prediction. *Journal of Food Science*, 53(4), 1216–1217.
- Perez, E. E., Carelli, A. A., & Crapiste, G. H. (2011). Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.025>
- Perussello, C. A., Zhang, Z., Marzocchella, A., & Tiwari, B. K. (2017). Valorization of Apple Pomace by Extraction of Valuable Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 776–796. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12290>
- Petigny, L., Périno-Issartier, S., Wajsman, J., & Chemat, F. (2013). Batch and continuous ultrasound assisted extraction of boldo leaves (*Peumus boldus* Mol.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5750–5764. <https://doi.org/10.3390/ijms14035750>
- Piagentini, A. M., & Pirovani, M. E. (2017). Total Phenolics Content, Antioxidant Capacity, Physicochemical Attributes, and Browning Susceptibility of Different Apple Cultivars for Minimal Processing. *International Journal of Fruit Science*, 17(1), 102–116. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1262304>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Bourvellec, C. Le, Renard, C. M. G. C., & Chemat, F.

- (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.026>
- Piwowski, J. P., Kiss, A. K., Granica, S., & Moeslinger, T. (2015). Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(11), 2168–2177. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500264>
- Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S., Dhulster, P., & Dimitrov, K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.001>
- Priefer, C., Jörisen, J., & Bräutigam, K. R. (2016). Food waste prevention in Europe - A cause-driven approach to identify the most relevant leverage points for action. In *Resources, Conservation and Recycling* (Vol. 109, pp. 155–165). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2016.03.004>
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo, J. M., & Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes - A review. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>
- Rabelo, M. C., Bang, W. Y., Nair, V., Alves, R. E., Jacobo-Velázquez, D. A., Sreedharan, S., de Miranda, M. R. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2020). UVC light modulates vitamin C and phenolic biosynthesis in acerola fruit: role of increased mitochondria activity and ROS production. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78948-1>
- Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry*, 220, 115–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.207>
- Rai, N., Morales, L. O., & Aphalo, P. J. (2021). Perception of solar UV radiation by plants: photoreceptors and mechanisms. *Plant Physiology*, 186(3), 1382–1396. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAB162>
- Rajha, H. N., Ziegler, W., Louka, N., Hobai, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, H. G., & Maroun, R. G. (2014). Effect of the drying process on the intensification of phenolic compounds recovery from grape pomace using accelerated solvent extraction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18640–18658. <https://doi.org/10.3390/ijms151018640>
- Rammohan, A., Reddy, J. S., Sravya, G., Rao, C. N., & Zyryanov, G. V. (2020). Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 433–458. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00959-w>
- Rana, R., & Gulliya, B. (2019). Chemistry and Pharmacology of Flavonoids- A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53, 8–20. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.1.3>
- Raudone, L., Raudonis, R., Liaudanskas, M., Janulis, V., & Viskelis, P. (2017). Phenolic antioxidant profiles in the whole fruit, flesh and peel of apple cultivars grown in Lithuania. *Scientia Horticulturae*, 216, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.005>
- Ravanfar, R., Moein, M., Niakousari, M., & Tamaddon, A. (2018). Extraction and

- fractionation of anthocyanins from red cabbage: ultrasonic-assisted extraction and conventional percolation method. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2271–2277. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9844-y>
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2018). A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresource Technology*, 248, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>
- Redondo-Gómez, S. (2013). Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants. In *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 1–20). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0807-5_1
- Reichardt, C., & Welton, T. (2010). Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: Fourth Edition. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9783527632220>
- Reyes, L. F., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5296–5300. <https://doi.org/10.1021/jf034213u>
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., & Golmohammadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chemistry*, 173, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.081>
- Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martínez, P. (2019). Influence of pulsed electric fields processing on the bioaccessible and non-bioaccessible fractions of apple phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 59(May), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.041>
- Rios, M. Y., & Olivo, H. F. (2014). *Chapter 3 - Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy* (B. T.-S. in N. P. C. Atta-ur-Rahman (ed.); Vol. 43, pp. 79–121). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00003-5>
- Rodríguez-Arzuaga, M., & Piagentini, A. M. (2018). New antioxidant treatment with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusion for fresh-cut apples: Modeling, optimization, and acceptability. *Food Science and Technology International*, 24(3), 223–231. <https://doi.org/10.1177/1082013217744424>
- Rodríguez-Arzuaga, M., Ríos, G., & Piagentini, A. M. (2019). Mild heat treatments before minimal processing reduce browning susceptibility and increase total phenolic content of low-chill apple cultivars. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(11), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14209>
- Rue, E., Rush, M., & Van Breemen, R. (2018). Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. *Phytochem*, 17(5), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9507-3>. Procyanidins
- Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., Velázquez-De La Cruz, G., Ramírez De León, J. A., & Navarro-Ocaña, A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 159, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>
- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel

