



Licenciatura en Ciencias Biológicas

Trabajo Final de Graduación

Extracción de compuestos bioactivos de los residuos del
caupí y su efecto tecnológico y funcional en una bebida a
base de la legumbre

AUTOR: Castillo, Fernando Ezequiel

DIRECTORA: Dra. Ma. Victoria Traffano Schiffo

CO-DIRECTORA: Dra. Felicitas Peyrano

LUGAR: Instituto de Química Básica y Aplicada del
Nordeste Argentino (IQUIBA-NEA)

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción	5
2.1. Legumbres	5
2.2. <i>Vigna unguiculata</i> (caupí). Generalidades, origen y producción.	5
2.3. Fundamentos de la investigación	6
2.4. Ultrasonido de alta intensidad como método para la extracción de polifenoles.....	7
3. Objetivos generales y específicos	9
3.1. Objetivo general	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. Hipótesis de trabajo	9
5. Materiales y Métodos.....	10
5.1. Materiales.....	10
5.2. Diseño experimental para la optimización de la obtención de un extracto polifenólico a partir de vaina de caupí	10
5.3. Preparación de bebida a base de caupí	11
5.3.1. Incorporación del extracto a bebida a base de caupí	11
5.3.2. Caracterización del extracto polifenólico y de las bebidas a base de caupí (control y adicionadas)	11
5.4. Análisis estadístico.....	13
6. Resultados	14
6.1. Optimización de la extracción de compuestos polifenólicos de las vainas de caupí.....	14
6.2. Efecto de la incorporación del extracto polifenólico a la bebida a base de caupí	18
6.2.1 Efecto de la incorporación del extracto en características físicas de la bebida durante el almacenamiento	19
6.2.2. Efecto de la incorporación del extracto en las propiedades funcionales de la bebida a base de caupí	23
6.2.3 Evaluación del efecto antioxidante del extracto polifenólico en la estabilidad oxidativa de lípidos en las bebidas a base de caupí	25
7. Discusión	26
8. Conclusiones	29

9. Agradecimientos	31
10. Bibliografía	32
EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA	36
OBSTÁCULOS Y DIFICULTADES EN EL DESARROLLO DEL PLAN	37
EVALUACIÓN DE DIRECTORES	38

1. Resumen

Vigna unguiculata o comúnmente conocido como caupí es un cultivo ampliamente adaptado a zonas tropicales y subtropicales del mundo, con una producción de 7.407.924 toneladas en 2017. En África, se produjeron alrededor de 7,1 millones de toneladas, mientras que, en Argentina, en el año 2018 se exportaron 346 toneladas. Es una legumbre altamente nutritiva. Sus semillas poseen un elevado contenido de proteínas de buena calidad nutricional y propiedades tecno-funcionales que las hacen aptas para la formulación de alimentos a base de proteínas vegetales. En los últimos años, se están produciendo cambios de hábitos por parte de los consumidores, que buscan incorporar componentes a la dieta que ayudan a modular algunas funciones fisiológicas específicas en el organismo, con el objetivo de favorecer el bienestar y la salud. Las vainas de caupí son un subproducto agrícola que se clasifica como biomasa lignocelulósica que resulta ser una potencial fuente de compuestos bioactivos como los compuestos polifenólicos (CPF). El aprovechamiento integral del caupí y el desarrollo de un alimento a base del mismo resultaría una alternativa interesante para combatir la vulnerabilidad socio-económica de la región siendo necesarios estudios de bioprospección para realzar el valor nutritivo y tecno-funcional. El objetivo del presente trabajo fue optimizar el proceso de obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos a partir de las vainas de caupí e incorporarlo en una bebida a base de semillas de caupí a fin de aumentar la capacidad antioxidante y la estabilidad química de los lípidos de la bebida. Para ello, se optimizó la extracción de los CPF, realizando un estudio estadístico por superficie de respuesta, utilizando el modelo Box-Behnken con 3 variables: % de etanol (X_1 : 0-50%), % amplitud de ultrasonido (X_2 : 0-80%) y tiempo total de tratamiento de ultrasonido de alta intensidad (X_3 : 0-20 minutos) y en donde las respuestas estudiadas en cada muestra fueron: contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante. Una vez obtenidos los resultados para todas las corridas, se evaluó la condición óptima y la misma fue validada mediante las respuestas estudiadas, determinando como condición óptima una extracción con 50% v/v etanol, 20% amplitud de ultrasonido en un tiempo de tratamiento de 15 min. En una segunda etapa, el extracto polifenólico (EPF) óptimo se incorporó a una bebida vegetal a base de caupí desarrollada por el grupo de investigación, aumentando su capacidad antioxidante y la estabilidad química, en función de las concentraciones agregadas (0, 0,1 y 0,5 %), y se evaluaron las características físicas, el contenido de polifenoles totales, la actividad antioxidante (radical libre ABTS^{•+} y FRAP) y la oxidación lipídica (sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico), al día 1 y 15 de su preparación. Concluyendo qué, los EPF obtenidos de vainas de caupí podrían ser utilizados como potenciales antioxidantes, sin alterar significativamente la estabilidad física de las bebidas vegetales.

2. Introducción

2.1. Legumbres

Los frijoles, arvejas, lentejas, maní y similares, pertenecen a la familia de las leguminosas y sus semillas comestibles se denominan legumbres. Las leguminosas constituyen una de las familias botánicas más importantes desde el punto de vista nutricional, siendo un componente importante de la dieta mediterránea y esencial en la de numerosos países en desarrollo. Legumbres tales como garbanzo, lenteja, altramuz, guisante y habas son reconocidas como fuentes de proteínas, almidón, fibra, vitaminas y minerales (Rios-Castillo et al., 2018).

Las legumbres poseen un alto valor nutricional e importantes beneficios para la salud. Son alimentos con alto aporte de proteínas (en un rango de 17% a 35%), fibra dietética (~20%) y micronutrientes esenciales para los humanos como vitaminas del complejo B y folato; minerales como el potasio, hierro, calcio, magnesio, zinc; y un reducido aporte de grasas (<4%) (Varshney et al., 2011). Poseen también un índice glicémico bajo, lo que significa que los carbohidratos complejos son transformados en azúcar y pasados a la sangre de forma más lenta y uniforme, permitiendo así una mejor regularización de los niveles de glicemia en sangre (Jenkins et al., 2012).

Las organizaciones de salud de todo el mundo recomiendan consumir legumbres como parte de una alimentación saludable, particularmente porque tienen un rol importante en el control y prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Las legumbres, además, favorecen al control del peso corporal, ya que dan mayor saciedad, evitan la acumulación de grasa abdominal y regulan los niveles de azúcar en sangre (Rios-Castillo et al., 2018).

2.2. *Vigna unguiculata* (caupí). Generalidades, origen y producción.

El Caupí es una Legumbre de la familia Fabaceae, es un cultivo versátil que se cultiva anualmente. Presenta un ápice muy agudo, miden de 6 a 18 cm de largo. Las inflorescencias tienen raquis largos y cilíndricos, que sale de la axila de las hojas y lleva al final unas pocas flores. Este raquis se alarga después de la fecundación, de modo que, en los tipos arbustivos, las vainas maduras sobresalen del follaje (León, 1968). Es un cultivo muy antiguo, originado y domesticado en el continente africano, que se expandió antes de la era cristiana a Europa y Asia, y llegó hasta China, donde se sometió a un cultivo intenso y es en donde se desarrollaron numerosos cultivares (León, 1968).

Está ampliamente adaptado a zonas tropicales y subtropicales del mundo (Carvalho et al., 2012), con una producción de 7.407.924 toneladas en 2017. En África, se produjeron alrededor de 7,1 millones de toneladas, mientras que, en Argentina, en el año 2018 se exportaron 346 toneladas, según datos del SENASA. En el nordeste de Argentina, el caupí es producido frecuentemente por pequeños y medianos agricultores para el consumo personal y/o el comercio. Si bien el clima y las condiciones ambientales son idóneas para su cultivo a gran escala en dicha región, un trabajo exhaustivo de bioprospección es necesario para fomentar los beneficios nutricionales, tecnológicos, usos y aplicaciones de este cultivo poco aprovechado.

El caupí posee un elevado contenido de proteínas (22-25%) de buena calidad nutricional (Avanza et al., 2013) y propiedades funcionales que lo hacen apto para la formulación de alimentos (Avanza et al., 2012;

Peyrano et al., 2016). Esta legumbre presenta además un alto contenido de carbohidratos, minerales y de compuestos bioactivos como polifenoles (Avanza et al., 2021; Traffano-Schiffo et al., 2020).

2.3. Fundamentos de la investigación

En los últimos años se registraron importantes cambios en los hábitos de consumo impulsados por la aparición de evidencia científica vinculada con el estudio de los distintos componentes de la dieta en torno a su capacidad de modular algunas funciones fisiológicas específicas en el organismo y, de esta manera, favorecer el bienestar y la salud. Por tal motivo, se están produciendo continuos avances en el desarrollo de los alimentos que son percibidos como más saludables, conocidos como alimentos funcionales, constituyendo en la actualidad un mercado en alza y uno de los principales impulsores del desarrollo de nuevos productos (Fuentes Cuiña et al., 2019).

Dado que el papel de los alimentos funcionales se fundamenta en la presencia de compuestos bioactivos, el objetivo entonces, se centra en condicionar la presencia de determinados compuestos, bien incrementando la proporción de aquellos que exhiben efectos beneficiosos, o bien limitando el contenido de los que tienen consecuencias nocivas. Existen distintas estrategias (tecnológicas o biotecnológicas) asociadas a los sistemas de producción (animal o vegetal), procesos de elaboración, conservación y consumo, aplicadas para modificar cuali- y/o cuantitativamente la composición de los mismos. Dichos procedimientos moldean la presencia de numerosos compuestos (endógenos y exógenos) con diferentes efectos potenciales sobre el organismo (Jiménez-Colmenero, 2013). En este contexto, el desarrollo de ingredientes funcionales, ricos en compuestos bioactivos, han demostrado potenciales propiedades para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas tales como diabetes, obesidad, cáncer, entre otras (Traffano-Schiffo et al., 2020).

