



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Uso de compuestos bioactivos obtenidos a partir del subproducto de la elaboración de vino tinto Tannat para el desarrollo de un potencial yogur funcional

Tesis de la Licenciatura en Bioquímica

María Victoria Olt

Tutora: Dra. Alejandra Medrano

Co-tutora: Dra. Adriana Fernández

Laboratorio de Bioactividad y Nanotecnología de Alimentos
Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos
Facultad de Química

Montevideo-Uruguay

2020

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIACIONES	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. PRODUCCIÓN DE VINO TINTO TANNAT EN URUGUAY Y SU COMPOSICIÓN EN POLIFENOLES	8
1.1.1. Uva y vino Tannat.....	8
1.1.2. Procedimiento de elaboración de vino tinto	8
1.1.3. Composición polifenólica del vino tinto Tannat	9
1.2. SUBPRODUCTOS DE LA VINIFICACIÓN	11
1.2.1. Composición del orujo de uva	11
1.2.1.1. Antocianinas como componentes principales en la cáscara de uva....	12
1.3. ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES	13
1.3.1. Estrés oxidativo.....	13
1.3.1.1. Relación del estrés oxidativo con distintas ECNTs	14
1.3.1.2. Agentes para el tratamiento del estrés oxidativo	15
1.3.2. Alimentación y su incidencia en las enfermedades crónicas no transmisibles.....	15
1.4. ALIMENTOS FUNCIONALES	16
1.4.1. Desarrollo de alimentos funcionales	17
1.4.2. Elaboración de yogur y su potencial como alimento funcional	18
1.4.2.1. Procedimiento de elaboración del yogur	18
1.4.2.2. Yogur como alimento funcional	19
1.5. ENCAPSULACIÓN	20
1.5.1. Secado por atomización.....	20
1.5.1.1. Ventajas y desventajas del secado por atomización	21
1.5.1.2. Encapsulación de polifenoles obtenidos por extracción etanólica	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GENERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. PLAN DE TRABAJO	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. MATERIALES	26
4.1.1. Matriz de partida.....	26
4.1.2. Reactivos utilizados	26
4.2. MÉTODOS	26
4.2.1. Preparación de la muestra	26
4.2.1.2. Preparación del extracto	26
4.2.1.3. Preparación de nano-microcápsulas	27
4.2.2. Determinación de humedad	27

4.2.3.	Cuantificación del contenido de polifenoles totales	28
4.2.4.	Determinación de la capacidad antioxidante	28
4.2.4.1.	Método ABTS.....	28
4.2.4.2.	Método ORAC-FL.....	29
4.2.5.	Evaluación del rendimiento	30
4.2.6.	Evaluación de la eficiencia de encapsulación	30
4.2.7.	Proceso de elaboración del yogur	31
4.2.7.1.	Determinación de color del yogur	32
4.2.8.	Estudios de bioaccesibilidad	32
4.2.9.	Análisis estadístico	33
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1.	Evaluación del rendimiento del secado por atomización	34
5.2.	Eficiencia de encapsulación	34
5.3.	Determinación de humedad	35
5.4.	Determinación de contenido de polifenoles totales de las diferentes muestras antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	35
5.5.	Determinación de la capacidad antioxidante	36
5.5.1.	Determinación de la capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los sistemas en polvo	37
5.5.2.	Determinación de la capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los digeridos de los sistemas en polvo.....	38
5.5.3.	Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los yogures	39
5.5.4.	Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los digeridos de los yogures.....	40
5.5.5.	Comparación de la capacidad antioxidante medida por ORAC-FL y ABTS de los sistemas en polvo antes y después de su digestión <i>in vitro</i>	41
5.5.6.	Comparación de la capacidad antioxidante medida por ORAC-FL y ABTS de los yogures antes y después de su digestión <i>in vitro</i>	43
5.6.	Medición de color.....	44
6.	CONCLUSIONES	46
7.	REFERENCIAS	47

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a Alejandra por haberme abierto las puertas del laboratorio, proponerme un proyecto e introducirme en una ciencia que no sabía que existía, la de los alimentos. Ciencia que quiero que me siga asombrando, y aprender de ella.

Agradecerle a Adriana por enseñarme, explicarme y ayudarme. A pesar del año difícil que vivimos, siempre estuvo dispuesta a colaborar con el objetivo de que pudiera sacar la tesis adelante. También gracias por introducirme en la vida del científico y hacerme saber que si uno quiere las cosas terminan saliendo. ¡Gracias Adri!

Mi primer agradecimiento personal va para mi abuelo, que con sus abrazos y su frase “estudiaste, confía en vos” me generaba calma antes de ir a los exámenes. Gracias por el apoyo absoluto siempre y en especial en estos años de carrera. El resto abuelo ya lo sabes.

A mi madre, padre, hermano y abuelas por su apoyo incondicional en todo momento. Por apoyarme desde el día uno que elegí a la Bioquímica como carrera y por estar siempre que dudaba de mí. Gracias, son todo.

A mis amigas de toda la vida Juli, Lu, Sofi y Pau, simplemente gracias por existir.

Agradecerle a la Fcien, por los amigos que me dio. Sin ellos la carrera no hubiese sido la misma, gracias Caro, Magui, Manu, Andy, Tincho, Matelio y Santi por las tardes de estudio, las clases, los festejos y las reuniones.

Para Flo va una mención especial, por ser la primera en acudir en los momentos de crisis, la que me calmó hasta en el minuto antes de entrar al salón a rendir, y con la que estuve días y noches estudiando para los exámenes.

Gracias también a Cami y a Belu, mis amigas de biología, y a nuestro entero verano estudiando biología celular.

ABREVIACIONES

AAPH	2,2'-Azo- bis (2-methylpropionamide) dihydrochloride
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ANOVA	Análisis de varianza
ECNTs	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HAT	Hydrogen atom transfer
INAVI	Instituto Nacional de Vitivinicultura
MSP	Ministerio de Salud Pública
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
RBN	Reglamento Bromatológico Nacional
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SET	Electron transfer
TPC	Contenido de fenoles totales
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-acid
UHT	Ultra-high temperature

RESUMEN

El vino tinto es una de las bebidas alcohólicas más consumidas a nivel mundial. Cuando las uvas son procesadas para producir dicha bebida se generan grandes cantidades de residuos, entre ellos el orujo de uva, el cual está compuesto por cáscaras y semillas, presentando éstas propiedades bioactivas que han sido demostradas ser benéficas para la salud. La gran generación de residuos provenientes de la industria vitivinícola y la presencia en ellos de compuestos bioactivos con funciones biológicas, estimula el desarrollo de productos con la incorporación de los mismos, aplicando el concepto de economía circular. Consecuentemente, el uso de orujo de uva como ingrediente en la formulación de diferentes alimentos puede tener un importante impacto ambiental en la reducción de residuos y la posibilidad de crear productos con alto valor agregado.

El hecho de que el orujo de uva posea propiedades bioactivas se debe principalmente a la presencia de compuestos bioactivos, entre ellos determinados polifenoles como las antocianinas, que entre otras capacidades tienen un alto potencial para actuar como antioxidantes y en consecuencia reducir el estrés oxidativo en el organismo, pudiendo prevenir el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles.

En el presente trabajo se propone utilizar un extracto derivado de la cáscara proveniente del orujo de uva Tannat para el desarrollo de un yogur con potencial como alimento funcional. A su vez, se propone encapsular el extracto mediante secado por atomización, siendo éste una tecnología de encapsulación de fácil escalado a la industria. Dicha encapsulación se realizó con dos materiales encapsulantes distintos con el fin de poder determinar su eficiencia para encapsular los polifenoles del orujo de uva Tannat y protegerlos de las altas temperaturas del proceso de secado por atomización, así como del proceso de elaboración del yogur. Además, se propone evaluar la bioaccesibilidad de dichos compuestos para lo cual se realiza un estudio de simulación digestiva *in vitro* simulando las condiciones del tracto gastrointestinal.

Dentro de los resultados más relevantes obtenidos, se encontró que luego de la digestión *in vitro* el extracto no pierde capacidad antioxidante y las distintas formulaciones de yogures poseen capacidad antioxidante. Se vio que el mayor aporte a la capacidad antioxidante de las formulaciones de los yogures lo genera la proteína hidrolizada que forma parte del material encapsulante del extracto.

En conclusión, el extracto de cáscara proveniente del orujo de uva Tannat encapsulado mediante la tecnología del secado por atomización, e incorporado en una formulación de yogur, parece tener gran potencial como yogur funcional, generando valor agregado a un residuo de la industria vitivinícola uruguaya.

Palabras claves: orujo de uva Tannat; compuestos bioactivos; polifenoles; secado por atomización; encapsulación; capacidad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRODUCCIÓN DE VINO TINTO TANNAT EN URUGUAY Y SU COMPOSICIÓN EN POLIFENOLES

1.1.1. Uva y vino Tannat

Vitis vinifera cv. Tannat es una variedad de uva tinta, introducida en Uruguay en el año 1870 traída desde el sudoeste de Francia. Hoy en día se encuentra muy adaptada a los suelos arcillosos y clima de nuestro país, siendo la variedad de uva responsable de otorgarnos un lugar reconocido en el mundo del vino e incontables premios internacionales. En Uruguay existen 6.144 hectáreas que corresponden a la plantación de uva, de las cuales 1.631 de ellas son destinadas a cultivos de uva Tannat (26.6%). Por año se producen 23.810.851 kg de dicha uva siendo Canelones el principal departamento productor (66,6%), seguido de Montevideo (10,7%). En el presente, Uruguay produce volúmenes de vino tinto Tannat que superan incluso los de su lugar de origen (INAVI, 2019).

1.1.2. Procedimiento de elaboración de vino tinto

El vino tinto es una de las bebidas alcohólicas más consumidas en todo el mundo (Fernández-Fernández et al., 2019), por lo que su proceso de elaboración es algo que se comparte en muchos lugares. Como se esquematiza en la **Figura 1**, el proceso de vinificación comienza con el análisis de la uva para determinar el momento óptimo de la cosecha, luego sigue el proceso de vendimia que consta de la cosecha como tal, la cual en Uruguay se realiza entre los meses de febrero y abril (INAVI, 2019), posteriormente a la vendimia, la materia se transporta desde la vid hasta la bodega, este paso debe realizarse en las mejores condiciones posibles, para evitar el aplastamiento del fruto y que las levaduras presentes en la uva comiencen a fermentar antes de tiempo (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Una vez que las uvas se reciben en las bodegas se realiza una clasificación con el objetivo de eliminar las uvas en mal estado y los pequeños fragmentos de tallos y hojas. La segunda clasificación consta del descobajado, un trabajo realizado por máquinas especiales, el cual consta de separar las uvas del escobajo. A continuación, se realiza la molienda donde los granos de uva se estrujan mediante máquinas trituradoras con el fin de que se rompa la cáscara, y de esta manera extraer la pulpa del interior de la fruta. Finalizada la molienda se obtiene el mosto, el cual consta del jugo de la uva y de los elementos sólidos como las cáscaras y las semillas (Ribereau-Gayon et al., 2006).

El mosto se introduce en unos depósitos a temperatura controlada para que maceren. La maceración es responsable en gran parte de las características visuales, aromáticas y sensoriales de los vinos tintos. En este paso se extraen diversos compuestos fenólicos de la cáscara y de las semillas, como las antocianinas y los taninos, los cuales son responsables del color y de la estructura general de la bebida. Los compuestos que generan el aroma, ciertos compuestos nitrogenados, los polisacáridos, en particular las pectinas, y los minerales también se liberan durante la maceración (Ribereau-Gayon et al., 2006).

La fermentación alcohólica es el proceso que le sigue a la maceración, para ello el mosto se calienta lo más rápido posible a 20°C, y si la fermentación no comienza, se

realiza una inoculación de levaduras. En este paso las levaduras transforman los azúcares de la uva en alcohol, liberando un volumen considerable de gas. El gas alza a las cáscaras hacia arriba, formando lo que se conoce como “sombbrero” y es en ese momento cuando se procede a realizar el remontado, que consta de remojar el sombrero con el mosto de las zonas inferiores para que los componentes lleguen a todas partes. Cuando se finaliza con la fermentación, se realiza el descubado que consta de separar el líquido de la materia sólida, obteniéndose los subproductos de la vinificación por un lado y por otra parte el líquido en el que se realiza una segunda fermentación denominada maloláctica. Dicha fermentación es de suma importancia ya que es la que provoca una reducción de la acidez al vino al proporcionar suavidad ya que consta de la transformación del ácido málico en ácido láctico por efecto de las bacterias lácticas que se encuentran de manera natural en la uva (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Antes del embotellado, el vino debe ser asentado, clarificado y finalmente filtrado. La mayoría del vino tinto se madura en barricas de roble durante unas semanas o varios años, dependiendo de la variedad de uva y el estilo de vino deseado (Beres et al., 2017).

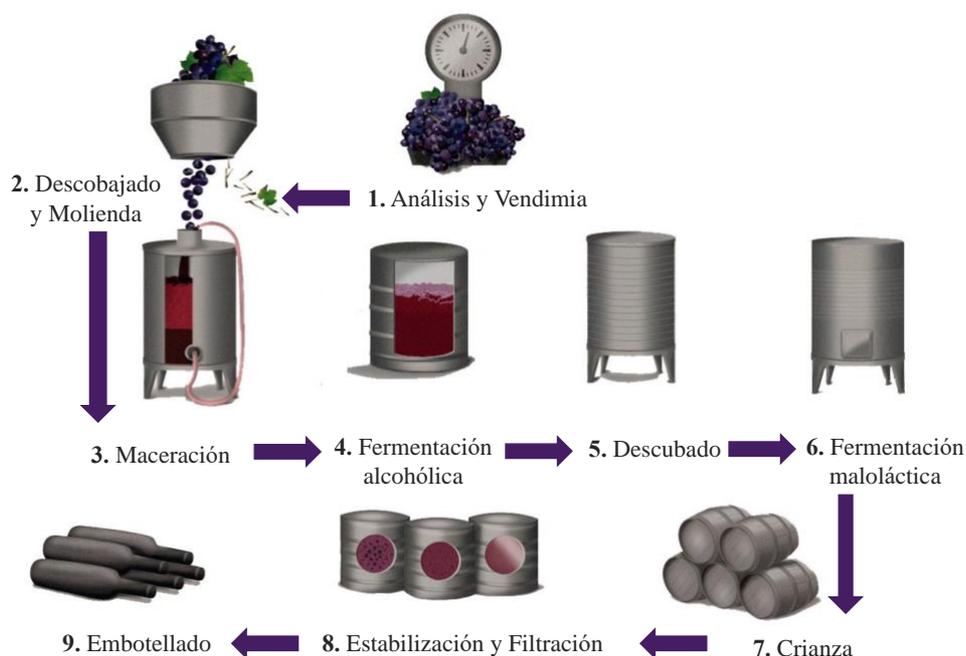


Figura 1. Esquema del proceso de la elaboración del vino tinto Tannat. (1) Análisis de la uva y Vendimia. (2) Descobajado y posterior Molienda. (3) Maceración. (4) Fermentación alcohólica. (5) Descubado. (6) Fermentación maloláctica. (7) Crianza. (8) Estabilización y filtración del vino. (9) Embotellado.

1.1.3. Composición polifenólica del vino tinto Tannat

El vino tinto presenta en su composición más de 600 compuestos fenólicos que son beneficiosos para la salud (Pazzini et al., 2015). En general, los vinos tintos obtenidos a partir de uva Tannat presentan un elevado contenido de compuestos fenólicos (Piccardo & González-Neves, 2013). Dichos compuestos se definen como metabolitos secundarios sintetizados exclusivamente por plantas como mecanismo de señalización y de defensa. Estructuralmente contienen al menos dos anillos fenólicos tal como se muestra en la **Figura 2** y uno o más sustituyentes hidroxilo. Dentro de cada familia que componen a los compuestos fenólicos existen una gran variedad de estructuras, que se diferencian

entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que puedan presentar (Singla et al., 2019).

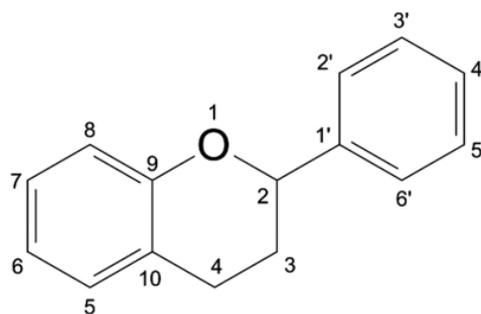


Figura 2. Estructura básica de los compuestos fenólicos. Los anillos normalmente se etiquetan con las letras A, B y C, siendo el anillo heterocíclico el representado con la letra C. El átomo de oxígeno está numerado como primera posición, y los átomos de carbono restantes están numerados de C2 a C10. Extraído de Singla et al. (2019).