- using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
- Sajjadi, B., Raman, A. A. A., & Ibrahim, S. (2015). Influence of ultrasound power on acoustic streaming and micro-bubbles formations in a low frequency sono-reactor: Mathematical and 3D computational simulation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.11.013>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2021). Valorization of carrot pomace: UVC induced accumulation of antioxidant phenolic compounds. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/app112210951>
- Sánchez Riaño, A., Morales, A., Hernández, J., & Barrero, C. (2010). *Artículo de revisión: Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos*. 1, 61–91.
- Sánchez, W., Murillo, E., & Méndez, J. (2010). Antioxidant potential of agroindustrial residues from three high consumption fruits in Tolima. *Scientia et Technica*, 46(46), 138–143.
- Sandhu, A. K., Huang, Y., Xiao, D., Park, E., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. (2016). Pharmacokinetic Characterization and Bioavailability of Strawberry Anthocyanins Relative to Meal Intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), 4891–4899. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00805>
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Marczak, L. D. F., & Tessaro, I. C. (2012). Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*, 100, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.09.004>
- Santana-Gálvez, J., Santacruz, A., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). Postharvest Wounding Stress in Horticultural Crops as a Tool for Designing Novel Functional Foods and Beverages with Enhanced Nutraceutical Content: Carrot Juice as a Case Study. *Journal of Food Science*, 84(5), 1151–1161. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14588>
- Santos-Zea, L., Gutierrez-Urbe, J. A., & Benedito, J. (2021). Effect of Solvent Composition on Ultrasound-Generated Intensity and Its Influence on the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactives from Agave Bagasse (*Agave salmiana*). *Food Engineering Reviews*, 13(3), 713–725. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09260-x>
- Santos, D. I., Faria, D. L., Lourenço, S. C., Alves, V. D., Saraiva, J. A., Vicente, A. A., & Moldão-Martins, M. (2021). Heat treatment and wounding as abiotic stresses to enhance the bioactive composition of pineapple by-products. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/app11094313>
- Sarah, M., Hanum, F., Rizky, M., & Hisham, M. F. (2018). Microwave-assisted extraction of pectin from cocoa peel. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 122(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/122/1/012079>
- Savatović, S. M., Četković, G. S., Dilas, S. M., Tumbas, V. T., Čanadanović-Brunet, J. M., Četojević-Simin, D. D., & Mandić, A. I. (2008). Antioxidant and antiproliferative activity of Granny Smith apple pomace. *Acta Periodica Technologica*, 39, 201–212. <https://doi.org/10.2298/APT0839201S>
- Scarano, P., Sciarrillo, R., Tartaglia, M., Zuzolo, D., & Guarino, C. (2022). Circular economy and secondary raw materials from fruits as sustainable source for recovery and reuse. A review. *Trends in Food Science and Technology*, 122, 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.003>