Los alimentos a base de plantas están ganando popularidad y su mercado se está desarrollando rápidamente. Esta tendencia se basa en factores como los cambios de estilos de vida, el interés por las dietas alternativas y la producción sostenible de alimentos y especialmente de proteínas.

Con el tiempo, las tecnologías han evolucionado para incluir el desarrollo de alternativas vegetales a la leche de vaca, especialmente en la formulación de alimentos para infantes y adultos mayores, que sean ricos en proteínas, minerales y vitaminas. Las principales semillas que se han utilizado en la producción de leche vegetal son las de soja, maní, almendra y arroz (Nelson et al., 1976; Senayah, 1993; Mäkinen et al., 2016); pero en la Argentina y más específicamente en la región del NEA, se comercializan muy poco, siendo las bebidas a base de soja y a base de almendra prácticamente las únicas accesibles. Estos productos, son emulsiones preparadas a partir de extractos acuosos de material vegetal desintegrado, disperso y soluble, que muchas veces requieren la incorporación de lípidos de alguna fuente externa (Diarra et al., 2005; Jeske et al., 2017; 2018). Las características de las emulsiones están asociadas con la calidad y la aceptabilidad de varios alimentos como los lácteos, embutidos, aderezos, siendo la separación de fases y la oxidación de lípidos los principales inconvenientes del deterioro de estas emulsiones (Cheetangdee y Benjakul, 2017). Estudios previos sobre bebidas de caupí reportan que las mismas hacen un aporte calórico bajo, por lo que es necesario buscar diferentes fuentes de lípidos que aumenten el contenido energético manteniendo la aceptabilidad (Akinyele, 1991).

La FAO (Food and Agriculture Organization) fomenta la bioeconomía mundial, la cual “alude a una economía que usa biomasa en lugar de recursos fósiles para producir alimentos y bienes no alimentarios, como bioplásticos y productos biofarmacéuticos” y recomienda coordinar a nivel mundial una bioeconomía que no deje a nadie marginado (FAO, 2018). En este sentido, la utilización de desechos agrícolas como un recurso abundante, bio-renovable y de bajo costo para la elaboración de productos de alto valor es de gran importancia para el mundo moderno, sin embargo, el conocimiento sobre esta temática de actualidad es limitado.

Numerosos compuestos derivados de residuos agrícolas han mostrado potenciales propiedades bioactivas, pudiendo ser utilizados como agentes para la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades humanas crónicas, tales como diabetes, obesidad, cáncer, enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, etc. Asimismo, estos compuestos se pueden utilizar como aditivos o suplementos alimentarios para mejorar las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales (Nguyen, 2017).

Las vainas de las legumbres son un subproducto generado a partir de la separación y procesamiento de las semillas, para la producción de harinas o su utilización en recetas alimentarias, y se clasifican como biomasa lignocelulósica sin almidón. Estos desechos agrícolas contienen azúcar polimerizada en forma de celulosa y hemicelulosa, las cuales pueden ser liberadas por un proceso de hidrólisis y subsecuente fermentación a alcohol utilizando microorganismos (Onyelucheya et al., 2016). Asimismo, las vainas contienen altos niveles de CPF, los cuales tienden a aumentar con la madurez de la planta mientras que disminuye la concentración en taninos (Chikagwa-Malunga et al., 2009). El contenido de los compuestos fenólicos varía según genotipo, madurez, condiciones ambientales, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento (Quiñones, 2012).

Una particularidad interesante de los polifenoles es su actividad antioxidante previniendo la propagación de radicales libres (RL). Los RL pueden actuar sobre biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, causando enfermedades importantes como cáncer, diabetes, problemas cardiovasculares, envejecimiento y síndromes metabólicos (Van Acker et al., 1996; Venereo Gutiérrez, 2002). Los antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA o hidroxibutilanisol) y el hidroxitolueno butilado (BHT o Butilhidroxitolueno) son utilizados frecuentemente como aditivos alimentarios para preservar las grasas, sin embargo, se ha informado que pueden causar daño pulmonar y tener efecto carcinogénico (Jayakumar et al., 2009). Por lo tanto, en los últimos años ha incrementado notablemente el interés en el uso de antioxidantes naturales provenientes de fuentes vegetales, que actúen como sistema de defensa en el cuerpo humano y libre de efecto secundario.

2.4. Ultrasonido de alta intensidad como método para la extracción de polifenoles

El ultrasonido de alta intensidad es un método limpio, sencillo, rápido y verde, y su aplicabilidad para la extracción de CPF a partir de matrices alimentarias ha sido ampliamente demostrada (Awika y Duodu, 2017). Las ondas de ultrasonido causan la ruptura mecánica de la pared celular liberando los componentes bioactivos y, a su vez el calentamiento local del solvente aumenta la difusión del extracto, mejorando así la transferencia de masa a través de la interfase sólido-líquido. Los efectos mecánicos de la sonicación inducen a una mayor disolución del solvente en las paredes y membranas celulares, facilitando la liberación del contenido de las células y mejorando la transferencia de masa (MedinaTorres et al., 2017). Si bien la extracción asistida por ultrasonido muestra un aumento en el rendimiento de recuperación de compuestos fenólicos, parámetros como

frecuencia, tiempo, temperatura, relación solvente/muestra, entre otros, se deben optimizar para aumentar el rendimiento de las extracciones y no afectar las propiedades antioxidantes (Boussetta et al., 2012).

La extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad es preferencial para la extracción de compuestos vegetales de interés debido a su versatilidad y capacidad de usar menos o ningún solvente orgánico, su simplicidad de operación, su eficiencia, su capacidad para preservar la actividad biológica de los compuestos extraídos, menor dependencia del tiempo y su escalabilidad a nivel industrial, entre otros (Dzah et al., 2020). Sin embargo, es necesario ajustar los parámetros de operación para realizar la extracción de polifenoles y alcanzar un mayor rendimiento y selectividad.

El objetivo del presente trabajo es optimizar la extracción de CPF de la vaina (subproducto) del caupí, mediante la extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad utilizando agua y etanol como solventes, además, evaluar la aplicación de dicho extracto polifenólico en un alimento bebible a base de caupí para aumentar su capacidad antioxidante y la estabilidad química de los lípidos.

En base a lo expuesto, el desarrollo de un alimento a base de caupí resultaría una alternativa interesante para combatir la vulnerabilidad socio-económica de los lugareños siendo necesarios estudios de bioprospección para realzar su valor nutritivo y tecno-funcional. Asimismo, lograr un mayor conocimiento sobre los compuestos bioactivos presentes en los desechos agrícolas y sus potenciales aplicaciones industriales.

3. Objetivos generales y específicos

3.1. Objetivo general

Generar conocimiento para lograr un aprovechamiento y valorización integral del caupí de la región del Nordeste Argentino, de tal forma de obtener productos innovadores, con capacidad antioxidante y aplicable a la industria alimentaria.

3.2. Objetivos específicos

- Optimizar el proceso de obtención de un extracto rico en CPF de los subproductos (vainas) del Caupí.
- Incorporar el extracto rico en CPF en una bebida a base de caupí, a fin de aumentar la capacidad antioxidante y la estabilidad química de los lípidos.

4. Hipótesis de trabajo

- 1- Las vainas de caupí cultivadas en la región poseen CPF que pueden ser extraídos por maceración (agua/etanol) y/o ultrasonido de alta intensidad.
- 2- Los extractos ricos en compuestos polifenólicos aumentan la capacidad antioxidante y la estabilidad química de los lípidos de una bebida a base de Caupí.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

Se trabajó con *Vigna unguiculata*, utilizando vainas de la variedad Colorado y semillas de la variedad Cuarentón, provista por la Estación Experimental Agropecuaria El Sombrero, Corrientes (INTA). Se realizó una selección de las semillas y vainas sanas, sin ataque de patógenos y sin decoloraciones, que posteriormente se sometieron a una molienda fina en un molinillo eléctrico (ARCANO FW100, Argentina) y se tamizó a través de una malla ASTM 80 (250 μ m). Las harinas obtenidas (de vainas y de semillas) se conservaron en bolsas de polietileno dentro de un recipiente herméticamente cerrado a 4 °C hasta su uso (Avanza et al., 2012).

5.2. Diseño experimental para la optimización de la obtención de un extracto polifenólico a partir de vaina de caupí

A fin de optimizar la extracción de los CPF a partir de la harina de vaina, se estudió la extracción mediante la utilización de una tecnología verde o “ecofriendly” (ultrasonido de alta intensidad), utilizando una sonda de ultrasonido apta para solventes orgánicos (219-B, CV334 model, Sonics, USA) de 13 mm de diámetro, conectada a un procesador ultrasónico de alta intensidad con control automático de temperatura (VCX500, Sonics, USA). La sonda se colocó dentro de la solución, dejando 1 cm desde la base del vaso de precipitados, a una frecuencia de 20 kHz y a una potencia de 500 W. Se evitó el sobrecalentamiento de la muestra durante el tratamiento colocando el vaso de precipitados en un baño con hielo (Fig. 1). Se aplicó un diseño experimental de metodología de superficie de respuesta, teniendo en cuenta 3 factores: solvente de extracción X_1 : 0 - 50% de etanol en agua; amplitud del ultrasonido de alta intensidad X_2 : 0 - 80%; y tiempo total de tratamiento de ultrasonido X_3 : 0 - 20 min sobre una relación sólido:solvente 1:15 (harina de vaina:solvente). Las variables respuestas estudiadas fueron: contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante por la determinación del radical ABTS^{•+}. Mediante la utilización del software DesignExpert® versión 11 (Design Expert, Stat-Ease Inc., USA) y la bibliografía consultada, se seleccionó el diseño experimental más adecuado para evaluar las 3 variables mencionadas, teniendo en cuenta 3 puntos centrales para cada uno de los factores. La optimización del proceso se realizó priorizando la máxima capacidad antioxidante y el máximo contenido de compuestos polifenólicos totales (5 estrellas para cada parámetro). Luego de la aplicación de ultrasonido de alta intensidad, el extracto se centrifugó a 8000 rpm por 15 min a 25 °C, se filtró a vacío utilizando papel Whatman No. 4. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y las muestras que contenían etanol se sometieron a un proceso de evaporación por destilación utilizando un rotavapor hasta la eliminación completa del solvente orgánico (Fig. 2). Posteriormente, se liofilizaron hasta sequedad total y los polvos obtenidos se conservaron de forma hermética a 4 °C hasta su uso.