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse entre compuestos flavonoides y no flavonoides. Los compuestos no flavonoides que forman parte del vino tinto Tannat son determinados ácidos fenólicos, principalmente el ácido cafeico y el ácido gálico (Pazzini et al., 2015). Los derivados del ácido hidroxicinámico, como es el ácido cafeico, se encuentran como ésteres con ácido tartárico, mientras que los derivados del ácido hidroxibenzoico, como es el ácido gálico, están presentes en sus formas libres (Georgiev et al., 2014). La presencia del ácido gálico en vinos es muy importante, desde el punto de vista sensorial es el responsable de otorgarle a la bebida un sabor ligeramente amargo (Pazzini et al., 2015), mientras que desde el punto de vista biológico se ha demostrado que posee varias propiedades terapéuticas, que incluyen actividades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antifúngicas y antivirales (Georgiev et al., 2014). Otro de los compuestos no flavonoides presente en el vino tinto Tannat que presenta propiedades terapéuticas es el resveratrol, un estilbeno que posee capacidad antioxidante, anticoagulante, anticancerígena y protección cardiovascular (Georgiev et al., 2014; Lucena et al., 2010).

Por otro lado, los compuestos flavonoides poseen propiedades cardioprotectoras, neuroprotectoras, antimicrobianas y antienvjecimiento. La mayoría de los flavonoides se encuentran principalmente en las células epidérmicas externas de la uva (la cáscara), siendo las antocianinas los principales flavonoides que forman parte de ellas. Estos compuestos son los pigmentos responsables de darle el color violeta característico del vino además de otorgarle capacidad antioxidante (Boido et al., 2006; Georgiev et al., 2014). Durante el procesamiento del jugo de uva, solo se extraen cantidades limitadas de antocianinas, sin embargo, cuando están involucrados procesos de fermentación/maceración, se obtienen grandes cantidades de productos poliméricos (Georgiev et al., 2014). Otros flavonoides presentes en el vino tinto Tannat son los flavanoles, como son las catequinas, epicatequina y proantocianidinas (Piccardo & González-Neves, 2013). Las epicatequinas son los compuestos responsables de la astringencia que muchas veces posee el vino (Pazzini et al., 2015).

Igualmente, cabe destacar que la concentración y composición polifenólica del vino tinto Tannat puede variar según la región, las condiciones climáticas, las técnicas de cultivo de la uva y el proceso de la vinificación (Pazzini et al., 2015).

1.2. SUBPRODUCTOS DE LA VINIFICACIÓN

Uruguay es uno de los principales países productores de vino tinto Tannat, el cual destina por año aproximadamente 23.810.851 kg de esta uva para la producción de dicha bebida alcohólica (INAVI, 2019). Según datos de la Organización de la Viña y el Vino (OIV) se estima que cada 100 kg de uva procesada se generan alrededor de 25 kg de subproductos (OIV, 2015), por lo que nuestro país es gran generador de este residuo.

El principal subproducto de la vinificación es el orujo de uva, que consiste mayoritariamente de las cáscaras y las semillas que quedan después de prensar las uvas. Otro subproducto es el que se obtiene luego de la filtración del vino, el cual corresponde a la materia que se deposita luego de la fermentación, principalmente corresponde a levaduras muertas y a otra serie de sustancias procedentes de la uva (Dávila et al., 2017).

Estos desechos de la vinificación suponen una gran problemática a nivel ambiental, principalmente por su alta carga orgánica que dificulta su rápida degradación (Beres et al., 2016), además del carácter estacional ya que se producen grandes cantidades de subproductos durante un corto período (Beres et al., 2017). Es por estos motivos, que la gestión eficiente de subproductos de la vinificación se ha convertido en un objetivo estratégico para la industria vitivinícola.

Tradicionalmente estos subproductos han sido utilizados como alimento animal, fertilizantes y como biomasa, para la producción de energía (Dávila et al., 2017). En los últimos años ha crecido un gran interés en el aprovechamiento de estos residuos no solo por los problemas ambientales que ellos generan, sino que también se ha visto que poseen grandes propiedades promotoras de la salud para la producción de alimentos de calidad (Beres et al., 2017).

1.2.1. Composición del orujo de uva

El orujo de uva contiene el 70% de los polifenoles presentes en dicha fruta (Fernández-Fernández *et al.*, 2019) los cuales se encuentran distribuidos en la semilla y en la cáscara. Dichos compuestos están asociados con promover la buena salud ya que presentan importantes propiedades bioactivas como efectos antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, cardioprotectores y vasodilatadores (Beres et al., 2017). Dentro de los compuestos fenólicos, los que se encuentran en mayor proporción en la cáscara son las antocianinas, las cuales presentan alta capacidad antioxidante, entre otras propiedades. Por otra parte, en la semilla se encuentran los flavanoles (catequina y protoantocianidinas principalmente), flavonoles (como quercetina y miricetina), estilbenos (el resveratrol es uno de los que tiene gran relevancia para la salud cardiaca) y ácidos fenólicos como el ácido gálico y ácido cafeico (Drosou et al., 2015).

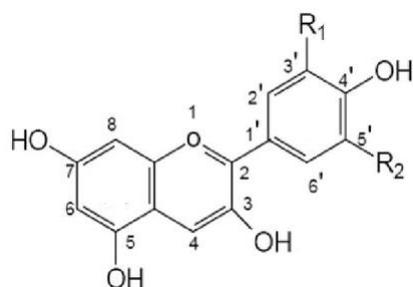
A su vez, el orujo de uva es una fuente muy rica en fibra dietaria, la cual oscila entre 44.2 a 62.6% (Fernández-Fernández et al., 2019), y está compuesta por polisacáridos de las paredes celulares de las plantas, que existen como hemicelulosa, celulosa y pectina (Beres et al., 2016). Gran parte de la fibra dietaria se puede asociar con compuestos fenólicos por enlaces iónicos, covalentes o de hidrógeno formando un entramado que pasa a denominarse “fibra dietética antioxidante” (Beres et al., 2019), haciendo necesaria la utilización de métodos de extracción para la obtención de los compuestos bioactivos presentes en el orujo de uva (Fernández-Fernández et al., 2019). Se han estudiado diferentes extracciones de antocianinas de la cáscara de uva Tannat, pudiéndose concluir que el etanol favorece la extracción de las mismas, así como las condiciones ácidas (Fernández-Fernández et al., 2019). Se ha demostrado que la fibra

dietética antioxidante de la uva muestra una mayor eficacia a la hora de reducir el perfil de lípidos y la presión arterial, en comparación con la fibra de avena debido al efecto combinado de la fibra dietética y los antioxidantes (Tseng & Zhao, 2013).

El orujo de uva también contiene una cantidad significativa de lípidos (entre 13 y 19% son ácidos grasos esenciales que se encuentran en la semilla), proteínas, minerales y antioxidantes no fenólicos, como los tocoferoles y β -caroteno (Yu & Ahmedna, 2013).

1.2.1.1. Antocianinas como componentes principales en la cáscara de uva

Como se destacó anteriormente, las antocianinas son los compuestos mayoritarios en la cáscara de la uva. En la naturaleza se encuentran en las vacuolas vegetales como glucósidos de antocianidinas, donde los glúcidos generalmente son glucosa, ramnosa, galactosa o arabinosa y las antocianidinas son la pelargonidina, cianidina, delfinidina, petunidina y malvidina (**Figura 3**) (Fernandes et al., 2014).



Aglicona	R1	R2
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH3	H
Petunidina	OCH3	OH
Malvidina	OCH3	OCH3

Figura 3. Estructuras y sustituyentes de las antocianinas. Extraído de Garzón (2008).

Específicamente, un extracto de la cáscara de uva Tannat proveniente del subproducto de la vinificación, ha sido recientemente caracterizado por su perfil polifenólico determinándose que el ácido gálico fue el principal ácido fenólico y los principales flavonoides fueron quercetina 3-galacturónido, quercetina, isorhamnetina, quercetina-3 β -D-glucósido y miricetina, en orden descendente de contenido. En cuanto a las antocianinas, los derivados de malvidina fueron las principales antocianinas seguidas de los derivados de petunidina (Fernández-Fernández et al., 2020).

Las antocianinas proporcionan un amplio espectro de colores que van del rojo al púrpura y azul, dependiendo de los sustituyentes, como los tipos de azúcares, los iones metálicos, oxígeno, temperatura y pH (Žilić et al., 2016). Las principales antocianinas que se encuentran en la cáscara de la uva son los 3-O-glucósidos o 3,5-O-diglucósidos de las antocianidinas, así como sus ésteres de acetilo, p-cumaroilo y/o cafeoilo, sin embargo factores como la variedad, la madurez y el clima pueden alterar su presencia (Beres et al., 2017; Georgiev et al., 2014).

Estos compuestos son altamente susceptibles a las transformaciones químicas debido a la acción de diversos agentes como la luz, la temperatura, el oxígeno, el pH, solventes e iones metálicos (Beres et al., 2017). Desde el punto de vista de las capacidades que presentan las antocianinas, diversos estudios han demostrado que las mismas poseen actividad antiinflamatoria, anticancerígena, y antioxidante, las cuales están implicadas en la prevención de enfermedades cardiovasculares, control de la obesidad, y control de la diabetes (Fernández-Fernández et al., 2019; Žilić et al., 2016). En parte, el poder de controlar la diabetes se basa en la capacidad que presentan estos compuestos para reducir la glucosa en sangre, ya que mejoran la sensibilidad a la insulina, inhiben enzimas del

metabolismo de carbohidratos y regulan el transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Fernández-Fernández et al., 2019). Específicamente para la cáscara de uva Tannat, se ha visto que posee la capacidad de inhibir enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, así como los transportadores de glucosa a nivel intestinal (Fernández-Fernández et al., 2020).

Los polifenoles, entre ellos las antocianinas, debido a su estructura poseen capacidad de ser neutralizadores de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) lo que les confiere actividad antioxidante, para combatir al estrés oxidativo el cual es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNTs) (Pazzini et al., 2015; Yu & Ahmedna, 2013). Un extracto de la cáscara de uva Tannat ha mostrado su capacidad para inhibir la formación de ROS intracelulares en células intestinales y en macrófagos, así como su capacidad para inhibir la formación de óxido nítrico por parte de los macrófagos (Fernández-Fernández et al., 2020), presentando gran potencial como ingrediente funcional.

1.3. ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES

Las enfermedades crónicas no transmisibles involucran a las enfermedades cardiovasculares, al cáncer, a determinadas enfermedades respiratorias y a la diabetes tipo 2 (Schulze et al., 2018). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas enfermedades matan a 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen en el mundo. Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las muertes dentro de las ENCTs, seguidas del cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes (OMS, 2018). En Uruguay, es de extrema importancia prestarle atención a este grupo de enfermedades ya que aquí determinan casi 7 de cada 10 muertes registradas (MSP, 2013).

Los estilos de vida relacionados con la alimentación inadecuada, el sedentarismo, el tabaco y el consumo excesivo de alcohol son los principales factores de riesgo para el desarrollo de estas enfermedades. Estos factores pueden intervenir en forma directa o indirectamente, originando otros factores de riesgo como la obesidad, los trastornos de la hipertensión arterial, entre otros (Skapino et al., 2016).

1.3.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción y la acumulación de ROS y RNS, y el sistema de defensa antioxidante (Sakundeck et al., 2020). Las ROS son producidas por todas las células aeróbicas, gran parte son provocadas por las mitocondrias, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, como producto de la cadena respiratoria. En concentraciones bajas, las especies reactivas son necesarias para sintetizar algunas estructuras celulares y ser utilizadas por el sistema de defensa inmunitario del huésped. La gravedad se da cuando se genera un exceso de estas especies, y se desencadena el estrés oxidativo, mencionado anteriormente. Este es un proceso dañino, ya que las especies reactivas pueden atacar a las macromoléculas del organismo como lípidos, proteínas, y ácido desoxirribonucleico impidiendo que estas cumplan sus funciones. Si no se controla estrictamente, el estrés oxidativo puede ser responsable de acelerar el proceso de envejecimiento corporal y ser el inductor de varias enfermedades, tanto crónicas como degenerativas (Liguori et al., 2018; Pizzino et al., 2017).

1.3.1.1. Relación del estrés oxidativo con distintas ECNTs

Estrés oxidativo y obesidad: la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de las ECNTs por el hecho de que las personas con sobrepeso contienen una gran cantidad de tejido adiposo, generándose en consecuencia en ellos una inflamación sistémica. Dicha inflamación lleva a la generación de especies reactivas en cantidades elevadas, más de las que el organismo puede combatir. En particular, las citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-6 (IL-6) producidas y secretadas por el tejido adiposo visceral, son las responsables de generar la resistencia a la insulina, generando hiperglucemia y promoviendo en consecuencia estrés oxidativo, el cual juega un papel importante en la patogénesis de la disfunción endotelial y la aterosclerosis (Chew et al., 2019).

Estrés oxidativo y diabetes: los humanos tenemos un metabolismo aerobio por el medio del cual las distintas macromoléculas se oxidan para obtener energía a partir de ellas, con la formación inevitable de las ROS. La glucosa es la principal molécula que se oxida para dar energía y la más abundante en la célula y en el organismo para fines metabólicos. Las personas con diabetes presentan una reducción de la sensibilidad a la insulina, por lo que la principal característica de la diabetes es la hiperglucemia. Esta alta concentración de glucosa en sangre genera una sobreproducción de ROS generando un estrés oxidativo que condiciona el daño oxidativo a proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, lo cual puede contribuir en diferentes formas al desarrollo de las diferentes manifestaciones de la enfermedad del paciente diabético. Dentro de estas enfermedades se incluyen la aterosclerosis, insuficiencia renal, y algunas otras, causadas todas por el estrés oxidativo generado por la hiperglucemia (Calderón-Salinas et al., 2013; Pazzini et al., 2015). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) se estima que en el mundo 371 millones de personas tienen diabetes, pero la mitad desconoce su condición. En las Américas, un 10% de la población sufre dicha patología y se calcula que el 44% de ellas no lo sabe. En nuestro país hay 360.000 personas con diabetes, un número significativo al cual se le debe prestar mucha atención. Los estilos de vida saludables, entre ellos la buena alimentación, pueden prevenir y controlar la diabetes tipo 2 (OPS Uruguay, 2016).

Estrés oxidativo y enfermedades respiratorias: las personas que padecen enfermedades pulmonares como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), generan una inflamación crónica sistémica y local, la cual se encuentra vinculada al estrés oxidativo (Pizzino et al., 2017).

Estrés oxidativo y cáncer: la aparición de cáncer en humanos es un proceso complejo, que requiere tanto alteraciones celulares como moleculares mediadas por desencadenantes endógenos y/o exógenos. Un desencadenante endógeno es el daño oxidativo del ADN causado por las especies reactivas. Estas pueden causar hidrólisis en el ADN, además de una cantidad variada de modificaciones en su estructura, causando carcinogénesis. Los malos estilos de vida, como una mala alimentación, fumar, los contaminantes ambientales y la inflamación crónica son algunas de las fuentes que pueden causar daño oxidativo al ADN y contribuir al inicio del tumor (Pizzino et al., 2017).

Estrés oxidativo y enfermedades cardiovasculares: las enfermedades cardiovasculares son patologías asociadas con numerosos factores de riesgo, como hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, diabetes, dieta desequilibrada, estrés y vida sedentaria. Durante los últimos años, se han dado a conocer diferentes investigaciones en las cuales se afirma que el estrés oxidativo debe considerarse como una de las causas de muchas enfermedades cardiovasculares. Personas que padecen una inflamación temprana del endotelio conduce a la generación de ROS por parte de los macrófagos, las cuales oxidan a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes. Dicha oxidación lleva a la formación de una placa aterosclerótica que consiste en el depósito de sustancias grasas en el interior de las arterias, causando así accidentes cardiovasculares al obstruir el pasaje del flujo sanguíneo (Pizzino et al., 2017).

1.3.1.2. Agentes para el tratamiento del estrés oxidativo

Tal como se destacó anteriormente, existen diversos factores tanto endógenos como exógenos que llevan a la sobreproducción de especies reactivas en el organismo causando el desarrollo de diversas enfermedades. Dentro de los factores endógenos, varios tipos de células del sistema inmune y respiratorias pueden liberar especies reactivas, entre ellas el óxido nítrico, el radical hidroxilo y el anión superóxido. La exposición excesiva a diversos estímulos como contaminantes, humo, drogas, también inducen una producción excesiva de ROS. Esta producción elevada lleva a que las biomoléculas del organismo puedan ser irreversible y permanentemente dañadas (Zhang & Tsao, 2016). Con lo cual, queda remarcada la importancia de tener en el organismo compuestos con capacidad antioxidante para combatir a las especies reactivas.