- Schieber, A., Hilt, P., Endreß, H. U., Rentschler, C., & Carle, R. (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(1), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00087-5)
- Schilmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 369–377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.008>
- Schink, B. Y., Philipp, B., & Müller, J. (2000). Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. *Naturwissenschaften*, 23(2000), 12–23. <https://doi.org/10.1007/s001140050002>
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9329–9339. <https://doi.org/10.1021/jf061750g>
- Serra, A., Macl, A., Romero, M. P., Valls, J., Bladé, C., Arola, L., & Motilva, M. J. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models. *British Journal of Nutrition*, 103(7), 944–952. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992741>
- Serra, S., Anthony, B., Boscolo Sesillo, F., Masia, A., & Musacchi, S. (2021). Determination of Post-Harvest Biochemical Composition, Enzymatic Activities, and Oxidative Browning in 14 Apple Cultivars. *Foods*, 10(1), 186. <https://doi.org/10.3390/foods10010186>
- Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., & Muhlack, R. A. (2019). Mathematical modelling of anthocyanin mass transfer to predict extraction in simulated red wine fermentation scenarios. *Food Research International*, 121, 705–713. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.044>
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2016). Stability of 40 phenolic compounds during ultrasound-assisted extractions (UAE). *AIP Conference Proceedings*, 1755(July 2016). <https://doi.org/10.1063/1.4958517>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods , beverages and spices : Antioxidant activity and health effects –. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Shahidi, S. A. (2022). Effect of solvent type on ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from *Ficaria kochii*: Optimization by response surface methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 163(February), 112981. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112981>
- Shams, K., Abdel-Azim, N., Saleh, I., Hegazy, M. E., El-Missiry, M., & Hammouda, F. (2015). Green technology: Economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7.
- Shi, N., Clinton, S. K., Liu, Z., Wang, Y., Riedl, K. M., Schwartz, S. J., Zhang, X., Pan, Z., & Chen, T. (2015). Strawberry phytochemicals inhibit azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colorectal carcinogenesis in Crj: CD-1 mice. *Nutrients*, 7(3), 1696–1715. <https://doi.org/10.3390/nu7031696>
- Shoji, T., Kobori, M., Shinmoto, H., Yanagida, A., Kanda, T., & Tsushida, T. (2000). Inhibitory Effects of Apple Polyphenols on Differentiation of 3T3-L1 Cells into

- Adipocytes. *Food Science and Technology Research*, 6(2), 119–121. <https://doi.org/10.3136/fstr.6.119>
- Siani, A., Valente, L. M., Nakamura, M., dos Santos, D., Mazzei, J., & do Nascimento, A. (2014). Efficiency and selectivity of triterpene acid extraction from decoctions and tinctures prepared from apple peels. *Pharmacognosy Magazine*, 10(38), 225. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.133236>
- Simeonov, E., Seikova, I., Pentchev, I., & Mintchev, A. (2004). Scale-up of the Solid–Liquid Extraction Using Characteristic Function Technique. *Industrial & Engineering Chemistry Research - IND ENG CHEM RES*, 43. <https://doi.org/10.1021/ie030650m>
- Simirgiotis, M. J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2010). Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.020>
- Simirgiotis, M. J., Theoduloz, C., Caligari, P. D. S., & Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. *Food Chemistry*, 113(2), 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.043>
- Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A., & Rossi J A Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/16/3/144>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0918-1>
- So, G. C., & Macdonald, D. G. (1986). Kinetics of oil extraction from canola (rapeseed). *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 64(1), 80–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cjce.5450640112>
- Song, Y., Ma, B., Guo, Q., Zhou, L., Lv, C., Liu, X., Wang, J., Zhou, X., & Zhang, C. (2022). UV-B induces the expression of flavonoid biosynthetic pathways in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) calli. *Frontiers in Plant Science*, 13(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1079087>
- Sordo, M., Travadelo, M., & Pernuzzi, C. (2017). Evolución del cultivo de frutilla en la provincia de Santa Fe (Argentina) en los últimos 50 años. *Hortintl.Cals.Ncsu.Edu*, 36(90), 13–24. <https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/documents/2017decemberevoluciondelcultivodefrutillaenlaprovinciadesantafeargentinaenlosultimos50anos.pdf>
- Spengler, R. N. (2019). Origins of the apple: The role of megafaunal mutualism in the domestication of *Malus* and rosaceous trees. *Frontiers in Plant Science*, 10(May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00617>
- Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.006>
- Stavrou, I. J., Christou, A., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2018). Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food Chemistry*, 269, 355–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.152>
- Stenmarck, Å., Jensen, C., Quested, T., Moates, G., Buksti, M., Cseh, B., Juul, S., Parry,