Se utilizó la técnica de optimización gráfica y numérica del software Design Expert® para optimizar la respuesta siguiendo el criterio de deseabilidad. Se realizaron tres corridas de la solución óptima y se introdujeron en el modelo para la predicción puntual.



Figura 1: Sonda de ultrasonido de alta intensidad y vaso recipientado cubierto con hielo.



Figura 2: proceso de evaporación por destilación utilizando un rotavapor.

5.3. Preparación de bebida a base de caupí

Una vez finalizada la validación de la superficie de respuesta y teniendo el extracto óptimo con máximo contenido de polifenoles totales y máxima actividad antioxidante, éste se incorporó a una bebida a base de caupí. Se mezcló harina obtenida a partir de las semillas de variedad cuarentón con agua destilada en una relación 1:4 (p/p) y se llevó a pH $10,0 \pm 0,5$ con NaOH 1 M. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 min controlando el pH y se centrifugó a 6000 g, a 20 °C durante 10 min (condiciones óptimas de extracción de proteínas según trabajos previos de Peyrano et al., 2019). Se obtuvo así, un extracto proteico al cual se le determinó la concentración de proteínas (Lowry, 1951). Se ajustó la concentración de proteínas al 3% y se incorporó la fase oleosa (aceite de girasol o chía al 1,5% v/v). La mezcla se homogeneizó durante 1 min a 18.000 rpm utilizando un ultraturrax T25, equipado con un agitador de 7,5 mm de diámetro (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Alemania) y luego, se aplicaron 5 pulsos de 30 s de ultrasonido de alta intensidad al 70% de amplitud (VCX500H, Sonics & Materials, INC). Finalmente, la bebida se pasteurizó a 90 °C por 20 min y se conservó en heladera a 4 °C hasta su análisis

5.3.1. Incorporación del extracto a bebida a base de caupí

Con el fin de aumentar la capacidad antioxidante y la estabilidad química de los lípidos, el extracto de vaina de caupí optimizado se incorporó en diferentes concentraciones (0,1 y 0,5% p/p) a la bebida de caupí, en la etapa previa a la homogeneización (Cheetangdee y Benjakul 2017). Además, como control se trabajó con una bebida de caupí sin incorporación de extracto (0%).

5.3.2. Caracterización del extracto polifenólico y de las bebidas a base de caupí (control y adicionadas)

5.3.2.1. Cuantificación de polifenoles totales: Se realizó de acuerdo al método de FolinCiocalteu, tal y como se explicó anteriormente en el apartado 5.2.1 (Siddhuraju y Becker, 2007).

5.3.2.2. Capacidad antioxidante: La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por medio de dos técnicas relacionadas con la prevención de procesos de oxidación. Radical libre ABTS^{•+} [2,29-azinobis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ver sección 5.2.2 (Re et al., 1999) y FRAP (capacidad de reducción férrica), siguiendo el protocolo propuesto por Benzie y Strain, (1996). Para ello, el reactivo de FRAP se preparó con 2,5 mL de una solución de 2,4,6-tris (2-piridil) s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM, 2,5 mL de cloruro

férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM y 25 mL de tampón acetato 0,3 M a pH 3,6. Se colocaron en una microplaca de 96 pocillos, 20 μL de cada muestra (o blanco) y se mezclaron con 280 μL del reactivo de FRAP, recién preparado. Se dejó reaccionar durante 30 min al resguardo de la luz para luego realizar la lectura de la absorbancia a 593 nm utilizando un lector de multiplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific™, Vantaa, Finlandia). La curva estándar se realizó utilizando trolox en diferentes concentraciones (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25 y 0,4 mg/mL). Los resultados obtenidos se expresaron como equivalentes μmol de Trolox por mL de muestra ($\text{mmol}_{\text{TROLOX}}/\text{L}_{\text{muestra}}$).

5.3.2.3. Determinación del contenido de proteína: El contenido total de proteínas del extracto óptimo fue determinado a través del método de micro Kjeldahl (AOAC, 1990), utilizando 6,25 como factor de conversión de nitrógeno en proteínas y se expresó como porcentaje de proteína total (%). En primer lugar, se realizó la digestión de la muestra en $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{K}_2\text{SO}_4$ en presencia de HgO como catalizador. El producto de digestión se destiló por arrastre de vapor, recogiendo el NH_3 resultante en un erlenmeyer que contenía H_3BO_3 4% junto con el indicador (rojo de metilo-verde de bromocresol). Posteriormente, se tituló el destilado obtenido utilizando HCl previamente valorado (0,01N).

5.3.2.4. Estabilidad física: se colocó 10 mL de las muestras en tubos de vidrio y se almacenó a 4 °C. Las observaciones se hicieron al día 1 y 15 después de la preparación. La estabilidad física de la emulsión luego de aplicar una fuerza centrífuga (1 min a 3500 rpm) se estimó indirectamente como la relación entre la turbidez (absorbancia a 600 nm) de la fase superior de la bebida luego y antes de centrifugar (Pearce y Kinsella, 1978).

5.3.2.5. Color: Se utilizó un colorímetro Chroma Meter CR-300C, (MINOLTA, Osaka, Japón) para medir los parámetros del sistema CIE Lab: L^* , a^* y b^* . El parámetro L^* representa la luminosidad, los parámetros a^* y b^* representan variación entre rojizo ($+a^*$) y verdoso ($-a^*$), y entre amarillento ($+b^*$) y azulado ($-b^*$), respectivamente. A partir de estos valores, es posible calcular el parámetro variación

de color (ΔE^*) obtenido como $\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$, que determina la diferencia de color total que existe entre dos objetos o muestras (Rodrigo et al., 2007). A modo comparativo, los parámetros de color fueron medidos también a una leche de vaca (parcialmente descremada marca Ilolay) y a una bebida vegetal a base de soja (marca Ades, sabor natural), ambas comerciales.

5.3.2.6. Perfil de distribución de tamaño de partículas: se determinó el perfil de distribución de tamaño de partícula utilizando un equipo por dispersión de luz láser estática (Analysette 22 NextNano Fritsh, Alemania). Se analizaron los parámetros diámetro promedio en superficie $D_{3,2}$ (diámetro medio de las esferas de área superficial equivalente) y $D_{4,3}$ diámetro promedio en volumen (diámetro medio de las esferas de volumen equivalente) y el índice de polidispersidad (Span), utilizando el valor del índice de refracción del aceite 1,330 (Jorcín et al., 2012).

El valor $D_{3,2}$ proporciona información sobre la superficie creada durante la emulsificación (área superficial específica) y la distribución de tamaño de partícula en superficie muestra qué porcentaje de la

superficie total creada está compuesta por partículas de los distintos rangos de tamaño. El diámetro $D_{4,3}$ está directamente asociado a la distribución en volumen y es más sensible a la presencia de partículas de mayor tamaño. Por último, el parámetro span es una medida del ancho de la distribución y se calcula como:

$$Span = \frac{(x,0,9) - (x,0,1)}{(x,0,5)} \quad (1)$$

Donde $(x, 0,1)$, $(x, 0,5)$ y $(x, 0,9)$ corresponden a los percentiles estándar del análisis, y x representa la distribución elegida.

5.3.2.7. Evaluación del efecto antioxidante del extracto polifenólico en la estabilidad oxidativa de lípidos en las bebidas a base de caupí: El ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se usó como screening y monitoreo de la peroxidación lipídica de las muestras en el tiempo y se relacionó con la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales (Cheetangdee y Benjakul, 2017). Las muestras de bebidas de caupí (control y adicionadas con 0,1 y 0,5% de extracto polifenólico) fueron colocadas en tubos plásticos de 15 mL estériles y cerrados herméticamente y se mantuvieron a 4 °C y al resguardo de la luz. Las muestras se mezclaron con una solución de ácido tiobarbitúico (TBA) (0,375% de TBA, 15% de ácido tricloroacético y 0,25 N de HCl) a una relación de 1:5 (v/v). La mezcla se calentó a 100 °C durante 30 min. Después de enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 532 nm. Las TBARS se estimó utilizando malondialdehído (MDA) como estándar, y se informó como $\text{mg}_{\text{MDA}} \text{Equiv/L}_{\text{muestra}}$ (Aewsiri et al., 2009 con las modificaciones propuestas por Cheetangdee y Benjakul, 2017).

5.4. Análisis estadístico. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se evaluaron a través de análisis de varianza (ANOVA) utilizando el ensayo de diferencias significativas LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Para ello, se utilizó el Programa Infostat (Di Rienzo et al., 2008).

6. Resultados

6.1. Optimización de la extracción de compuestos polifenólicos de las vainas de caupí

En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración de etanol, la amplitud de ultrasonido de alta intensidad y el tiempo de tratamiento de ultrasonido en el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante total en el extracto de vaina de caupí, a través de un modelo estadístico de superficie de respuesta de Box-Behnken de tres puntos centrales. Como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, el objetivo fue maximizar estas propiedades en el extracto resultante. En la Tabla 1 se pueden observar los valores codificados y reales para cada una de las variables.

Tabla 1. Valores codificados y reales del diseño experimental para la optimización de la extracción (asistida por ultrasonido de alta intensidad) del contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de vaina de caupí colorado.