Dentro de los compuestos antioxidantes que podemos obtener de la dieta se encuentran los polifenoles, entre ellos las antocianinas, cuya capacidad antioxidante se debe a sus estructuras químicas. La característica aromática y el sistema altamente conjugado con múltiples grupos hidroxilo, hacen que estos compuestos sean capaces de actuar como antioxidantes primarios, neutralizando los radicales libres mediante la donación de electrones (SET, por sus siglas en inglés) o un átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés), así como también pueden actuar como antioxidantes quelando metales. La fuerte capacidad antioxidante depende principalmente del número y la posición de los grupos hidroxilo en la molécula. El hidroxilo en la posición orto y/o para, puede conducir a una actividad antioxidante elevada en comparación con otras posiciones y con un fenol no sustituido. Además, un mayor número de anillos hidroxilaromáticos como poseen los compuestos flavonoides, ha demostrado tener una mayor capacidad antioxidante en comparación con compuestos no flavonoides, como son los ácidos fenólicos. La ventaja mayoritaria de los polifenoles, es que cuando pierden un electrón o un átomo de hidrógeno se genera un radical derivado de ellos relativamente más estable del radical que ellos neutralizaron. Esto se debe a la capacidad que tienen de resonar la carga deslocalizada generada al poseer anillos aromáticos (Zhang & Tsao, 2016).

1.3.2. Alimentación y su incidencia en las enfermedades crónicas no transmisibles

Según la OPS cada vez hay menos consumo de frutas, verduras, granos, legumbres, y más ingesta de alimentos procesados ricos en grasas saturadas, azúcares y sal. En Uruguay, entre 1999 y 2013, la venta de bebidas azucaradas y la de otros alimentos con excesiva cantidad de azúcares se triplicó. En igual periodo, se observó un aumento de sobrepeso en adultos del 52,5% al 64,9%, en niños y adolescentes el 39% presenta exceso de peso, observándose una estrecha asociación con el aumento de la hipertensión.

Estas características de la mala alimentación y la consecuente aparición de sobrepeso, constituyen un factor clave en el desarrollo de diversas patologías (OPS Uruguay, 2019). Por lo tanto, una herramienta importante para reducir las ECNTs consiste en reducir los factores de riesgo, principalmente relacionados con las dietas.

Existen varios alimentos y bebidas puntuales que se asocian con la prevención y con el riesgo de desarrollar cáncer, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares o accidentes cerebrovasculares. Un gran consumo de granos integrales está relacionado con un menor riesgo para el desarrollo de dichas enfermedades, mientras que el consumo de carnes procesadas y carnes rojas sin procesar se asocian con un mayor riesgo. Consumir frutas y verduras están asociadas con menor riesgo de padecer cáncer, enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares. Las bebidas azucaradas están asociados con un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, mientras que el consumo de café se asocia con un menor riesgo (Schulze et al., 2018).

En relación con esto, varias investigaciones han demostrado que personas cuya dieta es la mediterránea presentan menor riesgo de sufrir ECNTs. La dieta mediterránea generalmente se refiere a una dieta con una alta ingesta de frutas, nueces, semillas, verduras, pescado, legumbres y cereales, y un limitado consumo de ingesta de carne y productos lácteos. La ingesta moderada de alcohol, especialmente vino tinto, y aceite de oliva han sido claves para relacionar dicha dieta como un importante factor para la prevención de estas patologías. En parte, esos acontecimientos se pueden relacionar con el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos, como son las verduras frutas, y vino tinto, donde en estas dietas es alto. El consumo de 1 g por día de dichos componentes se considera seguro y beneficioso para la prevención de enfermedades crónicas (Schulze et al., 2018; Zhang & Tsao, 2016).

Teniendo en cuenta la química y bioquímica de los polifenoles presentes en diversos alimentos, y sus posibles roles y mecanismos sobre el estrés oxidativo y la inflamación, se han llevado a cabo diversas investigaciones para incorporarlos en distintas matrices alimentarias y desarrollar así alimentos funcionales o nutraceuticos que reduzcan el riesgo a desarrollar ECNTs a través de sus efectos mencionados (Zhang & Tsao, 2016).

1.4. ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales se definen como aquellos que más allá de su valor nutricional contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos sobre una o varias funciones del organismo, lo que se traduce en una mejora de la salud y en una disminución del riesgo de sufrir enfermedades. El mercado de los alimentos funcionales se está expandiendo en gran medida, ya que los consumidores son cada vez más conscientes sobre su alimentación. En consecuencia, la industria de los alimentos funcionales está creciendo enormemente con tasas de crecimiento anual del 48% (Fuentes-Berrio et al., 2015). El 38% de los consumidores estadounidenses están dispuestos a pagar más por los alimentos que ofrecen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica y aproximadamente el 54% de esos consumidores buscan activamente alimentos funcionales (Fidelis et al., 2020).

Los primeros alimentos funcionales en el mercado fueron aquellos enriquecidos con vitaminas y/o minerales como la vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc, hierro y calcio. Posteriormente, el enfoque se centró en alimentos enriquecidos con varios micronutrientes como el ácido graso omega-3, el fitosterol y la fibra soluble para promover la buena salud o prevenir enfermedades como el cáncer. Más recientemente, las compañías de alimentos han tomado medidas adicionales para desarrollar productos

alimenticios que ofrecen múltiples beneficios para la salud en un solo alimento, entre los que se destacan los alimentos que han sido adicionados con sustancias biológicamente activas como los fitoquímicos (Perdigón et al., 2009; Siró et al., 2008). A su vez, la mayoría de los productos alimenticios con probióticos se clasifican como alimentos funcionales, y representan una parte significativa de los mismos, dentro de los que se destaca de manera especial el yogur (Fuentes-Berrio et al., 2015).

1.4.1. Desarrollo de alimentos funcionales

Cuando se desea desarrollar un alimento funcional con la incorporación de distintos componentes es necesario destacar que se requieren importantes esfuerzos de investigación y que se deben seguir determinados pasos los cuales se esquematizan en la **Figura 4**. El primer paso, implica identificar cuál/es es/son el/los compuestos/s funcional/es que se quiere adicionar a la matriz alimentaria y de dónde se puede obtener. Luego se debe evaluar mediante ensayos *in vitro* las propiedades que lo hacen un ingrediente funcional (Fidelis et al., 2020).

Como siguiente paso es necesario evaluar la bioaccesibilidad, la cual se define como la cantidad de compuesto específico solubilizado en el intestino delgado y disponible para la posterior absorción; comprende la liberación de compuestos de las matrices alimentarias y su estabilidad bajo las condiciones gastrointestinales. Este último punto es de suma importancia ya que solo los compuestos liberados de la matriz alimentaria y estables en las condiciones gastrointestinales están potencialmente disponibles para ejercer sus efectos beneficiosos sobre el tracto gastrointestinal (Helal & Agliazucch, 2018). Una forma de evaluar la bioaccesibilidad es realizar ensayos de digestión *in vitro* en los cuales se simula qué le pasaría al compuesto en las condiciones gastrointestinales, para lo cual se somete a la muestra a condiciones de pH ácidas, y enzimas digestivas por un tiempo determinado (Brodkorb et al., 2019).

Una vez realizada la evaluación de la bioaccesibilidad se deben llevar a cabo estudios de biodisponibilidad, que se refiere a la cantidad y velocidad a la que el principio activo se absorbe y llega al lugar de acción (Quirós-Sauceda et al., 2011). Para evaluar la biodisponibilidad, como primer paso generalmente se realizan ensayos *in vitro* de absorción utilizando células gástricas como lo es la línea celular caco-2 que imita la barrera intestinal. Posteriormente se prosigue con modelos *in vivo* utilizando animales de experimentación y voluntarios humanos (Fernandes et al., 2014).

Se debe tener en cuenta que no necesariamente adicionar una concentración alta de compuestos bioactivos en alimentos conducen a mayores concentraciones de metabolitos activos en los tejidos (Quirós-Sauceda et al., 2011).



Figura 4. Etapas a seguir para el desarrollo de un alimento funcional. (1) Elección del ingrediente bioactivo (2) Estudios de actividades funcionales mediante ensayos *in vitro*. (3) Estudios de bioaccesibilidad mediante digestión *in vitro*. (4) Estudios de biodisponibilidad en línea celular. (5) Estudios en modelos *in vivo* mediante experimentación animal e intervención humana.

Una vez realizados los pasos mencionados, si se cumplen las expectativas y se comprueba que el alimento funcional tiene un efecto en la salud más allá de su valor nutricional, se le pueden realizar declaraciones de marketing afirmando que mejoran la salud y ser lanzado al mercado como un alimento funcional (Fidelis et al., 2020).

En cuanto a los estudios de bioaccesibilidad, se ha visto que la cáscara de uva Tannat presenta propiedades bioactivas (capacidad antioxidante, inhibitoria de enzimas del metabolismo de carbohidratos, inhibitoria de transportadores de glucosa intestinales, y anti-inflamatoria) después de su simulación digestiva *in vitro*, presentando gran potencial como ingrediente funcional (Fernández-Fernández et al., 2020). Por lo que la cáscara de uva Tannat podría ser incorporada en alimentos de alto consumo mundial como es el yogur, pudiendo tener un efecto sobre la salud de la población.

1.4.2. Elaboración de yogur y su potencial como alimento funcional

1.4.2.1. Procedimiento de elaboración del yogur

El Reglamento Bromatológico Nacional (RBN) define al yogur como el producto obtenido por la fermentación láctica de la leche previamente pasterizada o esterilizada, a través de la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (MSP, 2012).

Las técnicas de elaboración del yogur pueden ser muy diferentes dependiendo del fabricante, igualmente los mismos se basan en una serie de pasos generales. Brevemente, primero se recepciona y evalúa la materia prima, desde el punto de vista microbiológico, el recuento de bacterias aerobias mesófilas por mL de leche cruda no deberá sobrepasar el límite de 5×10^6 unidades formadoras de colonia (ufc); el contenido de coliformes

totales no deberá sobrepasar el límite de 10^4 por mL y se admitirán hasta 10^3 ufc de *Staphylococcus aureus* por mL (MSP, 2012); a su vez la leche cruda debe de estar libre de antibióticos ya que su presencia inhibe el desarrollo de los microorganismos que llevarán a cabo la fermentación láctica (Hernandez et al., 2003).

Como segundo paso de elaboración se procede a la estandarización del contenido de grasa de la leche, la cual debe estar entre el 0,5 y 3,5 % dependiendo si se parte de materia descremada o entera. Con el contenido de sólidos totales que presenta la leche no basta para formar un gel con estructura por lo que es necesario elevar la cantidad de los mismos, para lo cual se puede agregar leche descremada en polvo o adicionar estabilizantes como el almidón, que mejoran el cuerpo, la textura y la apariencia del yogur (Hernandez et al., 2003).

La etapa de homogenización generalmente se lleva a cabo antes de la pasteurización y consiste en someter a la leche a altas presiones con el fin de disminuir el tamaño de las gotas de grasa y otros constituyentes. La pasteurización tiene como fin eliminar la mayor parte de los microorganismos contenidos en la leche para permitir el crecimiento del futuro inóculo, así como para la inactivación de enzimas presentes en la leche que pueden afectar las características organolépticas del producto final. Con el tratamiento térmico también se genera desnaturalización de algunas proteínas de la leche, donde se liberan péptidos que son utilizados por los microorganismos inoculados para su crecimiento. La temperatura y el tiempo de pasteurización varía mucho dependiendo del proceso de fabricación, algunos de los protocolos más utilizados implican 90°C por 5 minutos o 80°C por 30 minutos. Luego de la pasteurización la leche debe ser enfriada hasta obtener una temperatura óptima para el crecimiento de los microorganismos, para ello el tanque se hace pasar por agua fría por la camisa del reactor o se puede pasar a la leche por un intercambiador de placas (Hernandez et al., 2003).

La mezcla se coloca en recipientes de vidrios y se inocula con un cultivo láctico, compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. La relación de las bacterias lácticas en el cultivo es 1:1, debido a que es la que garantiza una adecuada consistencia del yogur y un agradable aroma (Bruzzone et al., 2013; Hernandez et al., 2003).

Se debe mezclar muy bien con la leche para asegurar una adecuada distribución de los microorganismos. En este momento empieza el proceso de fermentación, la cual se realiza en un promedio de 3 a 6 horas, a una temperatura de entre 40 y 45°C . El tiempo de fermentación depende de la temperatura de inoculación y de la capacidad de producción de ácido láctico a partir de lactosa de los microorganismos. El proceso se da por finalizado cuando se alcanza una concentración de ácido láctico entre 0,7 y 1,1% m/v, correspondiéndose con un valor de pH entre 3,7 y 4,6. Para detener la fermentación se disminuye la temperatura a 5°C (Hernandez et al., 2003).

1.4.2.2. Yogur como alimento funcional

El yogur es un alimento funcional ampliamente consumido, debido a su buen sabor, a sus propiedades nutricionales y a los efectos beneficiosos sobre la salud humana. Se ha visto que presenta buena capacidad para mejorar la enfermedad inflamatoria intestinal, una estimulación al sistema inmune y propiedades antimutagénicas, anticancerígenas y antidiarreicas (Fazilah et al., 2019). Los efectos beneficiosos para la salud del yogur se han relacionado con los probióticos y con la presencia de péptidos bioactivos producidos durante la fermentación y el almacenamiento (Fazilah et al., 2019).

Sin embargo, el yogur no se considera una fuente rica de compuestos fenólicos, por lo que una estrategia para aumentar en su contenido es el agregado de semillas,

extractos o futas ricas en ellos. Su adición tiene varios beneficios, en primer lugar, por las importantes propiedades benéficas sobre la salud, y su poder antioxidante. Además, la matriz del yogur es un buen vehículo de entrega de compuestos fenólicos ya que el pH bajo aumenta la estabilidad de estos compuestos durante el almacenamiento, mientras que la presencia de proteínas o péptidos grandes y grasas mantiene su integridad durante la digestión, aumentando su bioaccesibilidad (Helal & Agliazucch, 2018). A su vez, se ha visto que la adición al yogur de extractos que contienen polifenoles y antocianinas puede mejorar la viscosidad, la tasa de sinéresis, la estabilidad y la actividad antioxidante durante el almacenamiento refrigerado en comparación con yogures sin la incorporación de polifenoles (Petrotos et al., 2012).

Por lo tanto, la adición de compuestos fenólicos, incluidas las antocianinas, al yogur parece ser una excelente estrategia para aumentar las propiedades funcionales de dicho producto.

1.5. ENCAPSULACIÓN

Los compuestos fenólicos son ingredientes inestables frente a diversos factores, como a cambios de temperatura y pH, por lo que su adición a los alimentos presenta desafíos por sus cambios de estabilidad en las condiciones a las que son sometidos durante la digestión o durante el procesamiento del alimento (El-Messery et al., 2019). Se ha observado en investigaciones previas que cuando se desarrollan yogures con la adición de polifenoles, los mismos pueden interactuar con proteínas y/o polisacáridos de la leche o con los cultivos iniciadores. A su vez, se han encontrado algunos problemas relacionados con el sabor amargo o la decoloración del producto a la hora de generar yogures funcionales con la adición de polifenoles (Petrotos et al., 2012).

La tecnología de micro-encapsulación utilizando correctos agentes encapsulantes podría resolver estos problemas, y así superar los inconvenientes de inestabilidad, aliviar sabores desagradables, cambios de color, así como mejorar la biodisponibilidad y la vida media del compuesto (Petrotos et al., 2012). La micro-encapsulación se define como una técnica en la que un compuesto bioactivo se encapsula por un biopolímero, protegiéndolo del oxígeno, del agua, de la luz o de otras condiciones, con el fin de mejorar su estabilidad, así como para cambiar las soluciones líquidas a polvos para facilitar su manipulación (Robert et al., 2010).

1.5.1. Secado por atomización

El secado por atomización es una de las técnicas de micro-encapsulación física más utilizada en la industria de los alimentos, y se define como la transformación de una solución en un estado fluido a una forma de partículas secas de tamaños de 1 a 100 μM , al atomizar la solución líquida en un medio de secado caliente (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015; El-Messery et al., 2019; Madene et al., 2006).