- A., Politano, A., Redlingshofer, B., Scherhauser, S., Silvennoinen, K., Soethoudt, H., Zübert, C., & Östergren, K. (2016). Estimates of European food waste levels. In *Fusions EU*.
- Strieder, M. M., Arruda, H. S., Pastore, G. M., & Silva, E. K. (2023). Inulin-type dietary fiber stability after combined thermal, mechanical, and chemical stresses related to ultrasound processing of prebiotic apple beverage. *Food Hydrocolloids*, 139(September 2022), 108489. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108489>
- Sundarraaj, A. A., & Ranganathan, T. V. (2017). A Review -Pectin from Agro and Industrial Waste. *International Journal of Applied Environmental Sciences ISSN*, 12(10), 973–6077. <http://www.ripublication.com>
- Surjadinata, B. B., Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2017). UVA, UVB and UVC light enhances the biosynthesis of phenolic antioxidants in fresh-cut carrot through a synergistic effect with wounding. *Molecules*, 22(4), 1–6. <https://doi.org/10.3390/molecules22040668>
- Swami Handa, S., Singh, S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction Technologies for medicinal and aromatic plants*. International centre for science and high technology.
- Szabo, K., Dulf, F. V., Diaconeasa, Z., & Vodnar, D. C. (2019). Antimicrobial and antioxidant properties of tomato processing byproducts and their correlation with the biochemical composition. *Lwt*, 116(August). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108558>
- Szydłowska-Czerniak, A., & Tułodziecka, A. (2015). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Procedure to Determine Antioxidant Capacity of Rapeseed Cultivars. *Food Analytical Methods*, 8(3), 778–789. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9950-3>
- Takeuchi, T., Pereira, C. G., Braga, M. E., Maróstica, M. R., Leal, P. F., & Meireles, M. A. (2008). Low-Pressure Solvent Extraction (Solid, Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*, 137–218. <https://doi.org/10.1201/9781420062397.ch4>
- Tamminen, J., Holappa, J., Vladimirovich Gradov, D., & Koironen, T. (2022). Scaling up continuous ultrasound-assisted extractor for plant extracts by using spinach leaves as a test material. *Ultrasonics Sonochemistry*, 90(September), 106171. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106171>
- Teoh, L. S., Lasekan, O., Adzahan, N. M., & Hashim, N. (2016). The effect of ultraviolet treatment on enzymatic activity and total phenolic content of minimally processed potato slices. *Journal of Food Science and Technology*, 53(7), 3035–3042. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2275-z>
- Teutenberg, T., Wiese, S., Wagner, P., & Gmehling, J. (2009). High-temperature liquid chromatography. Part II: Determination of the viscosities of binary solvent mixtures-Implications for liquid chromatographic separations. *Journal of Chromatography A*, 1216(48), 8470–8479. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.075>
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Toma, M., Fukutomi, S., Asakura, Y., & Koda, S. (2011). A calorimetric study of energy conversion efficiency of a sonochemical reactor at 500kHz for organic solvents. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.05.005>
- Tomé, A. C., & da Silva, F. A. (2022). Alginate based encapsulation as a tool for the protection of bioactive compounds from aromatic herbs. *Food Hydrocolloids for Health*,

2, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100051>

- Torres-Contreras, A. M., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2014). Plants as biofactories: Stress-induced production of chlorogenic acid isomers in potato tubers as affected by wounding intensity and storage time. *Industrial Crops and Products*, 62, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.018>
- Torres-Contreras, A. M., Nair, V., Senés-Guerrero, C., Pacheco, A., González-Agüero, M., Ramos-Parra, P. A., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2023). Cross-Talk and Physiological Role of Jasmonic Acid, Ethylene, and Reactive Oxygen Species in Wound-Induced Phenolic Biosynthesis in Broccoli. *Plants*, 12(7), 1434. <https://doi.org/10.3390/plants12071434>
- Tysoe, O. (2021). Adipocytes enter the cell cycle in obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 17(12), 705. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00589-9>
- Urango, A. C. M., Strieder, M. M., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2021). Thermosonication process design for recovering bioactive compounds from fennel: A comparative study with conventional extraction techniques. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/app112412104>
- Uthpala, T. G. G., Navaratne, S. B., Thibbotuwawa, A., Jayasinghe, M., & Wanigasinghe, R. S. (2021). Agricultural By-Product Proteins: Emerging Source for Packaging Applications. *International Journal of Food Science and Agriculture*, 5(3), 355–362. <https://doi.org/10.26855/ijfsa.2021.09.003>
- Van de Velde, F., Esposito, D., Grace, M. H., Pirovani, M. E., & Lila, M. A. (2019a). Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. *Food Research International*, 121(September 2018), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.059>
- Van de Velde, F., Esposito, D., Overall, J., Méndez-Galarraga, M. P., Grace, M., Élide Pirovani, M., & Lila, M. A. (2019b). Changes in the bioactive properties of strawberries caused by the storage in oxygen- and carbon dioxide-enriched atmospheres. *Food Science & Nutrition*, May, 2527–2536. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1099>
- Van de Velde, F., Fenoglio, C., Piagentini, A. M., & Pirovani, M. E. (2018). Modeling the Impact of the Type of Cutting and Storage Temperature on the Bioactive Compound Content, Phenylpropanoid Metabolism Enzymes and Quality Attributes of Fresh-Cut Strawberries. *Food and Bioprocess Technology*, 11(1), 96–109. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1996-y>
- Van de Velde, F., Grace, M. H., Esposito, D., Pirovani, M. E., & Lila, M. A. (2016). Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.01.008>
- 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(May), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.05.007>
- Van De Velde, F., Tarola, A., Güemes, D., & Pirovani, M. (2013). Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Camarosa and Selva Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Foods*, 2(2), 120–131. <https://doi.org/10.3390/foods2020120>
- Van der Sluis, A. A., Dekker, M., De Jager, A., & Jongen, W. M. F. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606–3613.