Std	Corrida	Valor codificado			Valor real		
		Concentración etanol (%) (X1)	Amplitud US (%) (X2)	tiempo tratamiento (min) (X3)	Concentración etanol (%) (X1)	Amplitud US (%) (X2)	tiempo tratamiento (min) (X3)
7	1	-1	0	1	0	40	20
13	2	0	0	0	25	40	12,5
3	3	-1	1	0	0	80	12,5
6	4	1	0	-1	50	40	5
10	5	0	1	-1	25	80	5
12	6	0	1	1	25	80	20
9	7	0	-1	-1	25	0	5
15	8	0	0	0	25	40	12,5
2	9	1	-1	0	50	0	12,5
14	10	0	0	0	25	40	12,5
1	11	-1	-1	0	0	0	12,5
4	12	1	1	0	50	80	12,5
11	13	0	-1	1	25	0	20
5	14	-1	0	-1	0	40	5
8	15	1	0	1	50	40	20

Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo de un polinomio de segundo orden, a fin de obtener los coeficientes de regresión. El análisis de regresión se realizó utilizando la siguiente ecuación (Aslan et al., 2007):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2)$$

Donde Y corresponde a la respuesta predicha (variable dependiente); β_0 , el coeficiente constante; β_1 , el coeficiente lineal; β_{11} , el coeficiente cuadrático; β_{ij} , el coeficiente de interacción y; e es el error del modelo. Por último, X_i y X_j son las variables independientes del modelo.

Como se puede observar en la Tabla 1, el modelo consistió en 15 ensayos, en donde el análisis de los datos de contenido de compuestos fenólicos se ajustó a un modelo cuadrático reducido con un coeficiente de regresión R^2 de 0,9354) y la actividad antioxidante a un modelo 2FI reducido ($R^2 = 0,8642$). Los resultados obtenidos para cada una de las variables respuestas se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores y respuestas obtenidas para las variables en el diseño experimental.

Std	Corrida	Factores			Respuestas	
		Concentración ethanol (%) (X1)	Amplitud US (%) (X2)	tiempo tratamiento (min) (X3)	Contenido fenoles totales (mg _{GAE} /g _{extracto})	Actividad antioxidante TEAC (mmol/g _{extracto})
7	1	0	40	20	30,9721	0,5322
13	2	25	40	12,5	33,6595	1,005
3	3	0	80	12,5	40,4488	0,8976
6	4	50	40	5	52,5796	1,123
10	5	25	80	5	45,694	1,0098
12	6	25	80	20	32,7076	0,8574
9	7	25	0	5	30,7695	1,0835
15	8	25	40	12,5	35,5598	0,9742
2	9	50	0	12,5	56,7255	1,2874
14	10	25	40	12,5	37,2049	1,1947
1	11	0	0	12,5	32,6717	0,5491
4	12	50	80	12,5	48,5971	1,1365
11	13	25	0	20	48,6155	1,124
5	14	0	40	5	38,2046	0,9715
8	15	50	40	20	55,7292	1,2789

Las gráficas de superficie de respuesta de tres dimensiones y los gráficos de contornos de dos dimensiones se pueden observar en las Figuras 3 y 4.

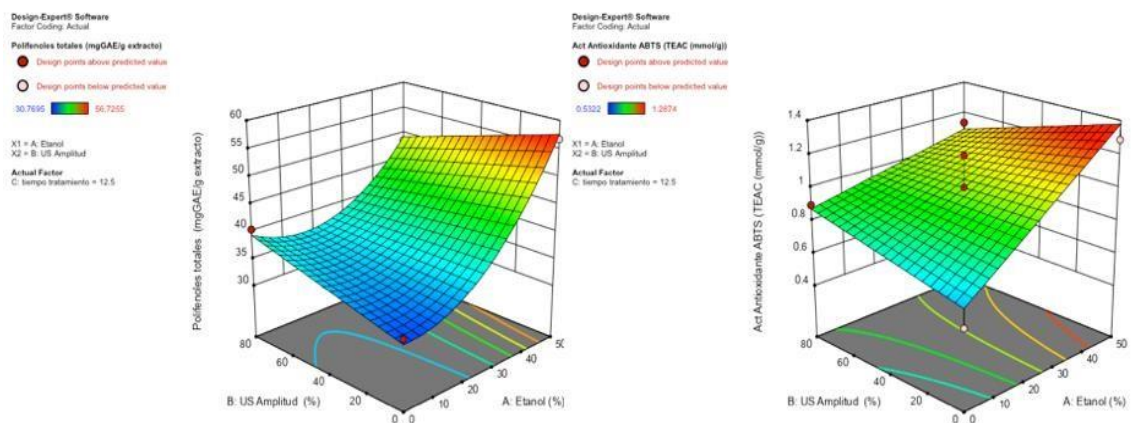


Figura 3. Superficies de respuesta de harina de vaina de caupí con ultrasonido de alta intensidad y solvente etanol:agua para el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por ABTS⁺.

La optimización buscó maximizar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante del extracto de vaina de caupí colorado. Los resultados obtenidos en las Figuras 3 y 4 demostraron una alta robustez en la extracción ya que se encontró una amplia zona de posibles soluciones con máxima deseabilidad (1,000), pudiendo variar el rango de etanol entre 40-50% y la amplitud de ultrasonido entre 0-60%, sin modificar significativamente las características del extracto obtenido (Fig.4).

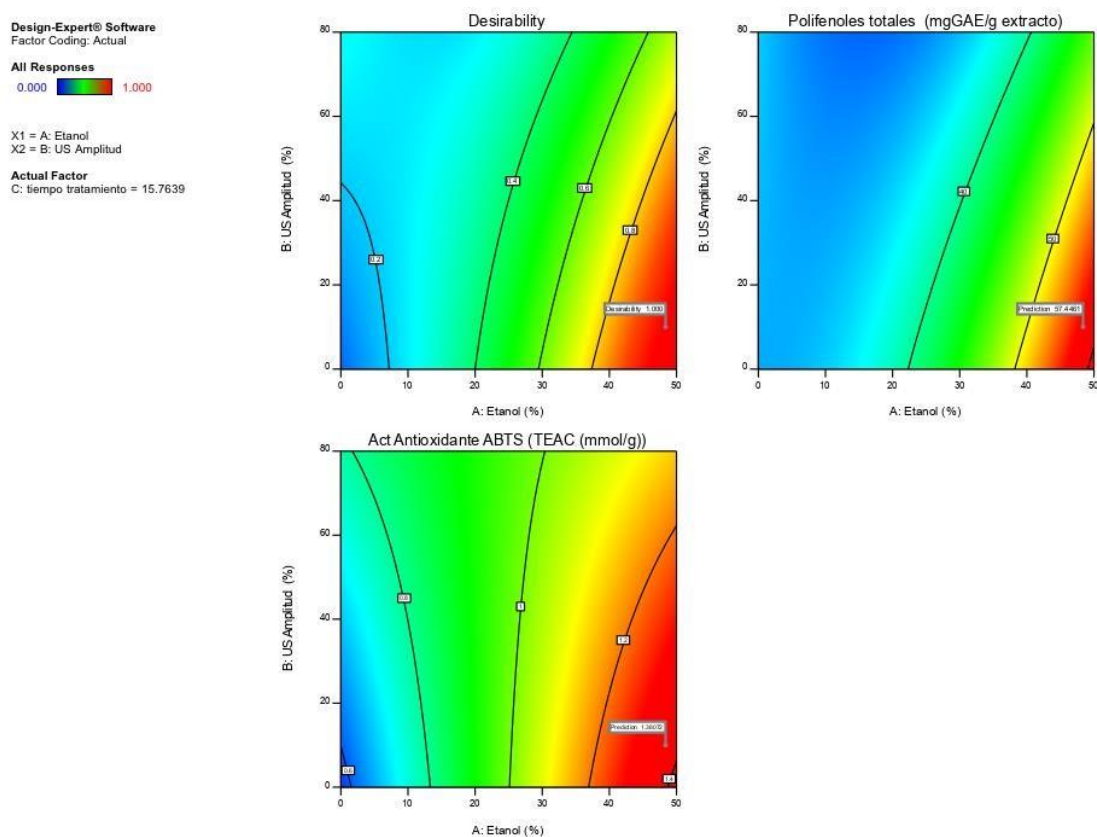


Figura 4. Gráfica de contornos de deseabilidad, polifenoles totales y actividad antioxidante en función al solvente, amplitud de ultrasonido y tiempo de tratamiento.

Tabla 3. ANOVA de los modelos de superficie de respuesta: modelo de regresión de la relación entre las variables respuestas (contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante) y las variables independientes (X_1 , X_2 y X_3).

	Suma de cuadrados	df*	Media cuadrática	F-valor	p-valor	
Contenido de compuestos fenólicos (mg_{GAE}/g_{extracto})						
Modelo	1107,21	6	184,53	19,31	0,0002	Significativo
X_1 – concentración etanol	636,07	1	636,07	66,56	<0,0001	
X_2 – amplitud US	0,2227	1	0,2227	0,0233	0,8825	
X_3 – tiempo tratamiento	0,0754	1	0,0754	0,0079	0,9314	
X_1X_2	63,25	1	63,25	6,62	0,0330	
X_2X_3	237,66	1	237,66	24,87	0.0011	
X_{12}	169,93	1	169,93	17,78	0.0029	
Residual	76,45	8	9,56			
Falta de ajuste	70,16	6	11,69	3,71	0.2273	No significativo
Error puro	6,3	2	3,15			
Total	1183,66	14				
TEAC_{ABTS}.+ (mmol/g_{extracto})						
Modelo	0,6126	5	0,1225	11,45	0.0011	Significativo
X_1 – concentración etanol	0,4396	1	0,4396	41,09	0,0001	
X_2 – amplitud US	0,0025	1	0,0025	0,2379	0,6374	
X_3 – tiempo tratamiento	0,0195	1	0,0195	1,83	0,2096	
X_1X_2	0,0624	1	0,0624	5,83	0,0390	
X_2X_3	0,0886	1	0,0886	8,28	0,0183	
Residual	0,0963	9	0,0107			
Falta de ajuste	0,0678	7	0,0097	0,6790	0,7075	No significativo
Error puro	0,0285	2	0,0143			
Total	0,7089	14				

*df, grado de libertad.