Brevemente, como se esquematiza en la **Figura 5** el mecanismo comienza cuando la emulsión ingresa al equipo para someterse a la atomización, la cual consiste en generar la ruptura del líquido en una gran cantidad de gotas, generalmente mediante el uso de una rueda giratoria que rompe la corriente del líquido. El objetivo de este primer paso es la generación de gotas con el fin de reducir las resistencias internas a la transferencia de humedad de la gota al medio circundante. Las gotas entran en contacto con aire caliente el cual puede circular en co-corriente o en contracorriente provocando la evaporación de agua, la cual va decayendo con el transcurso del tiempo de secado. La eficiencia del proceso de secado depende del tiempo expuesto al medio caliente, de la temperatura de

ingreso del aire caliente, de la temperatura final, de la humedad del medio y del tamaño de partícula a encapsular. Luego del secado el polvo generado en la base del secador, pasa a un separador ciclónico, un dispositivo mecánico estacionario que utiliza la fuerza centrífuga para separar las partículas sólidas del aire, obteniéndose el producto terminado. El aire separado escapa al exterior llevándose consigo un muy pequeño porcentaje de polvo, lo que se soluciona con la utilización de un sistema soplador de gases que permite recuperar el producto (Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015).

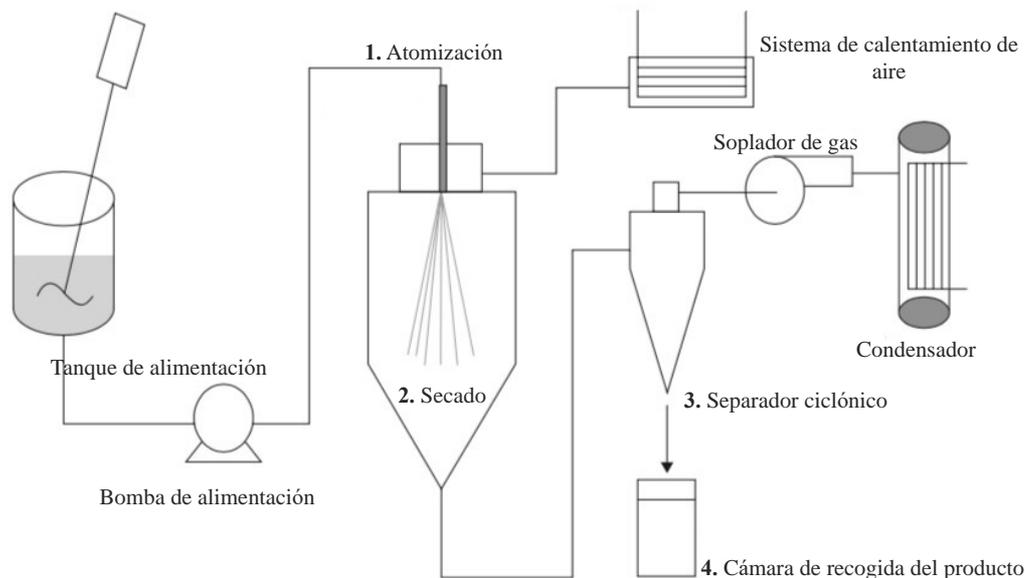


Figura 5. Esquema de los pasos del proceso de secado por atomización.

(1) El producto líquido se encuentra en el tanque de alimentación, se impulsa por la bomba de alimentación al atomizador. (2) Secado con aire caliente generándose el polvo el cual es aspirado por un ventilador, y llevado por la tubería de interconexión hasta al ciclón. (3) Separación del polvo del aire. (4) Obtención del producto terminado.

Extraído de Anandharamakrishnan & Ishwarya (2015).

Cabe señalar que previo al proceso de secado por atomización es de suma importancia elegir de manera correcta los materiales de encapsulación (también denominados materiales de pared) que se utilizarán porque puede afectar la eficiencia del proceso y la estabilidad de la cápsula. Existe una amplia gama de materiales de pared utilizados en el proceso de encapsulación, entre ellos lo más utilizados son la dextrina, la goma arábiga, la gelatina, el almidón y la proteína de suero (El-Messery et al., 2019). Los distintos tipos de materiales encapsulantes pueden presentar varias formas (películas, esferas, partículas irregulares), conformaciones (porosas o compactas) y varias estructuras físicas (amorfa, cristalina sólida, deshidratada, gomosa). A su vez, para ser óptimos encapsulantes durante el proceso de secado por atomización deben presentar ciertas características como una alta solubilidad en agua, una baja viscosidad a alta concentración, una emulsificación efectiva y generar un secado eficiente (Madene et al., 2006).

1.5.1.1. Ventajas y desventajas del secado por atomización

Dentro de las ventajas del secado por atomización, las cuales se resumen en la **Tabla 1**, se pueden destacar que es un proceso de un solo paso, de bajo costo y de duración muy corta en comparación con otros métodos. Esto se debe a que se eliminan

muchas operaciones intermediarias, como son la filtración, molienda y clasificación que se deben realizar en varias otras técnicas de encapsulación. El proceso es eficiente para la retención de compuestos volátiles, proporcionando una buena técnica para la alta retención de compuestos aromáticos. Los productos secados por atomización tienen propiedades importantes, tales como mayor estabilidad térmica, forma y tamaño de partícula regular, y contenido de humedad reducido, siendo una técnica utilizada para proteger muchos materiales termolábiles. A su vez, el final de la operación es simple debido a que no es necesario tener material de retención. Generalmente, es un método que no genera problemas de corrosión, ya que el material que se está secando no toca las paredes hasta que el producto esté seco (Madene et al., 2006; Romero & Otiniano, 2010).

Como desventajas se puede destacar que el tamaño muy fino del polvo generado, puede necesitar un procesamiento adicional, como la aglomeración. Otros inconvenientes son que se obtienen bajas densidades volumétricas cuando se requiere lo contrario, además de que algunos compuestos aromáticos de bajo punto de ebullición pueden perderse durante el secado por atomización (Madene et al., 2006).

Tabla 1. Ventajas y desventajas del secado por atomización.

Ventajas	Desventajas
Disponibilidad de equipo	Esquipo costoso
Operación en un solo paso	Rendimiento bajo
Duración corta	Posible producción de capsulas no uniformes
Bajo costo del proceso	Posible procesamiento adicional del producto
Final de la operación simple	
Buena estabilidad del producto terminado	
Buena retención de compuestos volátiles	

1.5.1.2. Encapsulación de polifenoles obtenidos por extracción etanólica

Se han llevado a cabo investigaciones en las cuales se ha afirmado que el secado por atomización es una buena técnica para encapsular compuestos bioactivos, como son los polifenoles (Arrazola et al., 2014; Robert et al., 2010).

Uno de los estudios realizados fue sobre la encapsulación mediante secado por atomización del extracto etanólico de polifenoles y antocianinas presentes en granada, y su posterior incorporación a un yogur. Se utilizaron como materiales encapsulantes a la maltodextrina (MD) o al aislado de proteína de soja (SPI), considerando la proporción del material encapsulante y la temperatura de entrada como variables independientes. Como resultado se observó que la eficiencia de encapsulación alcanzó valores más altos para las antocianinas que para los polifenoles, lo que demuestra la capacidad de la MD y del SPI para unirse a las antocianinas. También se observó que los porcentajes de recuperación de compuestos bioactivos encapsulados (polifenoles y antocianinas) en todos los sistemas fueron superiores al 90%, lo que demostró que la temperatura de secado (100–160 °C) no afectó la recuperación del compuesto bioactivo. En algunos sistemas la recuperación de polifenoles fue por encima del 100%, lo que se podría explicar como una consecuencia de la hidrólisis de polifenoles de granada conjugados durante la preparación de las muestras o durante el proceso de secado. Respecto a la adición de los compuestos encapsulados, se determinó que la encapsulación con MD fue el sistema que tuvo efecto protector más alto (Robert et al., 2010).

Otra de las investigaciones se basó en la microencapsulación utilizando MD como material de pared, mediante secado por atomización de antocianinas provenientes de berenjenas, obtenidas por tratamiento alcohólico. Se observó que los pigmentos

microencapsulados con 30% de MD y con temperatura de entrada del aire de 180°C presentaron buenas propiedades fisicoquímicas, con menores contenidos de humedad y actividad de agua y mayores porcentajes de solubilidad respecto a los compuestos no encapsulados (Arrazola et al., 2014).

Con estos puntos destacados, se puede proponer al secado por atomización como un buen método para producir nano-micropartículas como sistema de transporte de compuestos fenólicos obtenidos por una extracción etanólica de la cáscara de uva Tannat y su posterior incorporación en yogur.

La hipótesis del presente trabajo se basa en que la encapsulación podría mejorar la estabilidad de los polifenoles incorporados en alimentos, principalmente las antocianinas, manteniendo las propiedades bioactivas después de la digestión.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo es la producción de nano-micropartículas como sistema de transporte de compuestos bioactivos, principalmente antocianinas, obtenidos mediante extracción etanólica a partir del subproducto de la industria vitivinícola para la elaboración de yogures funcionales.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Diseño, desarrollo, y obtención de nano-micropartículas como sistema de transporte de compuestos bioactivos mediante secado por atomización.

2- Evaluación de la eficiencia de encapsulación, y bioactividad de las nano-micropartículas desarrolladas.

3- Estudio de bioactividad de la fracción bioaccesible de los compuestos bioactivos del extracto de cáscara de uva Tannat encapsulados en el yogur funcional.

3. PLAN DE TRABAJO



Figura 6. Esquema del plan de trabajo. (1) Separación manual del orujo de uva Tannat. (2) Secado de las cáscaras. (3) Molienda de las cáscaras secas. (4) Preparación y Filtración del extracto etanólico. (5) Rotaevaporación del extracto etanólico. (6) Obtención del extracto. (7) Secado por atomización de los sistemas. (8) Obtención de los encapsulados en polvo y sus blancos luego del secado. (9) Preparación de las diferentes formulaciones de yogures. (10) Digestiones *in vitro* tanto de las muestras en polvo como las muestras de yogures. (11) Determinación de la capacidad antioxidante sobre las diferentes muestras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Matriz de partida

El orujo de uva Tannat fue provisto por la bodega Bouza S.A (Montevideo, Uruguay). La separación de las semillas de las cáscaras se llevó a cabo manualmente, las semillas se descartaron mientras que las cáscaras fueron conservadas a -20°C y secadas posteriormente.

4.1.2. Reactivos utilizados

Las sales utilizadas en las soluciones buffer fueron Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los reactivos utilizados en el análisis de caracterización fisicoquímica fueron de grado reactivo. KCl , HCl 37% y $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ fueron comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU) al igual que el Reactivo de Folin, el dimetilsulfóxido (DMSO), la sal de diamonio 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), el 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido (Trolox), la sal disódica de fluoresceína (FL) y el diclorhidrato de 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamida) (AAPH). El persulfato de potasio fue comprado de J. T. Baker (Nueva Jersey, EE. UU.).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparación de la muestra

4.2.1.1. Secado de la cáscara

Las cáscaras de uva Tannat previamente separadas fueron colocadas en bandejas de aluminio y llevadas a secar a una temperatura de 40°C en estufa convencional. La temperatura de secado se eligió en base a estudios previos donde se comparó la capacidad antioxidante (determinada por el método de ABTS) de la cáscara de uva secada a 40°C durante 24 horas y liofilizada (Fernández-Fernández et al., 2019). El secado fue finalizado cuando las cáscaras alcanzaron peso constante, el cual se llega aproximadamente a las 24 horas en el secado por estufa convencional. Se registró el peso final de las cáscaras secas y se determinó el contenido inicial de humedad, el cual debe de ser de 66%. Las cáscaras luego de alcanzar temperatura ambiente fueron molidas en molinillo de café eléctrico marca Bosch. El polvo fue guardado en congelador para la posterior extracción etanólica de sus compuestos bioactivos.

4.2.1.2. Preparación del extracto

La extracción etanólica de los compuestos bioactivos del polvo de cáscara de uva se realizó según lo descrito por Fernández-Fernández et al. (2019). Para la extracción etanólica se pesaron 100 g de polvo en 1 L de etanol 95% con agitación magnética durante 4 horas para favorecer la homogeneización de la mezcla, y se procedió a la maceración hasta cumplir las 24 horas, a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Luego, se filtraron

las extracciones con papel de filtro Whatman n°4, se combinaron y evaporaron hasta llegar a sequedad mediante el rotavapor BÜCHI (R-114) a presión reducida en baño de agua (B-480) a 40 °C, seguido de secado en estufa convencional a 40°C por 24 h para asegurar la total remoción del etanol, dado el posterior secado por atomización. La fracción insoluble fue descartada.

4.2.1.3. Preparación de nano-microcápsulas

Los materiales encapsulantes utilizados para el desarrollo de las nano-micropartículas fueron la proteína de suero lácteo no hidrolizada (WPI), hidrolizada (WPIH), junto con el polisacárido inulina (I) en una relación 3:1 (3WPIH/3WPI : I). La proteína de suero lácteo (WPI) es un subproducto de la industria láctea que se utiliza comúnmente en la industria alimentaria debido a que tiene un alto valor nutricional y otorga buenas propiedades fisicoquímicas (El-Messery et al., 2019).

Las encapsulaciones del extracto seco se realizaron en 2 niveles como se detallan a continuación, a su vez se realizaron sistemas blancos de los encapsulados:

Sistema 1 - Encapsulante (WPI + I) (1:1) (sistema blanco)

Sistema 2 - Encapsulante (WPIH + I) (1:1) (sistema blanco)

Sistema 3 - Extracto seco : encapsulante (WPI + I + E) (1:1)

Sistema 4 - Extracto seco : encapsulante (WPIH + I + E) (1:1)

Los sistemas 1, 2, 3, y 4 fueron preparados en buffer fosfato 100 mM pH 7,0 (24 h antes del secado por atomización) siendo solubilizados mediante agitación en plancha por 1 hora. Al día siguiente se sometieron a secado por atomización utilizando un Secador spray de mesa SSPB EDIBON, el cual opera en un rango de temperatura de aire al ingreso de 100 a 140 ± 5 °C, con un flujo de aire de 600 L/h. La velocidad de alimentación del producto fue de 3 mL/min, la presión de atomización de 0.14 Mpa, la temperatura de entrada de aire de 180 °C y la temperatura de alimentación 60 °C. Dichas condiciones de trabajo fueron seleccionadas según trabajos previos del laboratorio (Agnetti et al., 2019). La solución blanco (Sistema 5 – E 180) correspondió al extracto sin encapsular, dicho sistema no pudo ser sometida al secado por atomización debido a que las antocianinas precipitaron impidiendo su pasaje por el equipo de laboratorio. El extracto sin encapsular fue sometido a plancha por 5 minutos a 180 °C simulando las condiciones de secado del secador por atomización.



Figura 7. Producción de los encapsulados en polvo y sus blancos utilizando el Secador spray de mesa.

4.2.2. Determinación de humedad

La humedad de los sistemas en polvo fue determinada en estufa convencional a 105 °C. El tiempo de secado fue de 3,5 horas. Todas las muestras fueron preparadas por

triplicado (Nielsen, 2017). Dicha medida de humedad de las muestras fue utilizada para expresar los resultados de las determinaciones en base seca.

4.2.3. Cuantificación del contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu, un método colorimétrico que contempla el mecanismo de acción SET. Consiste en que los grupos hidroxilos de los grupos fenólicos presentes en la muestra, en condiciones alcalinas, se oxidan al reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual está compuesto por una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato y es inicialmente de color amarillo. Cuando se reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu da como producto un complejo azul, el cual se sigue por espectrofotometría UV-Vis a 750 nm (Musci & Yao, 2017). La reacción de oxido/reducción se esquematiza en la **Figura 8**. Cabe señalar que este reactivo no es específico para compuestos fenólicos, ya que los grupos fenólicos que se encuentran en proteínas u otras sustancias capaces de reducir al reactivo, pueden también participar en la reacción de reducción (Ky et al., 2014).

El método se realizó según Fernández-Fernández et al. (2019) usando una curva de calibración de ácido gálico (0.05 – 1.0 mg/mL). A la placa de 96 pocillos transparentes se le agregan 10 μ L del patrón/muestra, 200 μ L de solución 20% de carbonato de sodio, y luego de transcurridos 2 minutos se añaden 50 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (1/5). Pasados los 30 minutos a oscuridad se mide la absorbancia a 750 nm en un lector de microplacas Thermo Scientific FC. El resultado obtenido se expresa como g de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g de muestra.

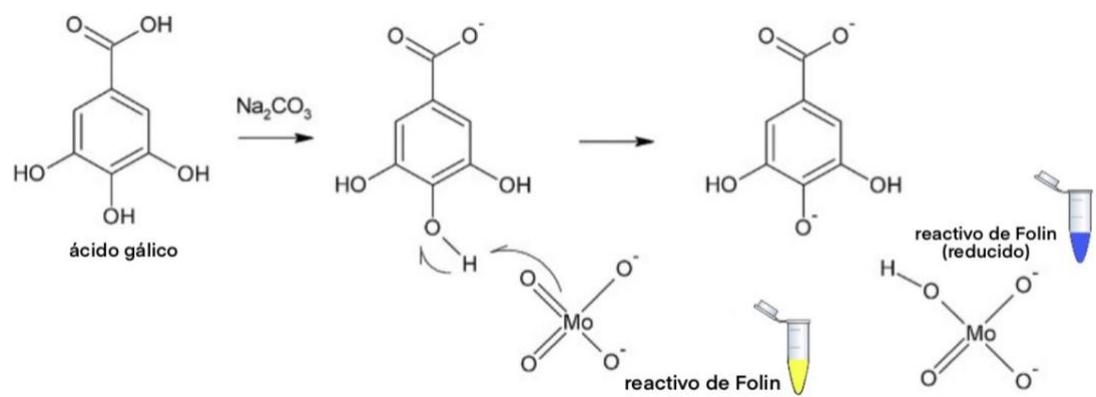


Figura 8. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin.