<https://doi.org/10.1021/jf001493u>

- Vanhaelewyn, L., Van Der Straeten, D., De Coninck, B., & Vandenbussche, F. (2020). Ultraviolet Radiation From a Plant Perspective: The Plant-Microorganism Context. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.597642>
- Vasile, M., Bunea, A., Ioan, C. R., Ioan, B. C., Socaci, S., & Viorel, M. (2021). Phytochemical content and antioxidant activity of *Malus domestica* borkh peel extracts. *Molecules*, 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247636>
- Verdaguer, D., Jansen, M. A. K., Llorens, L., Morales, L. O., & Neugart, S. (2017). UV-A radiation effects on higher plants: Exploring the known unknown. In *Plant Science* (Vol. 255, pp. 72–81). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.014>
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Vetal, M. D., Lade, V. G., & Rathod, V. K. (2012). Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* leaves: Kinetics and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 793–798. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.003>
- Villamil-Galindo, E., Van de Velde, F., & Piagentini, A. M. (2020). Extracts from strawberry by-products rich in phenolic compounds reduce the activity of apple polyphenol oxidase. *Lwt*, 133(May), 110097. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110097>
- Villamil-Galindo, E., Van de Velde, F., & Piagentini, A. M. (2021). Strawberry agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds: effect of cultivar on the phenolic profile and the antioxidant capacity. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00416-z>
- Villarreal-García, D., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2016). Plants as biofactories: Postharvest stress-induced accumulation of phenolic compounds and glucosinolates in broccoli subjected to wounding stress and exogenous phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00045>
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Wan, H., Liu, D., Yu, X., Sun, H., & Li, Y. (2015). A Caco-2 cell-based quantitative antioxidant activity assay for antioxidants. *Food Chemistry*, 175, 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.128>
- Wang, B. Q., & Jin, Z. X. (2011). Agrimoniin induced SGC7901 cell apoptosis associated mitochondrial transmembrane potential and intracellular calcium concentration. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3513–3519.
- Wang, N., Xu, H., Jiang, S., Zhang, Z., Lu, N., Qiu, H., Qu, C., Wang, Y., Wu, S., & Chen, X. (2017). MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *The Plant Journal*, 90(2), 276–292. <https://doi.org/10.1111/tpj.13487>
- Warner, R., Wu, B. Sen, MacPherson, S., & Lefsrud, M. (2021). A Review of Strawberry Photobiology and Fruit Flavonoids in Controlled Environments. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12, p. 611893). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.611893>
- Waszkowiak, K., Gliszczyńska-Źwigło, A., Barthet, V., & Skręty, J. (2015). Effect of Extraction Method on the Phenolic and Cyanogenic Glucoside Profile of Flaxseed Extracts and their Antioxidant Capacity. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*,