Para analizar la significancia e idoneidad del modelo, se realizó un análisis de ANOVA (Tabla 3), a partir del cual se estudió el F-valor, que compara el cuadrado de la media con el cuadrado de la media residual y los p-valor, que se utilizaron como herramientas para comprobar la significancia de cada coeficiente, lo que podría indicar, además, el patrón de interacción entre variables. Los valores obtenidos para el contenido de

compuestos polifenólicos fueron F -valor de 19,31, p -valor de 0,0002, un coeficiente de determinación de (R^2) igual a 0,9354 y un coeficiente de variación muy bajo ($CV = 7,48\%$), siendo significativas las variables X_1 , X_1^2 y las interacciones X_1X_2 , X_2X_3 ($p < 0,05$). Todos estos resultados reflejan la alta significancia del modelo, con un alto grado de precisión y un alto grado de fiabilidad de los valores experimentales. De manera similar, los resultados obtenidos para $TEAC_{ABTS^{+}}$ también muestran una alta significancia en el modelo (F -valor=11,45; p -valor=0,0011, $R^2=0,8642$ y $CV=10,33\%$), siendo significativas las variables X_1 , y las interacciones X_1X_2 y X_1X_3 ($p < 0,05$). Las validaciones de los modelos también fueron confirmadas con los análisis de falta de ajuste, donde para ambos modelos fueron no significativos ($p > 0,05$).

Los modelos cuadráticos ajustados para el contenido total de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante se presentan en las ecuaciones 3 y 4, respectivamente.

$$\text{Contenido de compuestos polifenólicos } \frac{mg^{GAE}}{g_{extracto}} = 18,75 - 0,024008 X_1 + 0,416409 X_2 + 1,04069 X_3 - 0,003976 X_1X_2 - 0,025694 X_2X_3 + 0,010795 X_1^2 \quad (3)$$

$$TEAC \frac{mmol}{g_{extracto}} = 0,990570 + 0,004451 X_1 + 0,002675 X_2 - 0,026428 X_3 - 0,000125 X_1X_2 + 0,000794 X_2X_3 \quad (4)$$

Tabla 4. Condiciones óptimas del modelo y experimentales para las condiciones de validación.

Ensayo	Factores			Respuestas del Modelo						Deseabilidad
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Polifenoles Totales (mg _{GAE} /g _{EXT})			Actividad antioxidante ABTS (TEAC mmol/g _{ext})			
	Concentración de etanol (% v/v)	Amplitud de ultrasonido (%)	Tiempo de tratamiento (min)	Predicho	Experimental	Error %	Predicho	Experimental	Error %	
1	50	20	15	57	58,82	4	1,34	1,21	9	1,000

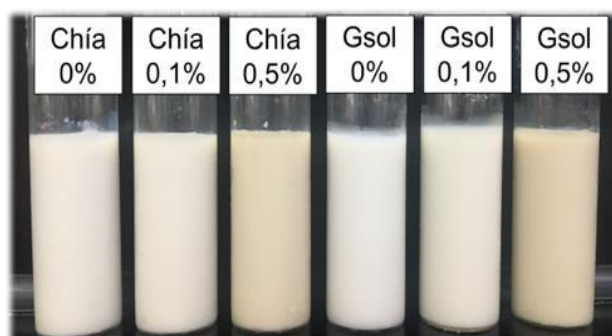
La condición óptima para obtener la máxima extracción de compuestos polifenólicos de las vainas de caupí, con la mayor actividad antioxidante fue de 50% etanol (v/v), 20% de amplitud de ultrasonido de alta intensidad durante 15 minutos totales de tratamiento de ultrasonido (Tabla 4), encontrándose un contenido de polifenoles totales de 58,8 mg_{GAE}/g_{EXT} , una actividad antioxidante de 1,21 $TEAC \text{ mmol}/g_{EXT}$ (determinado por el radical $ABTS^{+}$) y 199,8 $mmol_{TROLOX}/kg_{EXT}$ (medido por FRAP), un contenido de proteínas de $7,8 \pm 0,02\%$ y un rendimiento del $6,5 \pm 0,5 \text{ g}$ de extracto cada 100 g de harina de vaina de caupí.

6.2. Efecto de la incorporación del extracto polifenólico a la bebida a base de caupí

El extracto óptimo, de mayor contenido de compuestos polifenólicos y con la máxima actividad antioxidante, fue incorporado a una bebida a base de caupí previamente obtenida en el grupo de investigación

GiQAp. Esta vez, en la formulación de la bebida se utilizaron diferentes fuentes lipídicas: aceite de girasol o aceite de chía, y el extracto fue incorporado en diferentes concentraciones (0, 0,1 y 0,5 % p/p) con el objetivo de evaluar el efecto en la estabilidad física de la bebida y la oxidación de los lípidos. Los estudios se realizaron al día 1 y al día 15 de su preparación. En la Figura 5 se puede observar las bebidas obtenidas luego de 15 días de su preparación y la nomenclatura que se utilizó para cada una de ellas.

a)



b)

Nombre de la bebida	Fuente lipídica	Concentración de extracto polifenólico (% p/p)
Chía 0%	Aceite de chía	0,0
Chía 0,1%	Aceite de chía	0,1
Chía 0,5%	Aceite de chía	0,5
Gsol 0%	Aceite de girasol	0,0
Gsol 0,1%	Aceite de girasol	0,1
Gsol 0,5%	Aceite de girasol	0,5

Figura 5. a) Bebidas vegetales a base de caupí preparadas con aceites de chía o girasol, con diferentes concentraciones de extracto polifenólico de vaina de caupí. Día 15 de su preparación, almacenamiento en tubo hermético y a 4°C. **b)** Nomenclatura utilizadas para diferenciar cada bebida obtenida.

Como se menciona en el apartado de materiales y métodos, a las bebidas obtenidas se le estudiaron las características físicas de las emulsiones (color, estabilidad frente a una fuerza centrífuga y perfil de tamaño de partícula), las características funcionales (contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante (radical libre ABTS^{•+} y FRAP)), y por último, se determinó la estabilidad lipídica, por medio del método TBARS, de las bebidas vegetales con y sin extracto rico en CPF.

6.2.1 Efecto de la incorporación del extracto en características físicas de la bebida durante el almacenamiento

El agregado de extracto polifenólico de vaina de caupí a las bebidas vegetales modificó el color. Visualmente, todas las bebidas presentaron tonalidades cercanas a un color blanco y al agregar el extracto en la mayor concentración se apreció un cambio hacia un tono marrón claro, como se puede ver en la fotografía de la Figura 2A). En la Tabla 5 se presentan los parámetros de color CIELab. Los parámetros a* y b* indican el equilibrio entre el color verde y rojo, y el equilibrio entre el amarillo y el azul, respectivamente. Se puede

observar que al agregar el extracto polifenólico estos parámetros aumentan significativamente ($p<0,05$), principalmente, en la bebida preparada con aceite de girasol, pasando a equilibrios más cercanos al rojo y amarillo. Por otro lado, el almacenamiento durante 15 días no afectó significativamente estos parámetros ($p<0,05$) en la mayoría de las bebidas. El parámetro L^* , que representa la luminosidad de las bebidas, disminuye al agregar el extracto polifenólico, pero no varía significativamente a los 15 días de almacenamiento, excepto en la bebida chía 0%. Se calculó el parámetro ΔE^* (variación de color total que hay entre muestras) comparando los parámetros de color de las bebidas al día 1 y al día 15 de almacenamiento. En la Tabla 5 se puede observar el parámetro ΔE^* , en donde las bebidas elaboradas con aceite de chía y extracto polifenólico tuvieron menor variación de color a causa del almacenamiento que la bebida de chía sin extracto agregado. Cabe resaltar que todos los valores obtenidos de dicho parámetro a causa del almacenamiento son menores a 3, por lo que estos cambios no serían perceptibles al ojo humano (Swier et al., 2019).

Tabla 5. Parámetros de color CIE Lab (L^* , a^* y b^*) y variación del color luego de 15 días de almacenamiento de bebidas a base de caupí con aceite de girasol o chía con agregado de extracto polifenólico de vaina de caupí (0, 0,1 o 0,5% p/p).

Bebida	Día 1			Día 15			Variación de color
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	ΔE
Gsol 0%	67,8 ± 0,1 bc	0,49 ± 0,07 d	5,05 ± 0,07 d	67,9 ± 0,1 b	0,50 ± 0,1 cd	5,18 ± 0,07 d	0,17
Gsol 0,1%	66,7 ± 0,6 e	0,95 ± 0,04 bc	7,14 ± 0,06 b	66,9 ± 0,3 de	1,01 ± 0,08 b	7,35 ± 0,17 b	0,26
Gsol 0,5%	63,7 ± 0,5 g	2,80 ± 0,01 a	12,19 ± 0,05 a	64,1 ± 0,2 fg	2,72 ± 0,11 a	11,76 ± 0,28a	0,59
Chía 0%	67,6 ± 0,8 de	1,06 ± 0,56 b	6,16 ± 0,71 c	69,3 ± 0,3 a	0,47 ± 0,12 d	5,38 ± 0,02 d	1,92
Chía 0,1%	66,9 ± 0,6 de	1,11 ± 0,24 b	7,52 ± 0,42 b	67,7 ± 0,07 cd	0,88 ± 0,05 bcd	7,56 ± 0,16 b	0,83
Chía 0,5%	64,5 ± 0,4 fg	2,68 ± 0,09 a	12,22 ± 0,28 a	64,6 ± 0,3 f	2,63 ± 0,18 a	12,28 ± 0,26a	0,18

Promedio ± error estándar. Letras distintas en un mismo parámetro indican diferencias significativas ($p<0,05$), teniendo en cuenta la fuente lipídica, la concentración de extracto polifenólico, los días de almacenamiento, y la interacción entre estos factores.