4.2.4. Determinación de la capacidad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante fue determinada por 2 ensayos distintos sobre el extracto sin tratamiento alguno después de su obtención y de los sistemas obtenidos luego del secado por atomización, así como sobre las distintas formulaciones de yogures. A su vez, dicha capacidad antioxidante también fue determinada luego de la simulación digestiva *in vitro* de las diferentes muestras.

4.2.4.1. Método ABTS

El método ABTS es un método espectrofotométrico que contempla el mecanismo de acción SET, siendo uno de los más utilizados para la medición de la actividad

antioxidante total de diferentes compuestos. La técnica consiste en primer lugar en la reacción del ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)] con persulfato de potasio para generar el radical catiónico ABTS^{•+}. Una vez generado el ABTS^{•+} (verde petróleo) se mide la capacidad de los antioxidantes presentes en la muestra para atrapar dicho radical, formando el complejo reducido ABTS²⁻ (incolore). La decoloración del radical generada por parte de los antioxidantes se sigue mediante espectrofotometría UV-Vis a 750 nm (Re et al., 1999). La reacción se esquematiza en la **Figura 9**.

Para llevar a cabo dicha técnica se siguieron las etapas descritas según Fernández-Fernández et al. (2019). Como primer paso se activa la solución de ABTS con persulfato potásico dejando en oscuridad a temperatura ambiente durante 14-16 horas para la formación del radical. Se prepara la solución de trabajo de ABTS colocando 1 mL de ABTS^{•+} y 25 mL de PBS 5 mM pH 7,4 (buffer fosfato), se espera 3-5 minutos para que la solución se estabilice y se mide su absorbancia. Una vez alcanzada la absorbancia de 0,7 nm se colocan 10 µL de muestra o patrón (por triplicado) en cada pocillo de placas transparentes de 96 pocillos y se le agregan 190 µL de la solución de trabajo de ABTS, se esperan 10 minutos a oscuridad y se mide la absorbancia a 750 nm. La curva de calibración se realiza con Trolox [ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico] en concentraciones de 0.25–1.5 mM. Los resultados se expresan como µmol de Trolox/g de muestra.

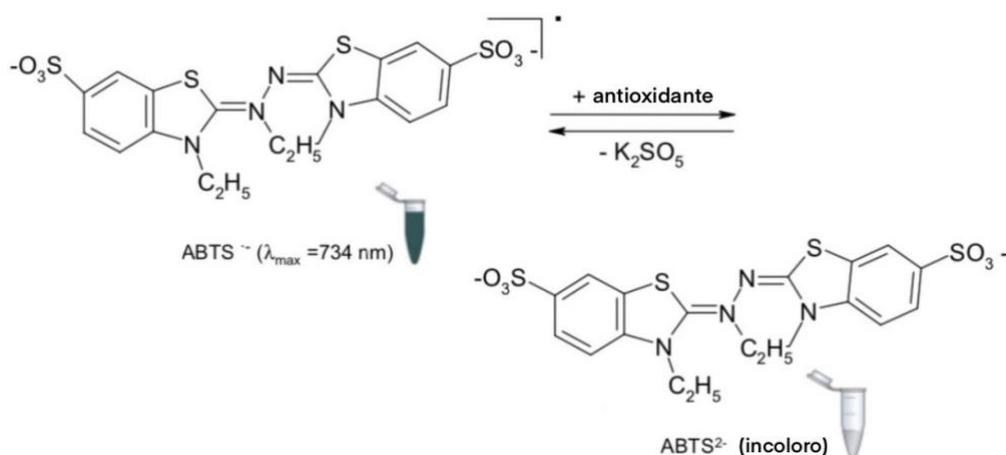


Figura 9. Reacción del radical ABTS^{•+} en presencia de los compuestos antioxidantes durante el ensayo de ABTS. Adaptado de Zulueta et al., 2009.

4.2.4.2. Método ORAC-FL

El ensayo de la capacidad antioxidante sobre el radical de oxígeno (ORAC) es uno de los métodos más utilizados para contemplar el mecanismo de acción HAT. El ensayo consiste en medir la disminución de la fluorescencia de una sonda fluorescente (fluoresceína (FL)) como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peroxilo. ORAC-FL mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger a la fluoresceína del daño oxidativo (Zulueta et al., 2009).

El método consta en primer lugar de la descomposición térmica del reactivo 2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) a 37 °C en buffer fosfato 75 mM (pH 7,4) para generar el radical peroxilo. La **Figura 10** es un diagrama de la reacción del radical AAPH durante el ensayo ORAC- FL.

Las mediciones se realizaron en placas negras de 96 pocillos. Se colocaron 20 µL de muestra/Trolox o buffer, seguido de 120 µL de solución de fluoresceína y se incubaron

a 37 °C por 10 minutos a oscuridad. Luego se adicionaron 60 µL de AAPH. Todas las soluciones de las muestras se prepararon por duplicado y cada una de las preparaciones se ensayó al menos por triplicado. Las mediciones de fluorescencia (RFU) se realizaron a 37°C cada un minuto por 90 minutos a longitudes de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm en un lector de microplacas de fluorímetro Varioskan Lux (Thermo Scientific) (Fernández et al., 2017).

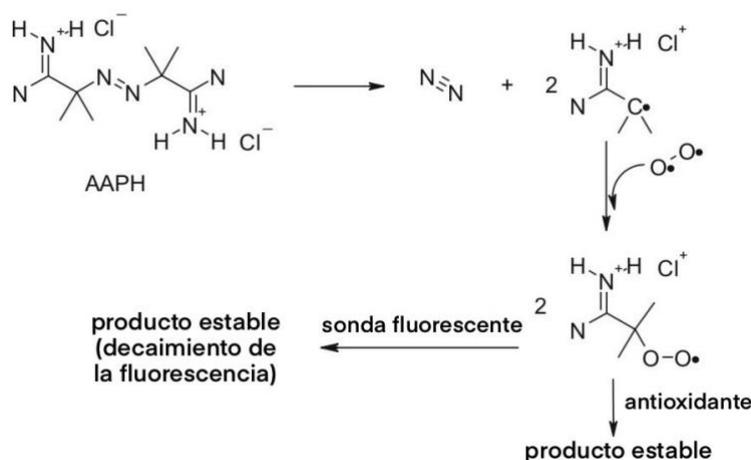


Figura 10. Reacción del reactivo AAPH durante el ensayo de ORAC-FL. Adaptado de Zulueta et al., 2009.

Luego de las medidas se graficó las áreas bajo la curva obtenidas en función de la concentración de Trolox y se expresaron los resultados como µmol de Trolox/g de muestra.

4.2.5. Evaluación del rendimiento

El porcentaje de rendimiento del secado por atomización de los extractos encapsulados y de los agentes encapsulantes se calculó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{masa obtenida}}{\text{masa inicial}} \times 100$$

(Ecuación 1)

El rendimiento del secado del extracto sin encapsular no pudo ser calculado debido a que no pudo ser sometido al secado por atomización.

4.2.6. Evaluación de la eficiencia de encapsulación

La eficiencia del proceso de encapsulación es un parámetro importante a determinar ya que indica el potencial de los agentes encapsulantes para encapsular los compuestos.

Para cumplir con dicho objetivo se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (descrito en Sección 4.2.2.1.) el contenido de compuestos fenólicos en la superficie de las nano-micropartículas y contenido de compuestos fenólicos libres luego de la desestabilización y ruptura de dichas nano-micropartículas.

Para la determinación del contenido de polifenoles en superficie previamente se dispersaron 150 mg de nano-micropartículas con 1,5 mL de etanol:metanol (1:1 v/v). La dispersión se agitó a temperatura ambiente por 1 minuto y luego se filtró (Robert et al., 2015).

Para la desestabilización y ruptura de las nano-micropartículas se dispersaron 150 mg de nano-micropartículas en 0,75 mL de acetonitrilo y en 0,75 mL de metanol:agua:ácido acético (50:8:42 v/v/v). Se agitó durante 1 minuto, se centrifugó y se filtró (Robert et al., 2015).

El porcentaje de eficiencia (EE) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% EE = \frac{\text{concentración de polifenoles totales} - \text{concentración de polifenoles en superficie}}{\text{concentración de polifenoles totales}} \times 100$$

(Ecuación 2)

4.2.7. Proceso de elaboración del yogur

Se realizaron 7 formulaciones de yogur:

- Yogur 1 - Encapsulante WPI+I (Y WPI+I)
- Yogur 2 - Encapsulante WPIH+I (Y WPIH+I)
- Yogur 3 - Extracto con encapsulante WPI+I (Y WPI+I+E)
- Yogur 4 - Extracto con encapsulante WPIH+I (Y WPIH+I+E)
- Yogur 5 - Extracto a la temperatura de secado por atomización (180 °C) (Y E 180)
- Yogur 6 - Extracto sin temperatura de secado (Y E s/t)
- Yogur 7 - Formulación base (Y B)

El procedimiento de elaboración consistió en calentar 800 mL de leche fluída entera UHT a 50 °C en el equipo “MyCook” (Taurus), durante 3 minutos a velocidad 3. Luego se adicionaron 16 g de leche descremada en polvo, 4 g de fécula de mandioca, 4 g de gelatina sin sabor, 10 g de CRL inulina (fibra soluble) y 0,32 g de stevia pura. La mezcla se llevó a 50 °C durante 5 minutos a velocidad 3 hasta obtenerse una mezcla homogénea y posteriormente se calentó a 90 °C por 5 minutos. Como siguiente paso 100 g de la mezcla se transfirieron a botellas de vidrio previamente esterilizadas en autoclave, se enfriaron y se adicionaron las muestras en polvo obtenidas por el secado por atomización. A las mezclas correspondientes a los yogures 1, 2, 5, y 6 se le agregaron 1 g de muestra en polvo, mientras que a las mezclas 3 y 4 0,5 g de muestra en polvo para mantener la relación de agregado de extracto en la formulación del yogur (encapsulante : extracto, 1:1). La mezcla correspondiente a la formulación base no se le agregó ninguna de las muestras en estudio.

Las mezclas se colocaron en estufa convencional a 42 °C para que todos los frascos alcancen la misma temperatura de incubación para llevar a cabo la fermentación. Cada botella con 100 g de mezcla se inoculó con 0,25 mL de fermento YO-MIX 495 LYO (250 DCU, que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie bulgaricus). Las mezclas se incubaron en la estufa a 42 °C hasta alcanzar un pH de 4,5. Una vez alcanzado dicho pH las botellas se colocaron en un baño de agua fría y se agitaron para obtener un batido de yogur, luego se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis.



Figura 11. Producción de las formulaciones de los yogures utilizando el equipo “MyCook”.

4.2.7.1. Determinación de color del yogur

El color es el primer contacto que tiene el consumidor con el alimento, por lo que su determinación es muy útil en control de calidad y desarrollo de productos alimenticios, además de que permite cuantificar el color en forma numérica. Para determinar el color se utilizó el sistema de color espacio CIELab, donde se define un espacio de coordenadas rectangulares (L^* , a^* , b^*) junto con otro espacio en coordenadas cilíndricas (L^* , C^*ab , hab)^{*} utilizando un colorímetro. Se obtienen los valores L , a y b siendo: L^* = luminosidad, a^* = Tendencia del color al rojo (positivo) o al verde (negativo), b^* = Tendencia del color al amarillo (positivo) o al azul (negativo) (Nielsen, 2017).

4.2.8. Estudios de bioaccesibilidad

Los estudios de bioaccesibilidad se realizaron mediante una simulación digestiva *in vitro*, tanto de los compuestos bioactivos presentes en el extracto sin encapsular y encapsulados, como incorporados en el yogur. La simulación se llevó a cabo mediante el protocolo que se describe en INFOGEST, el cual lleva un tiempo de entre 5 a 8 horas e implica la exposición del alimento o del compuesto bioactivo a las tres fases de la digestión: fase oral, gástrica e intestinal (Brodkorb et al., 2019).

La fase oral (2 minutos) tiene como objetivo generar un bolo ingerible con una consistencia similar al que se produce en el paso de la masticación. Consiste en la dilución del producto (1:1 en masa) con una mezcla preparada de electrolitos (pH 7,0) que simula el fluido salival (SSF). Para ello se colocaron 5 g de la muestra a evaluar con 3,5 mL de SSF, y se agregó 25 μ L de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 0,3 M (para lograr una concentración total de 1,5 mM en el SSF). A su vez, se agregó 0,5 mL de α -amilasa humana tipo IX (1500 U/mL preparada en SSF) para lograr una actividad de 75 U/mL en la mezcla final. Se agregó el agua restante (975 μ L) para llegar a un volumen final de la etapa oral de 5 mL. La mezcla se incubó durante 2 minutos a 37 °C y se registró su volumen final para posteriores cálculos (Brodkorb et al., 2019).

La fase gástrica (2 horas) consistió en adicionar 7,5 mL a la mezcla de la fase oral un fluido gástrico simulado (SGF) que contiene distintos electrolitos, hasta llegar a una relación de 1:1 (volumen/volumen). Luego el pH fue ajustado a 3 adicionando HCl 1 M y se agregó $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ para lograr una concentración total de 0,15 mM en el SGF. Posteriormente se adicionó 1,6 mL de pepsina porcina (25000 U/mL, actividad final 2000 U/mL). Se adicionó 5 μ L de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 0,3 M, aproximadamente 0,2 mL de HCl 1M (hasta llegar a pH 3) y volumen suficiente de agua destilada para llegar a 10 mL de volumen agregado en esta etapa (695 μ L). La mezcla gástrica permaneció bajo agitación lenta durante 2 horas a pH 3.0 a 37°C (Brodkorb et al., 2019).

Posteriormente, la fase del intestino (2 horas) comenzó agregando 11 mL del fluido intestinal simulado (SIF) a la mezcla gástrica hasta alcanzar una relación 1:1 (volumen/volumen). Se agregó 5 mL de solución de pancreatina (800 U/mL preparada en

SIF) y 2,5 mL de solución de bilis 160 mM. Se adicionó 40 μL de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 0,3 M para alcanzar una concentración de 0,6 mM en el SIF. Luego se verificó el pH, se ajustó a 7,0 con NaOH 1M (aproximadamente 0,15 mL) y se adicionó volumen suficiente de agua destilada para llegar a 20 mL de volumen agregado en esta etapa (1,31 mL). Las muestras fueron incubadas a 37 °C utilizando agitación durante 2 horas (Brodkorb et al., 2019).

Finalizada la simulación de la digestión *in vitro* de los sistemas en polvo y de las distintas formulaciones de yogures, se llevaron a cabo estudios de bioactividad *in vitro*. Se les determinó el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante por ABTS y ORAC-FL en la fracción bioaccesible, como se detalló previamente en la sección 4.2.3. y 4.2.4., respectivamente. El objetivo de este paso es evaluar principalmente si los compuestos bioactivos encapsulados e incorporados en el yogur resisten las condiciones gastrointestinales a las que estarán sometidos luego de su ingesta.

4.2.9. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Infostat para determinar las diferencias significativas usando el test de Tukey ($p < 0,05$). Todos los análisis mencionados se realizaron por triplicado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evaluación del rendimiento del secado por atomización

Como se muestra en la **Tabla 2** se lograron obtener los rendimientos de las muestras en polvo de todos los sistemas a excepción del sistema 5 (extracto sin encapsulante) debido a la precipitación de las antocianinas al pH estudiado de 7,0. Los sistemas en polvo obtenidos fueron de textura y tamaño adecuado para ser incorporados en las distintas formulaciones de yogur.

Como se observa, el rendimiento del proceso de secado por atomización de los diferentes sistemas varió entre los sistemas con el agregado de extracto en comparación con los sistemas de únicamente agente encapsulante. Esta variación en el rendimiento puede deberse a que las muestras con extracto debieron ser sometidas a filtración previo a su secado por atomización ya que las antocianinas comenzaron a precipitar, por lo tanto, en dicha filtración se pudo haber generado una pérdida de masa de muestra.

A su vez no hay grandes diferencias entre los sistemas que contienen únicamente agentes encapsulantes, por lo que ambos materiales encapsulantes son útiles para ser secados por atomización.