- 92(11–12), 1609–1619. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2729-x>
- Watkins, C. B., Bowen, J. H., & Walker, V. J. (1989). Assessment of ethylene production by apple cultivars in relation to commercial harvest dates. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 17(4), 327–331. <https://doi.org/10.1080/01140671.1989.10428052>
- Walti-Chanes, J., Morales-de la Peña, M., Jacobo-Velázquez, D. A., & Martín-Belloso, O. (2017). Opportunities and Challenges of Ultrasound for Food Processing: An Industry Point of View. In *Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804581-7.00019-1>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- Winitorn, A., Douglas, P. L., Douglas, S., Pongampai, S., & Teppaitoon, W. (2008). Modeling the extraction of valuable substances from natural plants using solid - Liquid extraction. *Chemical Engineering Communications*, 195(11), 1457–1464. <https://doi.org/10.1080/00986440801967288>
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609–614. <https://doi.org/10.1021/jf020782a>
- Wright, G. D. (2015). *Mathematical Modeling of the Solid-Liquid Extraction of Phenolic-Rich Compounds from Pinus contorta Bark by Mathematical Modeling of the Solid-Liquid Extraction of Phenolic-Rich Compounds from Pinus contorta Bark*. University of Toronto.
- Wu, D., Ma, X., & Tian, W. (2013). Pomegranate husk extract, punicalagin and ellagic acid inhibit fatty acid synthase and adipogenesis of 3T3-L1 adipocyte. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.005>
- Xi, J., He, L., & Yan, L. (2015). Kinetic modeling of pressure-assisted solvent extraction of polyphenols from green tea in comparison with the conventional extraction. *Food Chemistry*, 166, 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.026>
- Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y., & Zhang, R. (2009). Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.023>
- Xiao, X., Song, W., Wang, J., & Li, G. (2012). Microwave-assisted extraction performed in low temperature and in vacuo for the extraction of labile compounds in food samples. *Analytica Chimica Acta*, 712, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.034>
- Xin, F., ChangQing, Y., YuKun, W., QiXia, M., Lei, Y., & XiaoYa, C. (2011). Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Diversity and Resources*, 33(1), 53–64.
- Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L. (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
- Xu, D. P., Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Li, A. N., & Li, H. Bin. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Jatropha integerrima* by response surface methodology. *Molecules*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/molecules21010018>

- Xu, Z., Luo, H., Ji, A., Zhang, X., Song, J., & Chen, S. (2016). Global identification of the full-length transcripts and alternative splicing related to phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza*. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00100>
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>
- Yamada, S., Tsukamoto, S., Huang, Y., Makio, A., Kumazoe, M., Yamashita, S., & Tachibana, H. (2016). Epigallocatechin-3-O-gallate up-regulates microRNA-let-7b expression by activating 67-kDa laminin receptor signaling in melanoma cells. *Scientific Reports*, 6(January), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep19225>
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7320–7329. <https://doi.org/10.1021/jf051333o>
- Yoo, S.-H., Lee, B.-H., Lee, H., Lee, S., Bae, I. Y., Lee, H. G., Fishman, M. L., Chau, H. K., Savary, B. J., & Hotchkiss Jr., A. T. (2012). Structural Characteristics of Pumpkin Pectin Extracted by Microwave Heating. *Journal of Food Science*, 77(11), C1169–C1173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02960.x>
- Yusoff, I. M., Mat Taher, Z., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157(April), 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. In *Journal of Food Biochemistry* (Vol. 44, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>
- Zhang, Y., Seeram, N. P., Lee, R., Feng, L., & Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 670–675. <https://doi.org/10.1021/jf071989c>
- Zhang, Y., Xu, J., Li, R., Ge, Y., Li, Y., & Li, R. (2023). Plants' Response to Abiotic Stress: Mechanisms and Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms241310915>
- Zhang, Z., Poojary, M. M., Choudhary, A., Rai, D. K., & Tiwari, B. K. (2018). Comparison of selected clean and green extraction technologies for biomolecules from apple pomace. *Electrophoresis*, 39(15), 1934–1945. <https://doi.org/10.1002/elps.201800041>
- Zhu, Q., Nakagawa, T., Kishikawa, A., Ohnuki, K., & Shimizu, K. (2015). In vitro bioactivities and phytochemical profile of various parts of the strawberry (*Fragaria × ananassa* var. Amaou). *Journal of Functional Foods*, 13, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.026>
- Ziaedini, A., Jafari, A., & Zakeri, A. (2010). Extraction of antioxidants and caffeine from green tea (*Camelia sinensis*) leaves: Kinetics and modeling. *Food Science and Technology International*, 16(6), 505–510. <https://doi.org/10.1177/1082013210367567>
- Zuorro, A., Iannone, A., & Lavecchia, R. (2019). Water-organic solvent extraction of phenolic antioxidants from brewers' spent grain. *Processes*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/pr7030126>
- Zygler, A., Słomińska, M., & Namieśnik, J. (2012). Soxhlet extraction and new developments such as soxtec. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 2, 65–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00037-5>