Además, a modo comparativo, se midieron los parámetros de color en leche de vaca y en una bebida vegetal a base de soja (ambas comerciales) y se calculó el ΔE^* como diferencia de los parámetros entre las bebidas comerciales con respecto a la bebida a base de caupí al día 1 de elaboración. Los valores obtenidos se encontraron en un rango entre 12 y 13 para las bebidas de 0 y 0,1% de extracto polifenólico (para ambos aceites) y entre 16 y 17 para las que contenían una concentración mayor de extracto polifenólico (0,5 %). Por

otro lado, con respecto a la bebida a base de soja, las diferencias de color fueron menores (ΔE^* entre 7 y 9), siendo las bebidas con mayor contenido de extracto polifenólico las que presentaron menor variación de color con respecto a la bebida comercial.

Se evaluó de forma rápida la estabilidad física de las emulsiones al estimar como varía la turbidez de la emulsión luego de aplicar una fuerza centrífuga relativamente baja (1 min a 3500 rpm). En la Tabla 6 se presentan los resultados expresando la turbidez luego de la centrifugación como porcentaje de la turbidez inicial. Se puede observar que todas las emulsiones son estables frente a esta fuerza aplicada, ya que la turbidez de las emulsiones luego de centrifugar es aproximadamente el 100% de la turbidez antes de centrifugar. A su vez, este parámetro no varía significativamente al utilizar diferentes fuentes de lípidos, ni al incorporar extracto polifenólico, ni con el tiempo de almacenamiento estudiado.

Tabla 6. Estabilidad física luego de 15 días de almacenamiento de bebidas a base de caupí con aceite de girasol o chía con agregado de extracto polifenólico de vaina de caupí (0, 0,1 o 0,5% p/p).

Bebida	Gsol 0%	Gsol 0,1%	Gsol 0,5%	Chía 0%	Chía 0,1%	Chía 0,5%
Día 1	100 ± 0 a	100 ± 0 a	99 ± 1 a	99 ± 1 a	101 ± 0 a	100 ± 1 a
Día 15	100 ± 1 a	100 ± 1 a	100 ± 0 a	99 ± 0 a	99 ± 0 a	101 ± 0 a

Promedio ± error estándar. Letras distintas en un mismo parámetro indican diferencias significativas ($p < 0,05$), teniendo en cuenta la fuente lipídica, la concentración de extracto polifenólico, los días de almacenamiento, y la interacción entre estos factores.

Con respecto al perfil de distribución de tamaño de partículas, al día 1 de almacenamiento se observaron partículas insolubles que sedimentaban en todas las bebidas, presentando además gran polidispersidad. Como ya se mencionó, la centrifugación a 3500 rpm durante un minuto no afectó significativamente la estabilidad física de las emulsiones, pero provocó la sedimentación completa de las partículas insolubles dispersas obteniéndose una fase homogénea, por lo que se caracterizó el perfil de distribución de tamaño de partículas, obteniéndose una población luego de la centrifugación. En la Figura 6 se pueden observar las gráficas de los perfiles de distribución de tamaño de partículas, representados como el porcentaje total de volumen (%) en función del diámetro de las partículas (μm) presentes en las emulsiones. Como se puede observar todas son micro emulsiones monomodales, con la mayoría de las gotas con un tamaño cercano a 1 micrón y este perfil de distribución no varía a los 15 días de almacenamiento ya que se encuentra una superposición de las gráficas al evaluar cada una de las bebidas preparadas al día 1 y día 15.

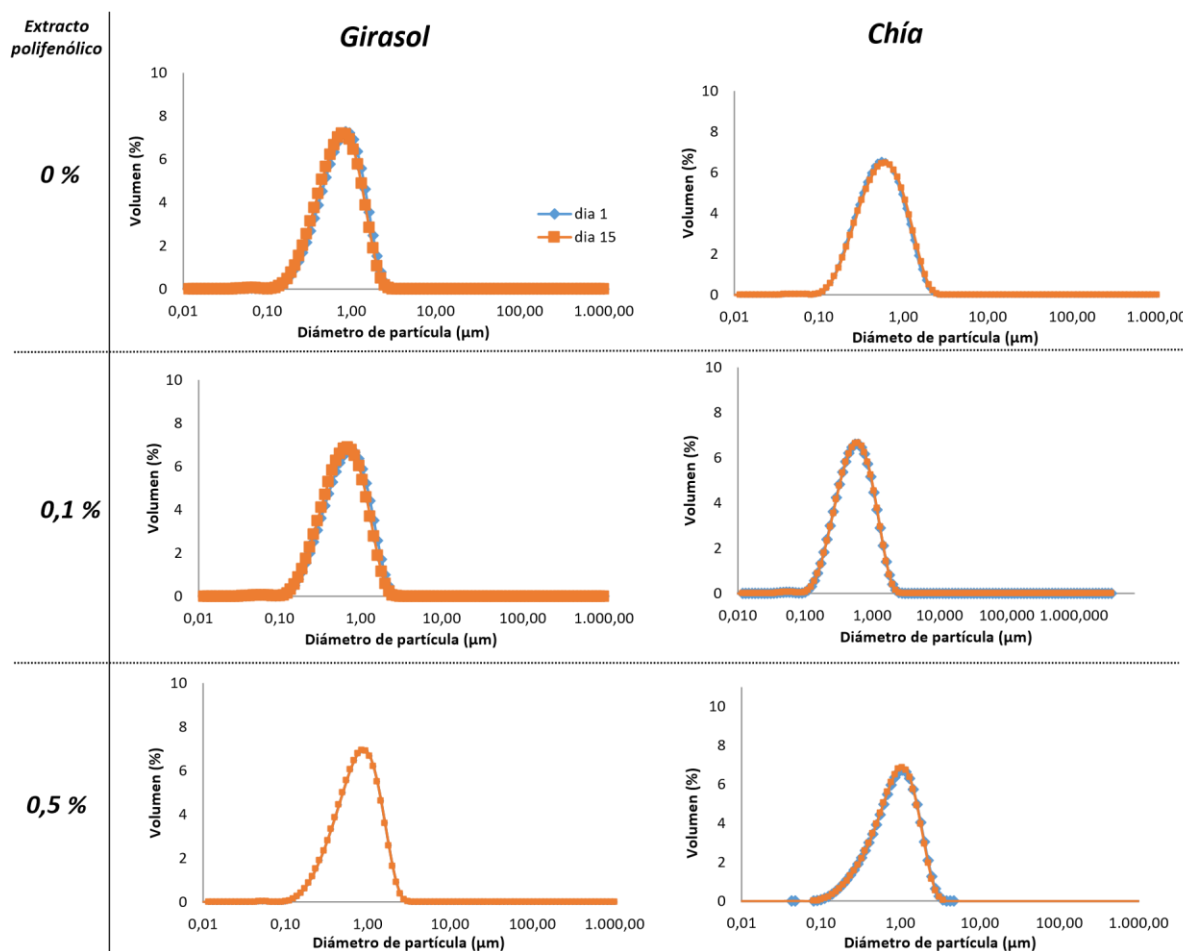


Figura 6. Perfiles de tamaño de partículas (μm) de bebidas vegetales de caupí con aceite de girasol o chía y con el agregado de extracto polifenólico de vaina de caupí (0, 0,1 o 0,5 %).

Analizando los resultados y la estadística presentada en la tabla 7, se puede observar que la bebida sin extracto preparada con aceite de chía presentó menor diámetro promedio en volumen ($D_{4,3}$) y diámetro promedio en superficie ($D_{3,2}$) con respecto a la bebida preparadas con aceite de girasol. Para ambos aceites, estos parámetros no aumentaron significativamente al pasar 15 días de almacenamiento. La incorporación de extracto polifenólico en la bebida preparada con aceite de chía hizo que el $D_{4,3}$ y que el $D_{3,2}$ aumentara, principalmente a la mayor concentración (0,5%), pero no se encontraron cambios significativos de estos parámetros en la bebida preparada con aceite de girasol. Si bien estos parámetros variaron con respecto a la bebida sin extracto, permanecieron estables luego de los 15 días de almacenamiento, igual que las bebidas control.

Tabla 7. Índice de polidispersidad (Span), diámetro promedio en superficie ($D_{3,2}$) y en volumen ($D_{4,3}$) en bebidas de caupí con aceite de girasol o chía y con el agregado de extracto polifenólico de vaina de caupí (0, 0,1 o 0,5 %).

	Bebida		Span: Índice de polidispersidad de emulsiones o/w	$D_{4,3}$: Diámetro promedio en volumen			$D_{3,2}$: Diámetro promedio en superficie		
día 1	Chía	0%	1,65 ± 0,04 ^{ab}	0,62	±	0,00 ^c	0,44	±	0,01 ^b
	Chía	0,1%	1,64 ± 0,04 ^{ab}	0,67	±	0,05 ^{b^c}	0,47	±	0,04 ^b
	Chía	0,5%	1,70 ± 0,09 ^a	0,92	±	0,07 ^a	0,60	±	0,06 ^a
	Girasol	0%	1,48 ± 0,03 ^d	0,87	±	0,02 ^{ab}	0,63	±	0,02 ^a
	Girasol	0,1%	1,53 ± 0,11 ^{cd}	0,82	±	0,08 ^{abc}	0,58	±	0,00 ^a
	Girasol	0,5%	1,60 ± 0,07 ^{bc}	0,98	±	0,01 ^a	0,62	±	0,03 ^a
día 15	Chía	0%	1,68 ± 0,08 ^a	0,60	±	0,03 ^c	0,46	±	0,01 ^b
	Chía	0,1%	1,64 ± 0,02 ^{ab}	0,67	±	0,04 ^{bc}	0,47	±	0,02 ^b
	Chía	0,5%	1,72 ± 0,12 ^a	0,95	±	0,06 ^a	0,61	±	0,05 ^a
	Girasol	0%	1,49 ± 0,08 ^{cd}	0,84	±	0,05 ^{abc}	0,61	±	0,05 ^a
	Girasol	0,1%	1,51 ± 0,11 ^{cd}	0,80	±	0,14 ^{abc}	0,58	±	0,01 ^a
	Girasol	0,5%	1,58 ± 0,00 ^{bc}	0,93	±	0,01 ^a	0,63	±	0,00 ^a

Media ± desviación estándar, letra común en un mismo parámetro no presentan diferencias significativas ($p>0,05$).