Tabla 2. Valores obtenidos de los rendimientos del secado de las diferentes muestras.

Muestra	Rendimiento (%)
WPI+I	46,83
WPIH+I	49,64
WPI+I+E	18,31
WPIH+I+E	18,62

5.2. Eficiencia de encapsulación

El sistema que presentó mayor eficiencia para encapsular a los compuestos presentes en el extracto corresponde al sistema que contiene a la proteína de suero lácteo no hidrolizada (WPI) (**Tabla 3**). Si bien se sabe que las proteínas son capaces de formar complejos con los polifenoles, en diferentes investigaciones se ha observado que dichas interacciones cambian cuando la proteína pasa de su estado nativo a su estado hidrolizado. Yin et al., (2020) demostraron que las interacciones entre las antocianinas y las proteínas de la leche, más precisamente entre la cianidina-3-glucósido y la caseína, cambian luego de la hidrólisis enzimática de la proteína generándose una interacción más débil luego de la hidrólisis.

Esto coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde se ve que la hidrólisis de la proteína de suero lácteo genera una disminución de la interacción con los polifenoles presentes en el extracto. La disminución de la interacción provoca una encapsulación más débil por parte de la proteína y por tanto una eficiencia de encapsulación más baja respecto al sistema que contiene a la proteína en su forma nativa.

Tabla 3. Valores obtenidos de la eficiencia de encapsulación de los diferentes agentes encapsulantes.

Muestra	Eficiencia de encapsulación (%)
WPI+I	29,71
WPIH+I	17,53

5.3. Determinación de humedad

Los resultados obtenidos de la determinación de humedad (**Tabla 4**) muestran que los sistemas que presentaron un mayor porcentaje de humedad corresponden a los que llevaron únicamente extracto.

Tabla 4. Valores obtenidos del porcentaje de humedad de las diferentes muestras. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar.

Muestra	Humedad (%)
WPI+I	3,4 \pm 0,25
WPIH+I	2,4 \pm 0,11
WPI+I+E	6,4 \pm 0,37
WPIH+I+E	8,9 \pm 0,08
E 180	38 \pm 0,17
E s/t	22 \pm 0,39

5.4. Determinación de contenido de polifenoles totales de las diferentes muestras antes y después de la digestión *in vitro*

Los resultados obtenidos del contenido de polifenoles totales (TPC) antes y después de su digestión *in vitro* de los sistemas en polvo y de los yogures se muestran en la **Figura 10** (a y b respectivamente).

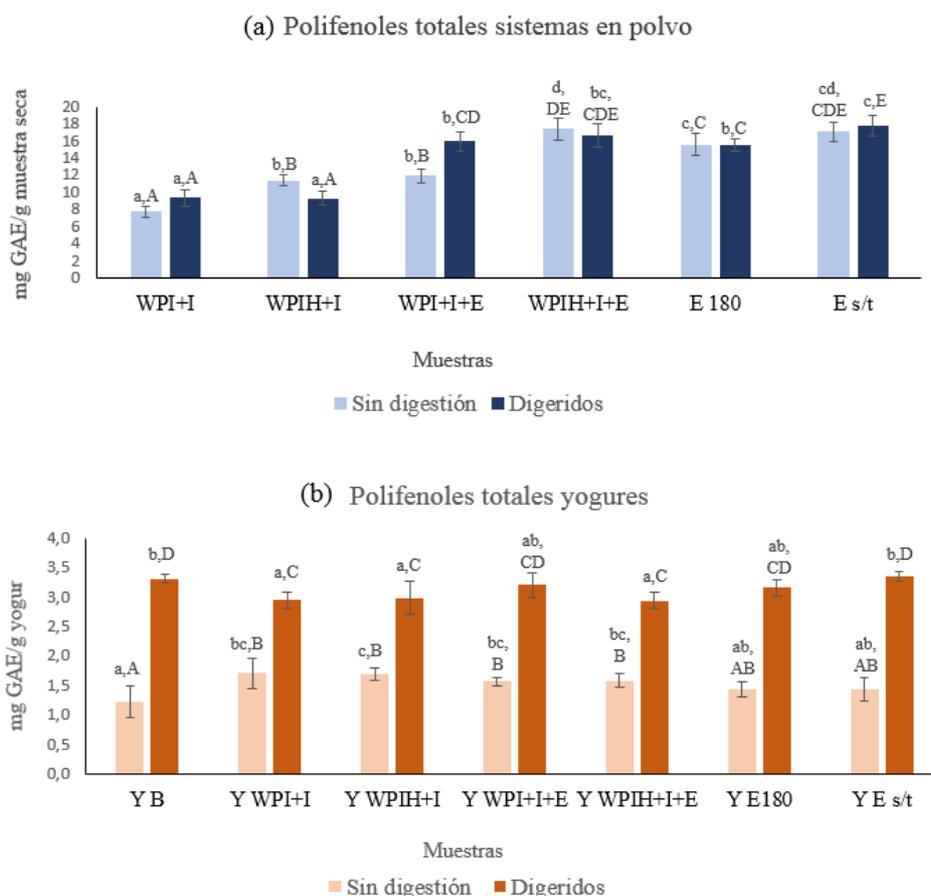


Figura 12. Contenido de polifenoles totales antes y después de la digestión *in vitro* de (a) los sistemas en polvo en base seca.

y (b) de los yogures. Las barras denotan los valores promedios y las barras de error la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas entre las muestras sin digestión separadas de los digeridos según Tukey ($p < 0,05$).

Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre todas las muestras (sin digestión y digeridos).

Como primer punto, se logra observar que no hay grandes diferencias del TPC entre el extracto sometido a temperatura (E 180) y el extracto sin temperatura (E s/t), tanto en sus condiciones originales como después de la digestión *in vitro* (**Figura 12 a**). Esto nos permite decir que mediante este ensayo la temperatura del secado por atomización (180 °C) y las condiciones gastrointestinales parecerían no afectar en gran medida al contenido de los polifenoles presentes en el extracto. Estos resultados no coinciden con los presentados en Fernández-Fernández et al. (2020) donde se vio que las condiciones de la digestión disminuían el TPC en un extracto hidro-alcohólico-ácido proveniente de la cáscara del orujo de una Tannat.

A su vez, se observa que el TPC del sistema que contiene extracto encapsulado con proteína de suero lácteo no hidrolizada (WPI+I+E) aumenta significativamente luego de la digestión *in vitro* respecto a su sistema blanco (WPI+I), por lo que el agente encapsulante estaría protegiendo al extracto presente en el sistema. El hecho de que el valor del contenido de polifenoles totales aumente luego de la digestión *in vitro* se debe a que luego de dicha digestión el material encapsulante se rompe y se liberan los compuestos fenolicos presentes en él. Dicho aumento no se observa para el extracto encapsulado con proteína de suero lácteo hidrolizada, lo que coincide con los resultados mostrados en la **Tabla 3**, donde se ve que dicho encapsulante tiene menor eficiencia de encapsulación.

Los valores altos del TPC observados en los sistemas sin el agregado de extracto (WPI+I y WPIH+I) se debe a que el reactivo que se utiliza en el ensayo de Folin-Ciocalteu no es específico para polifenoles. Los grupos -OH de los aminoácidos tirosina y triptófano presentes en las proteínas que forman parte de los sistemas encapsulantes son capaces de reducir al reactivo. Igualmente, se lo propone como un buen método para comparar contenido de polifenoles totales de diferentes muestras por la rapidez del ensayo.

El contenido de polifenoles totales antes y después de la digestión *in vitro* también fue evaluado en las distintas formulaciones de los yogures como se muestra en la **Figura 12 b**. Todas las formulaciones de los yogures mostraron un aumento significativo del TPC luego de la simulación de la digestión gastrointestinal alcanzando niveles similares. Nuevamente, el aumento del TPC de los digeridos de los yogures podría deberse a las proteínas de la leche que interfieren con el ensayo.

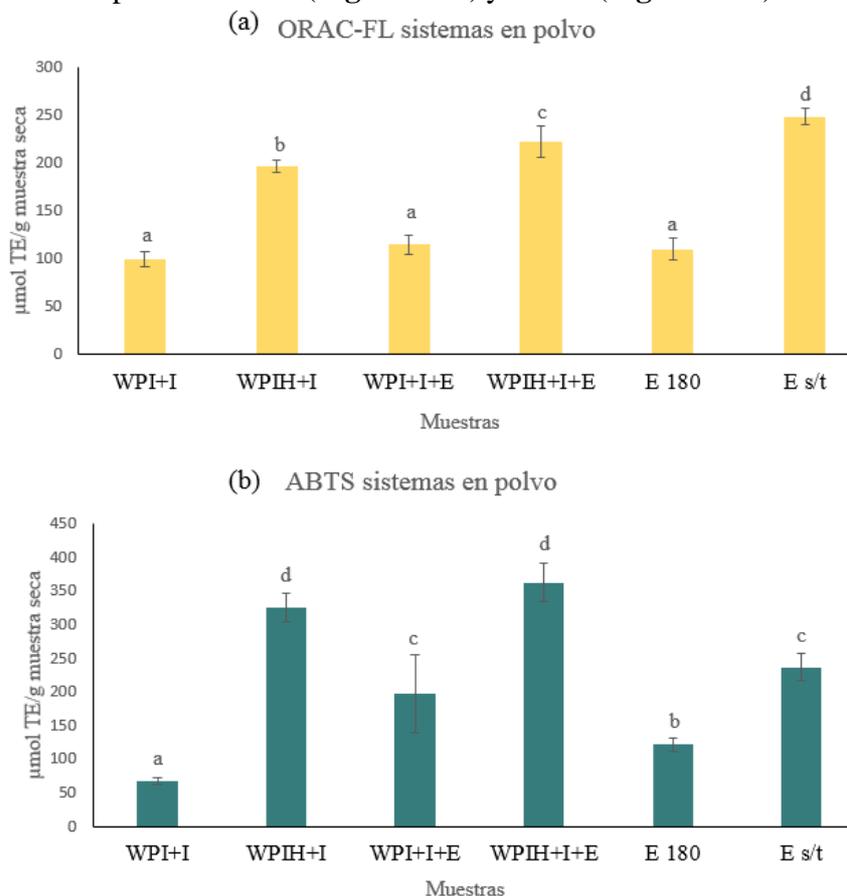
Para poder relacionar el contenido de polifenoles en las muestras con la capacidad antioxidante se realizaron los ensayos de ABTS y ORAC-FL como se detalla a continuación.

5.5. Determinación de la capacidad antioxidante

En este estudio dicha capacidad fue medida en las diferentes muestras por 2 ensayos distintos que contemplan los mecanismos de acción SET y HAT de los antioxidantes. La capacidad antioxidante fue determinada en los sistemas en polvo y en las muestras de yogur antes y después de la digestión *in vitro* con la finalidad de poder observar qué sucede con las muestras luego de que se simulan las condiciones de la digestión.

5.5.1. Determinación de la capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los sistemas en polvo

La determinación de la capacidad antioxidante es la bioactividad más estudiada en el orujo de uva, la cual está relacionada con la presencia de los compuestos fenólicos (Costa et al., 2019). A continuación, en la siguiente figura, se muestra la capacidad antioxidante medida por ORAC-FL (**Figura 13 a**) y ABTS (**Figura 13 b**) de los diferentes



sistemas en polvo.

Figura 13. Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL (a) y ABTS (b) de los sistemas en polvo en base seca. Las barras denotan los valores promedios y las barras de error la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

En ambos ensayos se vio la misma tendencia, mostrando que los sistemas que contienen a la proteína de suero lácteo hidrolizada (WPIH), tanto con extracto como sin extracto, tienen mayor capacidad antioxidante respecto a los sistemas que contienen a la proteína no hidrolizada (WPI). La mayor capacidad antioxidante en los sistemas con hidrolizado proteico se debe a que en la hidrólisis de la proteína se liberan péptidos bioactivos con capacidad antioxidante (Orsini Delgado et al., 2011).

Respecto a la capacidad antioxidante de los sistemas únicamente con extracto, se observa que el extracto que no fue sometido a la temperatura del trabajo del secador por atomización (E s/t) presentó una mayor capacidad antioxidante respecto al extracto sometido a 180 °C (E 180). Podemos decir que la temperatura del secado por atomización

afecta a los polifenoles presentes en la muestra y por lo tanto a su capacidad antioxidante. Esto destaca la importancia de realizar más de un ensayo cuando se quiere determinar la capacidad antioxidante, ya que estos resultados obtenidos no se logran observar por el ensayo de Polifenoles Totales. La disminución de la capacidad antioxidante proveniente de los polifenoles cuando se somete a la muestra a altas temperaturas coincide con los resultados obtenidos por Žilić et al. (2016) donde observaron que las antocianinas agregadas en galletas disminuían con la temperatura de cocción del producto (150 – 200 °C) y en consecuencia su capacidad antioxidante.

En distintas investigaciones se ha visto que la interacción entre los polifenoles y las proteínas afecta la función biológica de los polifenoles (Yin et al., 2020). Por lo tanto, quizás la falta de un aumento drástico de la capacidad antioxidante cuando se le agrega extracto a los sistemas puede deberse a que la interacción con la proteína encapsulante afecta la función biológica de las antocianinas presentes en el extracto. Además, la falta de aumento también podría deberse a la pérdida de polifenoles por exposición a las temperaturas de trabajo del secador por atomización debido a su baja eficiencia de encapsulación.

5.5.2. Determinación de la capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los digeridos de los sistemas en polvo

Determinar lo que sucede con la fracción bioaccesible es de suma importancia, ya que en la simulación de la digestión las condiciones gastrointestinales pueden afectar a los polifenoles presentes en la muestra. La capacidad antioxidante de los digeridos de los sistemas en polvo en la muestra se muestra en la

Figura 14.

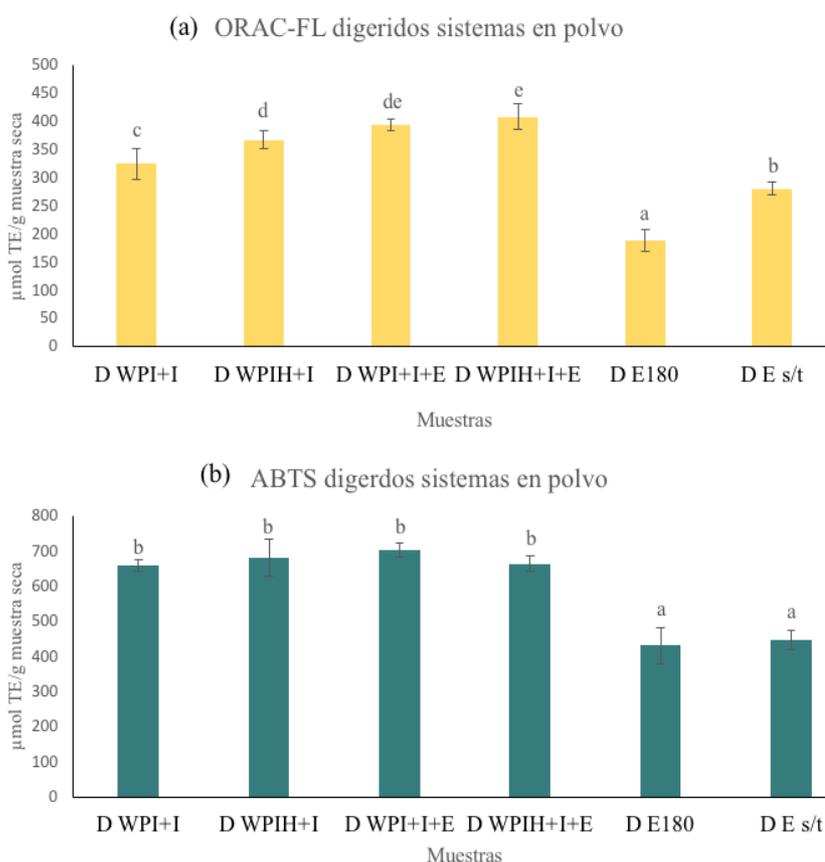


Figura 14. Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL (a) y ABTS (b) de los digeridos de los sistemas en polvo en base seca. Las barras denotan los valores promedio y las barras de error la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

La **Figura 14 a** muestra la capacidad antioxidante medida por ORAC-FL de los digeridos de los sistemas en polvo. En ella se logra observar que los digeridos de los sistemas encapsulantes que contienen la incorporación del extracto tienen una leve mayor capacidad antioxidante respecto a los sistemas que no llevaron extracto ($p < 0,05$). Se observa también que el extracto sometido a temperatura perdió capacidad antioxidante respecto al extracto sin someterse a temperatura, siguiendo la misma tendencia que antes de la simulación digestiva *in vitro*. Igualmente, la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en ambos extractos permanece luego de la digestión.

Respecto a la capacidad antioxidante medida por ABTS (**Figura 14 b**), luego de la digestión *in vitro* no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los 4 primeros sistemas que se presentan en la gráfica. Dichos sistemas luego de la digestión *in vitro* poseen la misma capacidad antioxidante medida por este ensayo. A su vez, comparando los digeridos de los sistemas en polvo que contienen únicamente extracto tanto sin temperatura (D E s/t) como sometidas a 180 °C (D E180) no se observan diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

Con estos resultados se vuelve a resaltar la necesidad de realizar dos ensayos diferentes que contemplen los distintos mecanismos de acción de los antioxidantes, debido a la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos en las muestras que tienen diferente resistencia frente a condiciones como temperatura y condiciones de la digestión con diferentes mecanismos de acción antioxidante.

Los resultados parecen indicar que la encapsulación del extracto favorece en cierta medida el aumento de la capacidad antioxidante durante la digestión.

5.5.3. Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los yogures

La mayor capacidad antioxidante medida tanto por ORAC-FL como por ABTS se observó para la formulación de yogur que contiene proteína de suero lácteo hidrolizada (Y WPIH+I) (**Figura 15**) respecto a la formulación base (YB). Nuevamente se confirma que la capacidad antioxidante aumenta por el agregado de péptidos bioactivos provenientes de la hidrólisis de las proteínas.

A su vez, dicha capacidad antioxidante se vió aumentada por el agregado de extracto en el caso de la determinación por ORAC-FL (**Figura 15 a**). Estos resultados coinciden con los presentados por Iriondo-DeHond et al. (2020) donde los yogures incorporados con extractos de subproductos de uva tinta mostraron un aumento significativo en su capacidad antioxidante, en comparación con los yogures de formulación base.

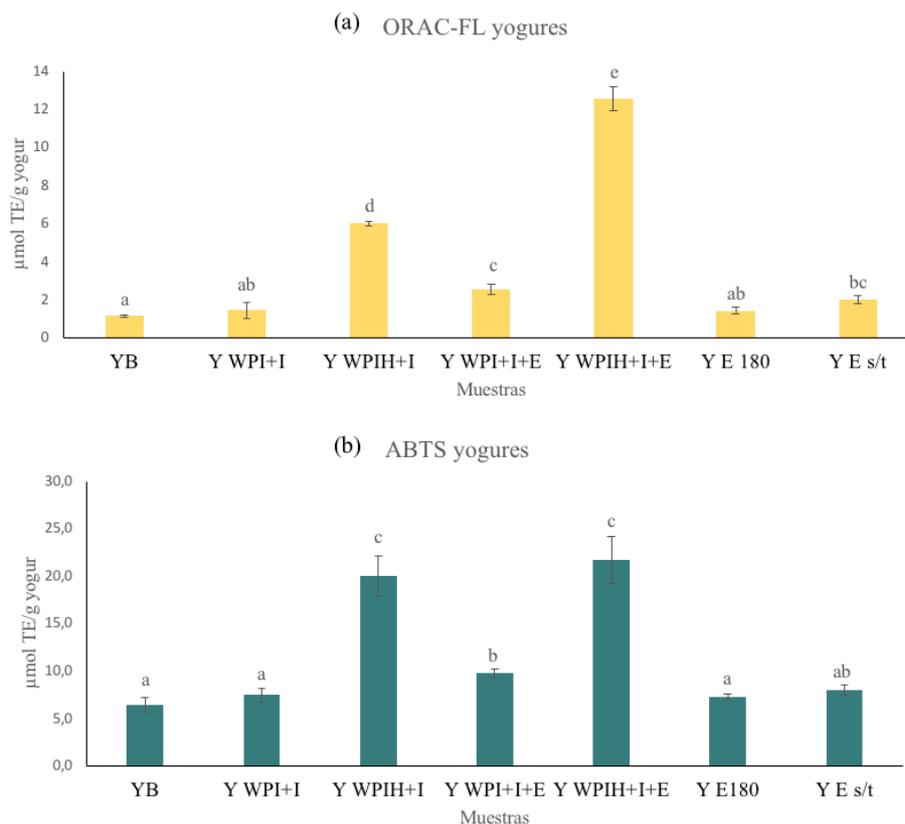


Figura 15. Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL (a) y ABTS (b) de las muestras de yogur. Las barras denotan los valores promedios y las barras de error la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

Si bien la capacidad antioxidante del yogur con proteína de suero lácteo hidrolizada (Y WPIH+I) aumenta y esto es benéfico para la salud, se debería estudiar el proceso tecnológico para evaluar su incorporación, ya que en las condiciones realizadas el yogur elaborado con dicho sistema se desestabilizó observándose separación de fases.

5.5.4. Determinación de capacidad antioxidante por ORAC-FL y ABTS de los digeridos de los yogures

La capacidad antioxidante medida por ORAC-FL de los digeridos de los yogures (**Figura 16 a**) muestra que todas las formulaciones presentan prácticamente la misma capacidad antioxidante a excepción del sistema con proteína de suero lácteo hidrolizada (D YWPIH+I). El hecho de que dicho sistema presente la menor capacidad antioxidante puede deberse a que los péptidos bioactivos liberados en la hidrólisis del agente encapsulante hayan sufrido degradación por parte de las enzimas proteolíticas causando una pérdida en su capacidad antioxidante. Que no se vea dicha disminución en el sistema con proteína de suero lácteo hidrolizada y extracto (D YWPIH+I+E) puede deberse a que

los polifenoles presentes en el extracto pueden resistir las condiciones de la simulación digestiva (Fernández-Fernández et al., 2020).

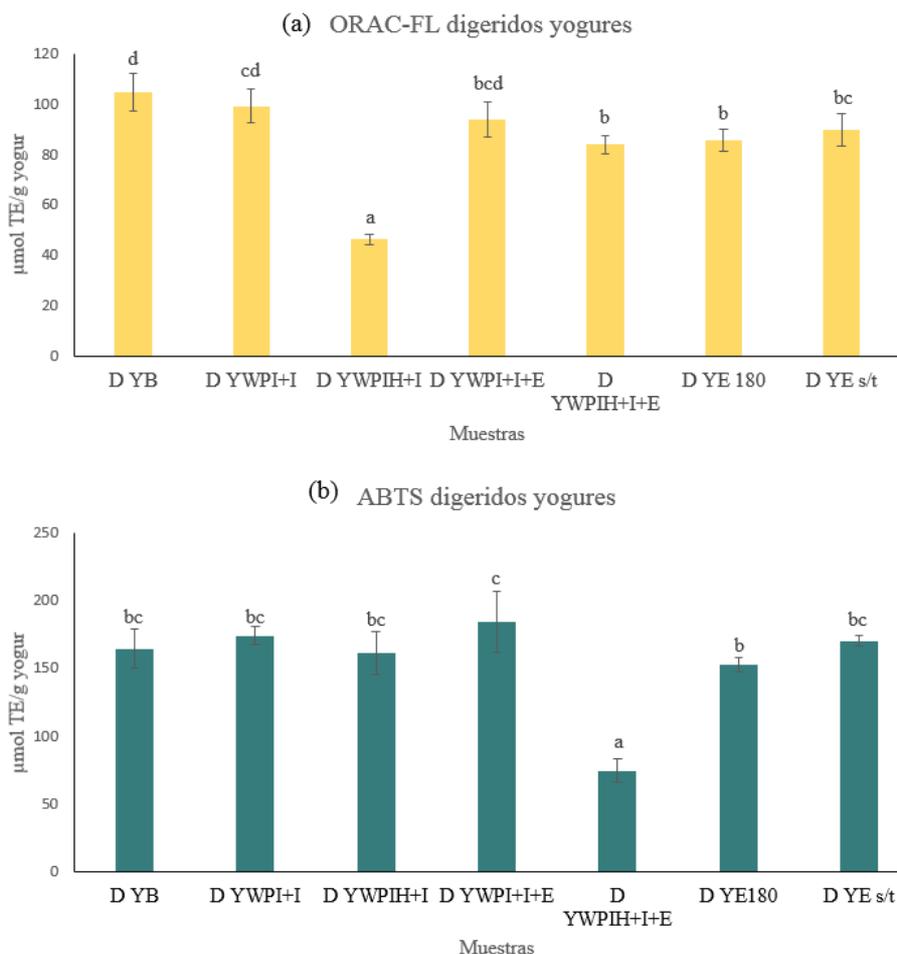


Figura 16. Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL (a) y ABTS (b) de las digestiones de los yogures. Las barras denotan los valores promedios y las barras de error la desviación estándar. Letras diferentes representa diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

Estos resultados no se observan en el ensayo de ABTS (**Figura 16 b**), donde se ve que la capacidad antioxidante es similar para todas las formulaciones a excepción de la formulación con proteína de suero lácteo hidrolizada y extracto (D YWPIH+I+E), por lo que se puede pensar que los polifenoles presentes en el extracto pierden capacidad antioxidante por el mecanismo SET.

5.5.5. Comparación de la capacidad antioxidante medida por ORAC-FL y ABTS de los sistemas en polvo antes y después de su digestión *in vitro*

Bajo las condiciones del tracto gastrointestinal los compuestos fenólicos se exponen a cambios físico-químicos (temperatura, cambios de pH y enzimas digestivas) que los afecta (Pinto et al., 2017). Por lo tanto, es importante determinar el efecto sobre las muestras luego de la incorporación de estos compuestos al ser sometidos a dichas condiciones del tracto gastrointestinales para evaluar sus potenciales propiedades biológicas.

En la siguiente figura se muestran los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante antes y luego de la digestión *in vitro* para los sistemas en polvo (Figura 17).

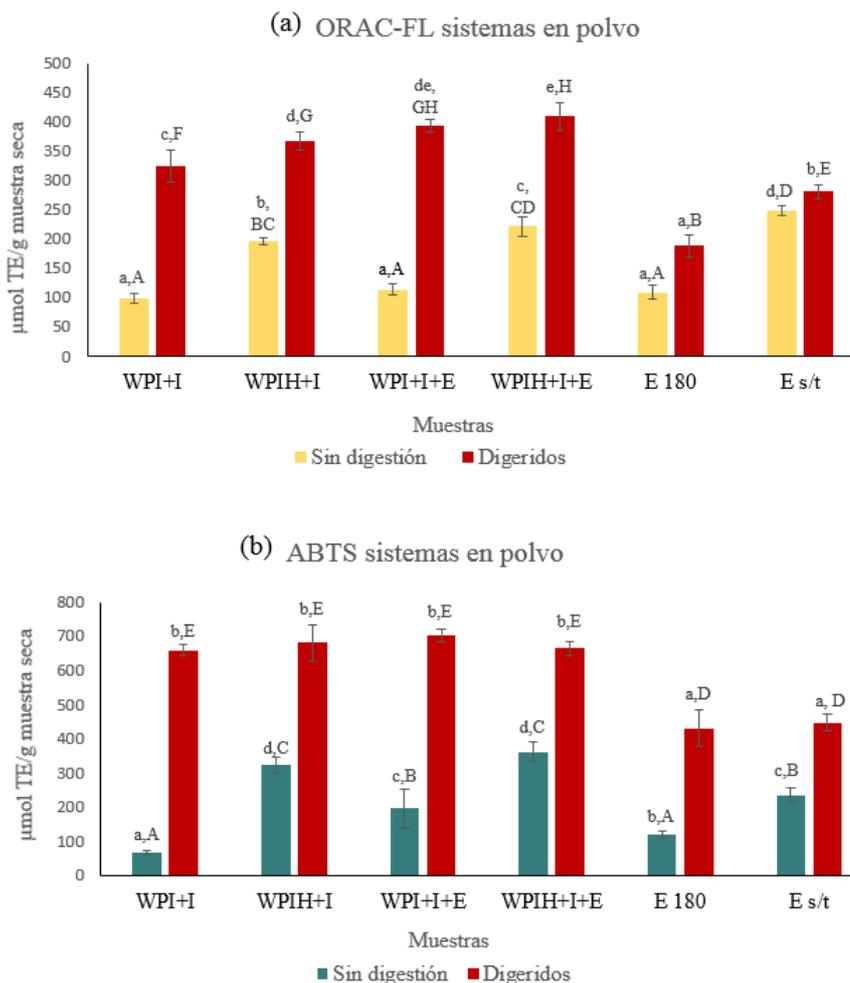


Figura 17. Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL (a) y ABTS (b) de los sistemas en polvo antes y después de la digestión *in vitro*. Las barras denotan los valores promedios y las barras de error la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas entre las muestras sin digestión separadas de los digeridos según Tukey ($p < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre todas las muestras (sin digestión y digeridos).

Como se logra observar, la capacidad antioxidante de los sistemas en polvo no se perdió luego de ser sometidas a las condiciones de la digestión, sino que la misma se vio aumentada. El aumento de dicha capacidad puede deberse a que en el proceso de la digestión *in vitro* las enzimas proteolíticas, que se utilizan para simular dicha digestión, hidrolizan a las proteínas provenientes de los agentes encapsulantes, liberando péptidos bioactivos que contribuyen al aumento de la capacidad antioxidante.

A su vez, en la **Figura 17** también se observa que luego de la digestión *in vitro*, los polifenoles presentes en las muestras sin encapsular se mantienen, por lo que en este caso estarían resistiendo a las condiciones de la digestión.

5.5.6. Comparación de la capacidad antioxidante medida por ORAC-FL y ABTS de los yogures antes y después de su digestión *in vitro*

En la **Figura 18** se muestran los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante antes y luego de la digestión *in vitro* para los yogures.

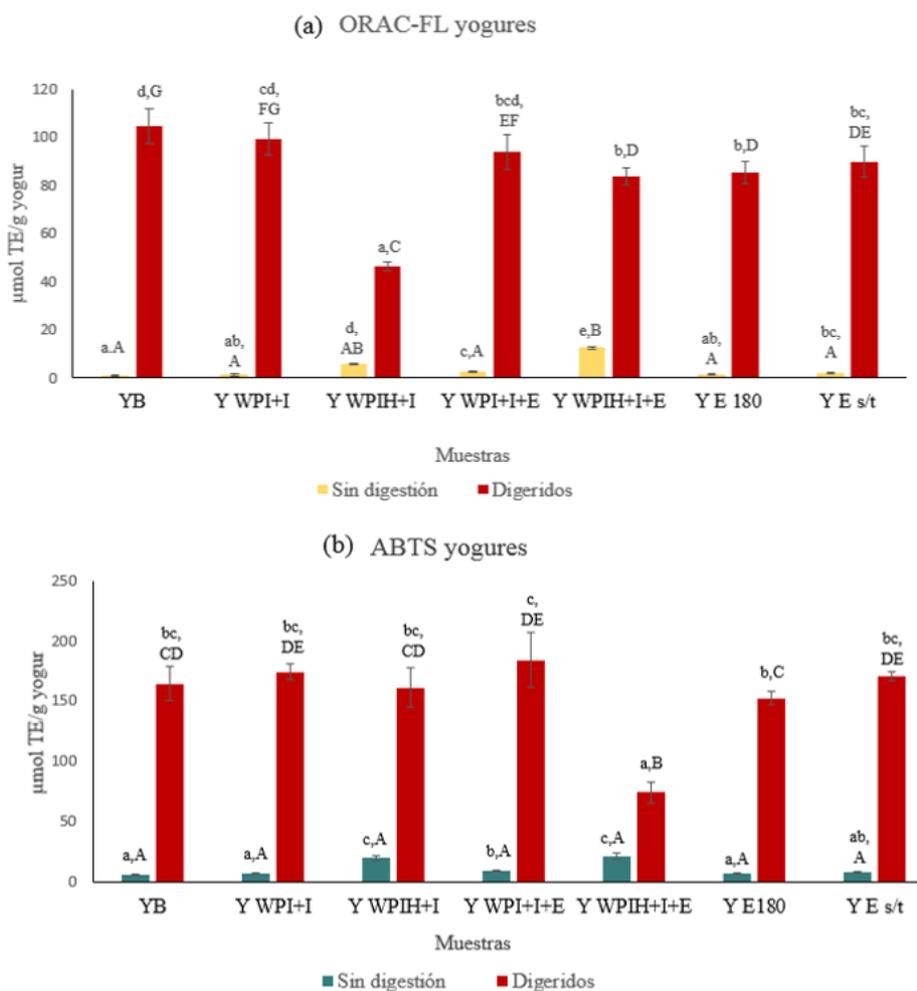


Figura 18. Capacidad antioxidante medida por ORAC-FL (a) y ABTS (b) de los yogures antes y después de la digestión *in vitro*. Las barras denotan los valores promedios y las barras de error la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas entre las muestras sin digestión separadas de los digeridos según Tukey ($p < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre todas las muestras (sin digestión y digeridos).