Con respecto al índice de polidispersidad, las bebidas preparadas con aceite de chía presentaron mayor span que las de girasol. Si bien no hay diferencias significativas a causa del agregado de extracto polifenólico, se puede observar una leve tendencia a aumentar este parámetro cuando se agrega 0,5% de extracto tanto en la bebida preparada con chía como en la preparada con girasol, resaltando que en esta última sí se encuentran cambios significativos con respecto a la bebida control. A los 15 días de almacenamiento, no se encuentran cambios significativos de este parámetro.

6.2.2. Efecto de la incorporación del extracto en las propiedades funcionales de la bebida a base de caupí

En la Figura 7 se puede observar el efecto del extracto polifenólico de vaina de caupí sobre el contenido de compuestos fenólicos totales (Folin-Ciocalteu) y la actividad antioxidante (ABTS⁺⁺ y FRAP) de las bebidas elaboradas con diferentes fuentes lipídicas y distintas concentraciones de extracto polifenólico, el cual aumentó ambos parámetros en relación directa con la concentración incorporada.

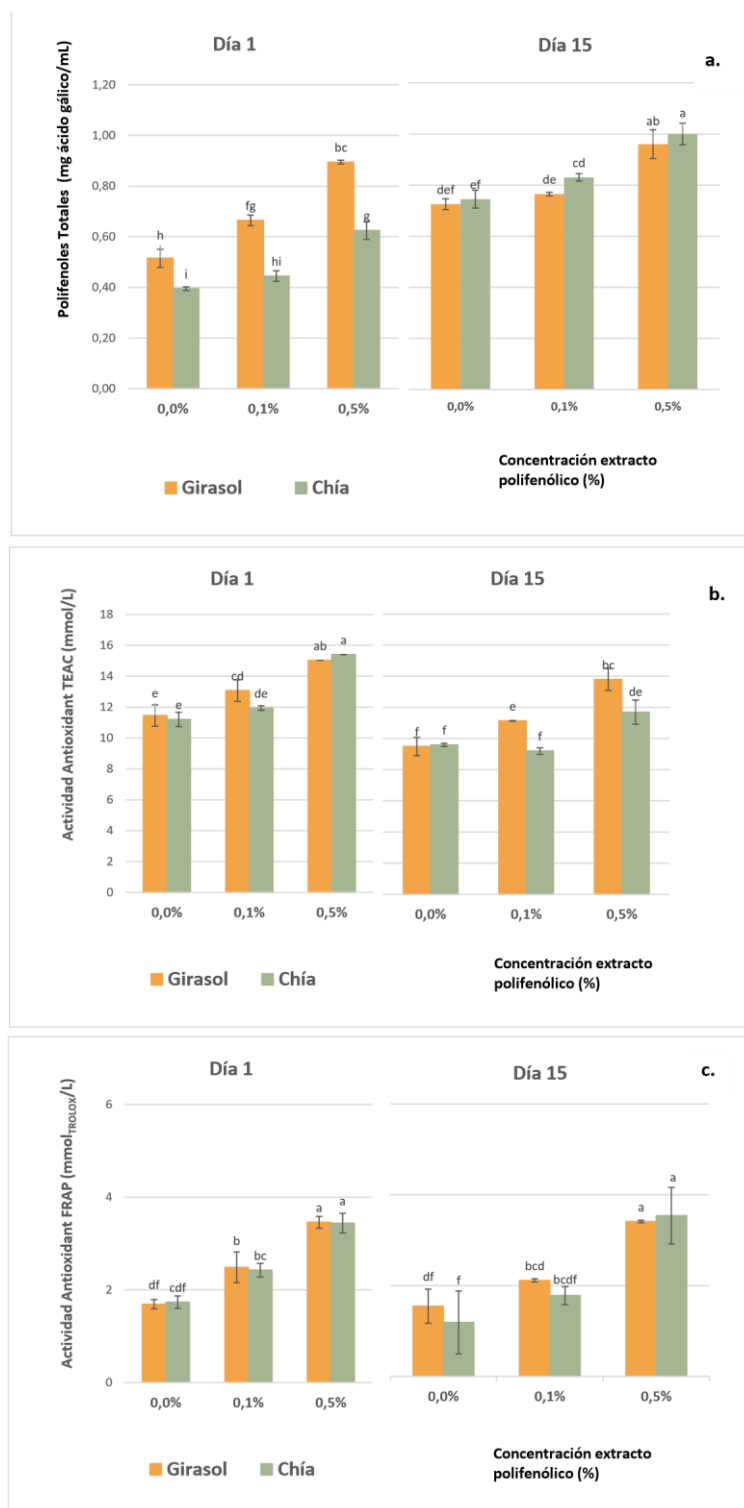


Figura 7. Contenido de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu (a) y actividad antioxidante por ABTS⁺ (b) y FRAP (C) de las bebidas vegetales con aceites de chía y girasol con extracto polifenólico de vaina de caupí (0, 0,1 y 0,5%) a los días 1 y 15 de almacenamiento a 4 °C.

El contenido de polifenoles totales de las bebidas, tanto con aceite de chía como con aceite de girasol, sin el agregado de EPF, se encontró en un rango entre 0,40 y 0,55 mg_{GAE}/mL, mientras que con el agregado de extracto aumentó hasta valores de 0,90 mg_{GAE}/mL para la bebida con aceite de girasol con 0,5% de extracto.

Este contenido se mantuvo estable durante el almacenamiento de las muestras durante 15 días. Por otro lado, la actividad antioxidante medida por ABTS⁺⁺ se encontró en un rango entre 11 y 15 TEAC (mmol/L) para ambas bebidas recién preparadas, alcanzando el valor más alto las bebidas con 0,5% de extracto agregado. Si bien se registró una disminución de la actividad antioxidante por TEAC al día 15 de almacenamiento, los valores finales siguen siendo altos para todas las muestras estudiadas. Cabe destacar que la única bebida vegetal que no registró una disminución significativa en su actividad antioxidante con el almacenamiento es la bebida de girasol con 0,5% de extracto agregado. Por otro lado, la actividad antioxidante por el método de FRAP mostró mayor estabilidad con respecto al tiempo de almacenamiento (1,8-3,8 mmol_{TROLOX}/L), ya que no se encontraron diferencias significativas para cada una de las bebidas a cada concentración de extracto entre el día 1 y 15. Asimismo, y como era de esperar, la actividad antioxidante por FRAP aumenta significativamente con respecto a la concentración de extracto agregado.

6.2.3 Evaluación del efecto antioxidante del extracto polifenólico en la estabilidad oxidativa de lípidos en las bebidas a base de caupí

Tabla 8. Estimación de la peroxidación lipídica por sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresado como mg MDA eq/ L de bebidas vegetales preparadas con aceite de chía (chía) o girasol (gsol) con la incorporación de extracto polifenólico a diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,5%).

Bebida	mgMDA eq/Lbebida	
	día 1	día 15
gsol 0%	2,43±0,19 B	2,20±0,14 C
gsol 0,1%	2,04±0,10 C	2,06±0,12 C
gsol 0,5%	2,50±0,09 B	2,95±0,09 A
chía 0%	5,49±0,41 a	5,23±0,35 a
chía 0,1%	5,58±0,45 a	5,54±0,21 a
chía 0,5%	5,36±0,32 a	5,73±0,50 a

Media ± desviación estándar, letra común no presentan diferencias significativas ($p>0,05$), letra minúscula para chía y letras mayúsculas para girasol.

En la Tabla 8 se presentan los resultados del ensayo de TBARS para estimar la peroxidación lipídica de las bebidas vegetales. Las bebidas preparadas con aceite de chía presentaron mayor peroxidación lipídica que las bebidas preparadas con aceite de girasol ($p<0,05$). En la bebida preparada con aceite de girasol el efecto de la incorporación de extracto polifenólico dependió de la concentración incorporada, resaltando que no se necesita mayor concentración de extracto para lograr la disminución de la presencia de TBARS, con 0,1% de extracto polifenólico se obtiene una disminución significativa de estas sustancias. Además, esta disminución de la peroxidación lipídica es estable durante los 15 días de almacenamiento (no se encuentran

cambios significativos al día 15 en TBARS de bebida girasol 0,1%; $p < 0,05$). Cabe resaltar, que con 0,5% de extracto incorporado al día 15, aumenta la presencia de TBARS en esta bebida. Por otro lado, la incorporación de extracto polifenólico en la bebida preparada con aceite de chía no produjo cambios significativos ni al variar la concentración de extracto incorporado, ni durante los 15 días de almacenamiento ($p > 0,05$).

7. Discusión

En el presente trabajo, se evaluó la condición óptima para la extracción asistida por ultrasonido (EAU) y la misma fue validada mediante las respuestas estudiadas, determinando como condición óptima a un tiempo de tratamiento de 15 min. En concordancia con las investigaciones que se reportaron sobre la EAU, donde, el tiempo fue una de las variables de mayor importancia a la hora de realizar extracciones de compuestos fenólicos. Soto-león et al. (2014) y Moldovan et al. (2020) evaluaron dos tiempos de extracción de compuestos fenólicos en el jugo de uva, a 15 y 30 minutos donde reportaron que lograron extraer $(30,88 \pm 2,12)$ mg_{GAE}/g_{muestra}.

Por otra parte, Natolino et al. (2020) variaron los tiempos de extracción durante 1, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos, obteniendo como resultado un máximo de compuestos fenólicos extraídos a los 5 minutos de 95,3 mg_{GAE}/g_{muestra} de semilla de uva. Asimismo, demostraron que después de 5 minutos de extracción con ultrasonido, la cantidad de polifenoles totales no es significativa, e incluso, después de 10 minutos, la curva de extracción se estabiliza demostrando que la cantidad máxima extraíble ya se obtuvo. Pero es importante resaltar que esta investigación, a diferencia de las anteriormente mencionadas, fue realizada a una temperatura de 50 °C, por lo tanto, es posible que después de 10 minutos de extracción, compuesto termolábiles como las antocianinas (en uvas) o polifenoles (caupí) se comenzarán a degradar. Esta diferencia entre los tiempos de tratamiento óptimos se debe, posiblemente, a que en el presente trabajo se utilizó un procesador de US con control de temperatura y evitando que la misma supere los 35 °C. En este sentido, evaluar la cinética de la extracción es sumamente importante si se pretende hacer un escalado de este proceso a nivel industrial, ya que al disminuir el tiempo de extracción se aumenta la utilidad y la eficiencia del proceso.