Respecto a los yogures antes y después de su digestión *in vitro*, se observa que luego de la digestión la capacidad antioxidante aumenta drásticamente para todas las formulaciones a excepción del sistema que contiene proteína de suero lácteo hidrolizada (WPIH+I). Dicho aumento en la mayoría de las formulaciones se debe a que en las condiciones de la digestión se hidrolizan las proteínas del yogur por parte de las enzimas proteolíticas de la digestión, generando así péptidos bioactivos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en Fernández-Fernández et al. (2018) donde observaron que la capacidad antioxidante de la α -lactoalbúmina hidrolizada con alcalasa aumentó luego de su digestión *in vitro*.

El hecho de que luego de la digestión *in vitro* la capacidad antioxidante de la formulación de yogur con proteína hidrolizada no aumente al mismo nivel que la formulación base puede deberse nuevamente a la degradación de los péptidos bioactivos por parte de las enzimas proteolíticas causando una pérdida en su actividad antioxidante.

5.6. Medición de color

Como parte de la caracterización del producto desarrollado se obtuvieron los resultados de color por el sistema CIELab los cuales se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Valores obtenidos mediante colorímetro de los parámetros L, a y b de las diferentes muestras de yogures. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar.

Muestra	L	a	b
WPI+I	79,23 \pm 0,47	-0,53 \pm 0,03	8,51 \pm 0,08
WPIH+I	74,55 \pm 0,98	-0,88 \pm 0,13	8,90 \pm 0,46
WPI+I+E	65,71 \pm 1,50	2,51 \pm 0,12	3,36 \pm 0,26
WPIH+I+E	58,66 \pm 1,20	3,83 \pm 0,11	2,05 \pm 0,25
E 180	69,90 \pm 1,90	2,23 \pm 0,07	2,70 \pm 0,22
E s/t	66,01 \pm 0,20	2,58 \pm 0,08	1,82 \pm 0,08
Formulación base	79,16 \pm 0,67	-0,97 \pm 0,59	8,80 \pm 0,22

Respecto a la luminosidad (L), las muestras con contenido de extracto presentaron valores de luminosidad menores que las muestras sin extracto. Esto se debe a la presencia de antocianinas en el extracto las cuales aportan coloración oscura mostrando una mayor absorción de la luz y por lo tanto una menor luminosidad. El menor valor de L obtenido corresponde a la formulación del yogur de WPIH+I+E correspondiéndose con el resultado de una menor eficiencia de encapsulación en comparación con el yogur WPI+I+E. Los yogures con la incorporación únicamente de extracto mostraron un valor de L mayor a los anteriores pudiéndose deber a la poca homogeneidad del extracto en el yogur.

En cuanto al valor “a”, las muestras con incorporación de extracto presentaron valores positivos lo cual es coherente por la tendencia al color violeta del yogur. A su vez, entre las formulaciones WPIH+I+E y WPI+I+E la muestra con valor más alto de “a” y por tanto mayor color violeta, es la que contiene proteína hidrolizada (WPIH) mostrándose que las antocianinas no se encapsularon de la misma forma que lo hicieron en el sistema con la proteína no hidrolizada.

Observando los valores del parámetro “b” se aprecian grandes diferencias entre las muestras con y sin incorporación de extracto. Las formulaciones de los yogures controles (WPI+I, WPIH+I y formulación base) presentaron valores positivos y mayores indicando una tendencia más al color amarillo mientras que los yogures con presencia de extracto tanto encapsulado como sin encapsular presentaron valores de “b” menores indicando que presentan una tonalidad más cercana al azul.

La incorporación del extracto al yogur generó un color violeta en él, lo cual podría resultar atractivo para el consumidor. Además, hoy en día existe una tendencia cada vez mayor en el uso de colorantes naturales en la industria (Žilić et al., 2016) debido a las exigencias por parte de los consumidores en la actualidad (Iriundo-Dehond et al., 2018).

En este sentido, el subproducto de la industria vitivinícola podría ser utilizado como colorante natural, contribuyendo al manejo de este residuo abundante que genera problemas ambientales.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrollaron encapsulados de antioxidantes naturales provenientes de un extracto del subproducto de la vinificación de uva Tannat (cáscara del orujo de uva Tannat) mediante secado por atomización, los cuales fueron posteriormente incorporados en distintas formulaciones de yogures, siendo éste un producto muy consumido a nivel mundial.

En este estudio se determinó que el tratamiento térmico del secado por atomización afectó a los polifenoles presentes en las muestras.

Además, si bien la capacidad antioxidante del yogur mejora luego de la incorporación de los sistemas en polvo, se observó que la mayor contribución al aumento de dicha capacidad no se da por el extracto, sino que se genera por los péptidos bioactivos presentes en el material encapsulante. Por lo tanto, se propone a dichas formulaciones de yogur como posibles alimentos funcionales.

En cuanto a las fracciones bioaccesibles de los sistemas en polvo, las mismas mostraron un aumento de su capacidad antioxidante debido a la liberación de péptidos bioactivos en la simulación de las condiciones de la digestión gastrointestinal. Respecto a los yogures, las fracciones bioaccesibles de todas las formulaciones mostraron tener una capacidad antioxidante alta por la liberación de los péptidos bioactivos presentes en las proteínas de la leche que forma parte del yogur.

Las formulaciones de los yogures con el agregado de extracto mostraron un característico color violeta que podría ser atractivo para los consumidores, por lo que se propone al extracto como colorante natural para ser utilizado para el desarrollo de yogures novedosos. A su vez, no se descarta la posibilidad de que el extracto aumente otras propiedades bioactivas en el yogur, diferentes de la capacidad antioxidante medida, que deberán ser determinadas.

En conclusión, la capacidad antioxidante determinada en los yogures desarrollados con el extracto encapsulado por secado por atomización, representan resultados alentadores para continuar con la valorización del subproducto de la industria vitivinícola uruguaya como es la cáscara proveniente del orujo de uva Tannat.

7. REFERENCIAS

- Agnetti, C., Jorcín, S., Medrano, A., & López, T. (2019). Encapsulation of whey protein isolate hydrolysate by spray drying as delivery systems in functional foods. In *Proceedings of the 1st Ibero-American Congress of Bioactive Peptides (CIAPep)*.
- Anandharamakrishnan, C., & Ishwarya, S. (2015). Introduction to spray drying. In *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation* (Issue 1872, pp. 1–36). <https://doi.org/10.1002/9781118863985.ch1>
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por aspersión y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. *Información Tecnológica*, 25(3), 31–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300006>
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Beres, C., Freitas, S. P., Godoy, R. L. de O., de Oliveira, D. C. R., Deliza, R., Iacomini, M., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. C. (2019). Antioxidant dietary fibre from grape pomace flour or extract: Does it make any difference on the nutritional and functional value? *Journal of Functional Foods*, 56(March), 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.014>
- Beres, C., Simas-Tosin, F. F., Cabezudo, I., Freitas, S. P., Iacomini, M., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. C. (2016). Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. *Food Chemistry*, 201, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.039>
- Boido, E., Alcalde-Eon, C., Carrau, F., Dellacassa, E., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6692–6704. <https://doi.org/10.1021/jf061240m>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Bruzzone, F., Ares, G., & Giménez, A. (2013). Temporal aspects of yoghurt texture perception. *International Dairy Journal*, 29(2), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.012>
- Chew, B., Mathison, B., Kimble, L., McKay, D., Kaspar, K., Khoo, C., Chen, C. Y. O., & Blumberg, J. (2019). Chronic consumption of a low calorie, high polyphenol cranberry beverage attenuates inflammation and improves glucoregulation and HDL cholesterol in healthy overweight humans: a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 58(3), 1223–1235. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1643-z>
- Costa, J. R., Amorim, M., Vilas-Boas, A., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., Pastrana, L., & Pintado, M. (2019). Impact of: In vitro gastrointestinal digestion on the chemical composition, bioactive properties, and cytotoxicity of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah grape pomace extract. *Food and Function*, 10(4), 1856–1869. <https://doi.org/10.1039/c8fo02534g>

- Dávila, I., Robles, E., Egüés, I., Labidi, J., & Gullón, P. (2017). The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products. In *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions* (pp. 29–53). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00002-8>
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- El-Messery, T. M., El-Said, M. M., Demircan, E., & Özçelik, B. (2019). Microencapsulation of Natural Polyphenolic Compounds. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 18(1), 25–34.
- Fazilah, N. F., Hamidon, N. H., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Wasoh, H., & Halim, M. (2019). Microencapsulation of *Lactococcus lactis* Gh1 with Gum Arabic and *Synsepalum dulcificum* via Spray Drying for Potential Inclusion in Functional Yogurt. *Molecules*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071422>
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.010>
- Fernández-Fernández, A. M., Iriundo-DeHond, A., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., & del Castillo, M. D. (2019). Assessment of antioxidant, antidiabetic, antiobesity, and anti-inflammatory properties of a Tannat winemaking by-product. *European Food Research and Technology*, 245(8), 1539–1551. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03252-w>
- Fernández-Fernández, A. M., Iriundo-DeHond, A., Nardin, T., Larcher, R., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., & Castillo, M. D. del. (2020). In Vitro Bioaccessibility of Extractable Compounds from Tannat Grape Skin Possessing Health Promoting Properties with Potential to Reduce the Risk of Diabetes. *Foods*, 9(11), 1575. <https://doi.org/10.3390/foods9111575>
- Fernández, A., López-Pedemonte, T., & Medrano, A. (2017). Evaluation of Antioxidant, Antiglycant and ACE-Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of α -Lactalbumin. *Food and Nutrition Sciences*, 08, 84–98. <https://doi.org/10.4236/fns.2017.81006>
- Fidelis, M., de Oliveira, S. M., Sousa Santos, J., Bragueto Escher, G., Silva Rocha, R., Gomes Cruz, A., Araújo Vieira do Carmo, M., Azevedo, L., Kaneshima, T., Oh, W. Y., Shahidi, F., & Granato, D. (2020). From byproduct to a functional ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in a yogurt model. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1131–1140. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17173>
- Fuentes-Berrio, L., Acevedo-Correa, Di., & Geivez-Ordoñez, V. M. (2015). FUNCTIONAL FOODS: IMPACT AND CHALLENGES FOR DEVELOPMENT AND WELFARE SOCIETY COLOMBIAN. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 140–149. <https://www.revistavirtualpro.com/biblioteca/produccion-y-aplicacion-de-enzimas-industriales>
- Garzón, G. (2008). Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds: A Review. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27–36. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2008000300002
- Georgiev, V., Ananga, A., & Tsoleva, V. (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391–415.

- <https://doi.org/10.3390/nu6010391>
- Helal, A., & Agliazucch, D. (2018). Impact of in-vitro gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antio-annotated.pdf. *Food Science and Technology*, 89, 164–170.
- Hernandez, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial* (1st ed.). EUNED.
- INAVI. (2019). *ESTADÍSTICAS DE VIÑEDOS - DATOS NACIONALES 2019*.
- Iriondo-DeHond, M., Blázquez-Duff, J. M., del Castillo, M. D., & Miguel, E. (2020). Nutritional quality, sensory analysis and shelf life stability of yogurts containing inulin-type fructans and winery byproducts for sustainable health. *Foods*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/foods9091199>
- Iriondo-Dehond, M., Miguel, E., & Del Castillo, M. D. (2018). Food byproducts as sustainable ingredients for innovative and healthy dairy foods. *Nutrients*, 10(10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu10101358>
- José Víctor Calderón Salinas, E. G. M. R., & Escorza, M. A. Q. (2013). ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES MELLITUS. *Reb*, 32(2), 53–66.
- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., & Teissedre, P. L. (2014). Wine by-Products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules*, 19(1), 482–506. <https://doi.org/10.3390/molecules19010482>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. In *Clinical Interventions in Aging* (Vol. 13, pp. 757–772). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lucena, A. P. S., Nascimento, R. J. B., Maciel, J. A. C., Tavares, J. X., Barbosa-Filho, J. M., & Oliveira, E. J. (2010). Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.004>
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
- MSP. (2012). *Reglamento bromatológico nacional* (Sexta edic).
- MSP. (2013). *Enfermedades No Transmisibles | Ministerio de Salud Pública*. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/enfermedades-no-transmisibles-0>
- Nielsen, S. (2017). *Food Analysis* (D. Heldman (ed.); 5th ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5>
- OIV. (2015). *Organización de la Viña y el Vino*. <http://www.oiv.int/es/organizacion-internacional-de-la-vina-y-el-vino>
- OMS. (2018). *Enfermedades no transmisibles*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- OPS Uruguay. (2016). *Frenar avance de diabetes implica alimentación saludable, ejercicio y diagnóstico precoz*. https://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=article&id=1035:frenar-avance-de-diabetes-implica-alimentacion-saludable-ejercicio-y-diagnostico-precoz&Itemid=451
- OPS Uruguay. (2019). *Etiquetado de alimentos*. https://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=article&id=1229:etiquetado-de-alimentos&Itemid=310
- Orsini Delgado, M. C., Tironi, V. A., & Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of

- amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1752–1760.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.002>
- Pazzini, C. E. F., Colpo, A. C., Poetini, M. R., Pires, C. F., de Camargo, V. B., Mendez, A. S. L., Azevedo, M. L., Soares, J. C. M., & Folmer, V. (2015). Effects of red wine Tannat on oxidative stress induced by glucose and fructose in erythrocytes in vitro. *International Journal of Medical Sciences*, 12(6), 478–486.
<https://doi.org/10.7150/ijms.10529>
- Perdigón, G., De Moreno De Leblanc, A., Maldonado Galdeano, C., Chaves, S., Carmuega, E., & Weill, R. (2009). *Alimentos funcionales*.
- Petrotos, K. B., Karkanta, F. K., Gkoutosidis, P. E., Giavasis, I., Papatheodorou, N., & Ntontos, A. C. (2012). Production of Novel Bioactive Yogurt Enriched with Olive Fruit Polyphenols. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 64, 867–872.
- Piccardo, D., & González-Neves, G. (2013). Extracción de polifenoles y composición de vinos tintos Tannat elaborados por técnicas de maceración prefermentativa. *Agrociencia Uruguay*, 17(1), 36–44. <https://doi.org/10.2477/vol17iss1pp36-44>
- Pinto, J., Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., Fernández-de Córdova, M. L., Molina-García, L., & Castilho, P. C. (2017). Polyphenolic profile and antioxidant activities of Madeiran elderberry (*Sambucus lanceolata*) as affected by simulated in vitro digestion. *Food Research International*, 100, 404–410.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.044>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox, H., Robles-Sánchez, R. M., & González-Aguilar, G. A. (2011). Interacción De Compuestos Fenólicos Y Fibra Dietaria: Capacidad Antioxidante Y Biodisponibilidad. *BIOTecnia*, 13(3), 3.
<https://doi.org/10.18633/bt.v13i3.91>
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). The Microbiology of Wine and Vinifications. In *The Microbiology of Wine and Vinifications* (2nd ed., Vol. 1). John Wiley & Sons.
<https://doi.org/10.1002/0470010363>
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(7), 1386–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>
- Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C., & Carmen, S. (2015). The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. *Food Science and Technology*, 60(2), 1039–1045.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.038>
- Romero, P., & Otiniano, M. (2010). Propuesta para implementar el secado por atomización en el proceso de activación de la bentonita con ácido sulfúrico. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 13(2), 78–88.
- Sakundech, K., Chompoosan, C., Tuchpramuk, P., Boonsorn, T., & Aengwanich, W. (2020). The influence of duration on pain stress, oxidative stress, and total antioxidant power status in female dogs undergoing ovariohysterectomy. *Veterinary World*, 13(1), 160–164. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.160-164>

- Schulze, M. B., Martínez-González, M. A., Fung, T. T., Lichtenstein, A. H., & Forouhi, N. G. (2018). Food based dietary patterns and chronic disease prevention. *BMJ*, *361*, k2396. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2396>
- Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., & Al-Hiary, M. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, *102*(5), 1397–1400. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, *51*(3), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>
- Skapino, E., Alvarez Vaz, R., & Skapino, M. E. (2016). Prevalencia de factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles en funcionarios de una institución bancaria del Uruguay. *Revista Uruguaya de Cardiología*, *31*(2), 246–255.
- Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, *138*(1), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.148>
- Yin, Z., Wu, Y., Chen, Y., Qie, X., Zeng, M., Wang, Z., Qin, F., Chen, J., & He, Z. (2020). Analysis of the interaction between cyanidin-3-O-glucoside and casein hydrolysates and its effect on the antioxidant ability of the complexes. *Food Chemistry*, *340*(August 2020), 127915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127915>
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*(2), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, *8*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
- Žilić, S., Kocadağlı, T., Vančetović, J., & Gökmen, V. (2016). Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compound stability, antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn flour. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.057>
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, *114*(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>