Uno de los parámetros que se tienden a variar en muchos trabajos sobre EAU para su optimización en la extracción de polifenoles, es la frecuencia. Esta se ha variado en un rango que va desde 20 kHz hasta 120 kHz. Por ejemplo, González-Centeno et al. (2014) en su estudio para evaluar el efecto de la frecuencia acústica, usando como solvente agua, variaron las frecuencias entre 40 kHz, 80 kHz y 120 kHz y observaron que un aumento de la frecuencia de ultrasonido a baja potencia afectaba de manera negativa el contenido de polifenoles totales, de esta manera, finalmente concluyeron que la frecuencia óptima para la extracción de compuestos fenólicos fue a 40 kHz, con lo cual obtuvieron

32,31 mg_{GAE}/100 g_{peso fresco} para fenoles totales. Lo cual se contrasta con el presente trabajo ya que la sonda de US se sumergió en la solución a una frecuencia de 20 kHz y una potencia máxima de 500 W (condiciones fijas del equipo). Esto se debe a que se ha observado que las bajas frecuencias generan grandes burbujas de cavitación en los disolventes de extracción que implosionan violentamente, generando un alto cizallamiento lo que asegura una mayor degradación celular, una mayor penetración del disolvente y una mayor tasa de extracción (Kaur Bhangu et al., 2016).

Otro aspecto importante a considerar es la relación entre solvente y la muestra. Generalmente, se prefiere el etanol, agua o mezclas de etanol/agua como solventes, debido a su polaridad acorde con las moléculas fenólicas (Bonfigli et al., 2017). Las condiciones óptimas de etanol fue 50%, en concordancia con el trabajo de Rojas et al. (2019) con cáscaras de sanky (*Corryocactus brevistylus*) y obteniendo un mayor rendimiento con ese porcentaje. Cabe destacar que, en el presente trabajo, los resultados demostraron una alta robustez en la extracción ya que se encontró una amplia zona de posibles soluciones con máxima deseabilidad (1,000), pudiendo variar el rango de etanol entre 40 a 50%, sin modificar significativamente las características del extracto obtenido, al igual que los resultados de Rojas et al. (2019), en el cuál, pudieron variar los porcentajes de 40 a 60% mostrando valores muy similares en el contenido de polifenoles.

La incorporación del extracto polifenólico a las bebidas a base de caupí elaboradas con diferentes fuentes lipídicas no afecta significativamente las características físicas (tamaño y estabilidad) de la matriz emulsión, pero modifica el color de las bebidas. La importancia del color en el ámbito de la tecnología de los alimentos radica en su condición de indicador de calidad, siendo la característica más influyente en la aceptación por parte de los consumidores (Calvo et al., 2002). El agregado de extracto a la bebida de caupí causó una variación en su color original que fue mayor cuanto mayor fue la concentración incorporada. Este efecto se debe a que muchos de los polifenoles que podrían formar parte del extracto son sustancias coloreadas como los derivados del ácido benzoico, quercetina, ácido hidroxicinámico, flavonas y flavonoles (Avanza et al., 2021). Cabe resaltar que, si bien el extracto modificó el color original de la bebida, los resultados obtenidos de los parámetros de color son comparables con los obtenidos por otros autores en bebidas vegetales, incluso las que tenían 0,5% de extracto incorporado. Agrahar-Murugkar et al. (2019) obtuvieron valores de $73,6 \pm 0,50$; $2,3 \pm 0,04$ y $11,76 \pm 0,08$ para L^* , a^* y b^* , respectivamente, en una bebida con una base de sorgo y mijo africano, harina de soja germinada y harina de poroto verde germinado, mientras que Chaturvedi y Chakraborty, (2022) obtuvieron valores de $62,47 \pm 0,01$; $0,24 \pm 0,02$ y $5,94 \pm 0,07$ para L^* , a^* y b^* , respectivamente, para una bebida obtenida a partir de porotos rojos grandes (*Phaseolus vulga* L.) e inoculada con *Lactobacillus casei*. Si bien para el presente trabajo no ha sido posible realizar análisis sensorial de las bebidas elaboradas por el grupo de investigación GIQAp, en la bibliografía se encuentra que hay una alta aceptabilidad por parte de los consumidores para parámetros de L^* , a^* y b^* similares a los obtenidos (Agrahar-Murugkar et al., 2019).

Uno de los principales objetivos del trabajo fue obtener una bebida enriquecida con extracto polifenólico de residuos del caupí para que le proporcionen a la misma estabilidad tecnológica y aumente sus propiedades funcionales. En este contexto, el contenido de polifenoles totales de las bebidas, tanto con aceite de chía como con aceite de girasol, sin el agregado de EPF, se encontró en un rango entre 0,4 y 0,55 mg_{GAE}/mL, el cual es superior a los valores reportados para otras bebidas vegetales. Bebidas a base de avena reportaron valores cercanos a 0,15 mg_{GAE}/mL, mientras que las bebidas a base de soja, valores entre 0,25 y 0,30 mg_{GAE}/mL (Moretto et al., 2021). Es importante tener en cuenta que hoy en día, la avena es un producto con una alta demanda por parte de los consumidores que buscan una alimentación saludable y que, por otro lado, hace ya muchos años se viene ponderando a la soja como un cultivo altamente eficiente en productividad y beneficios, sin embargo, los resultados del presente trabajo demuestran la gran potencialidad del caupí como

fuentes naturales no sólo de proteínas sino también de compuestos polifenólicos, convirtiéndolo en un cultivo con gran potencialidad tecnológica y nutricional.

Con respecto a las bebidas con agregado de extracto polifenólico, se observó que éstos aumentan significativamente su contenido total, siendo mayor el efecto en las bebidas elaboradas con aceite de girasol, para la cual se obtuvieron valores de 0,9 mg_{GAE}/mL para la bebida recién preparada.

Avanza et al. (2021) identificaron que las vainas de caupí de la variedad colorado presentan altos contenidos de compuestos polifenólicos de los tipos ácido gálico, derivados del ácido hidroxibenzoico, cumárico, hidroxicinámico y flavonas, demostrando, además, su alta actividad antioxidante.

Distintos investigadores reportaron valores de contenido total de polifenoles entre 0,32 y 0,81 mg_{GAE}/mL para bebidas obtenidas a partir de *Phaseolus vulga* L. y *Vigna radiata* L. y con el agregado de bacterias probióticas (*Lactobacillus casei*) obtenido mediante una optimización por superficie de respuesta (Chaturvedi, y Chakrabort., 2022). Amino et al. (2019) elaboraron bebidas vegetales de porotos pinto, amarillos y colorados (*Phaseolus vulgaris*) previamente remojados durante 16 h y lograron obtener un contenido total de compuestos polifenólicos de 0,47; 0,3 y 0,45 mg_{GAE}/mL. Estos valores arrojan un gran potencial a las bebidas vegetales, independientemente de la matriz empleada ya que los valores registrados para leches animales son muy inferiores a los mencionados anteriormente, siendo 0,049, 0,069, 0,167 mg_{GAE}/mL para leche de vaca, cabra y oveja, respectivamente (Vázquez et al., 2015).

Por otro lado, la actividad antioxidante medida por ABTS^{•+} se encontró en un rango entre 11 y 15 TEAC (mmol/L) para ambas bebidas recién preparadas, alcanzando el valor más alto las bebidas con 0,5% de extracto agregado. Si bien se registró una disminución de la actividad antioxidante por TEAC al día 15 de almacenamiento, los valores finales siguen siendo altos para todas las muestras estudiadas. Cabe destacar que la única bebida vegetal que no registró una disminución significativa en su actividad antioxidante con el almacenamiento es la bebida de girasol con 0,5% de extracto agregado. Por otro lado, la actividad antioxidante por el método de FRAP mostró mayor estabilidad con respecto al tiempo de almacenamiento (1,8-3,8 mmol_{TROLOX}/L), ya que no se encontraron diferencias significativas para cada una de las bebidas a cada concentración de extracto. Asimismo, y como era de esperar, la actividad antioxidante por FRAP aumenta significativamente con respecto a la concentración de extracto agregado.

La peroxidación lipídica que ocurre en las bebidas vegetales preparadas en este trabajo, podemos decir que el aumento de TBARS encontrado en las bebidas con aceite de chía en comparación a las bebidas con aceite de girasol se debería a la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes en el aceite de chía. Los rótulos comerciales de los aceites utilizados informan contenidos aproximados de 0,86 y 0,50 g/mL de grasas poliinsaturadas en el aceite de chía y de girasol, respectivamente. Para la bebida preparada con aceite de girasol, la incorporación de extracto polifenólico al 0,1% permite disminuir la formación de TBARS y mantener dicho efecto por 15 días. En las bebidas preparadas con aceite de chía puede que las concentraciones utilizadas en este trabajo no fueran suficientes para disminuir la peroxidación lipídica debido a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes en este aceite. Así como tampoco fue evidente algún efecto en los 15 días de almacenamiento. Futuros ensayos con un rango más amplio de concentraciones de

extracto incorporado y más días de almacenamiento podrían servir para concluir sobre el efecto del extracto en bebidas preparadas con aceite de chía. Los efectos encontrados en este trabajo están de acuerdo con los de otros autores, Cheetangdee y Benjakul, (2017) informan menores valores de TBARS al utilizar aceite de soja, aceite de salvado de arroz y aceite de palma para preparar bebidas de hidrolizado de arroz (1,75 a 1,5 $\text{mg}_{\text{MDAeq}}/\text{L}_{\text{bebida}}$), y los efectos encontrados al incorporar polifenoles de extracto de cascarilla de salvado de arroz fueron favorables recién al usar al usar 2 a 3% de extracto incorporado. Moretto et al. (2021), estudiaron el almacenamiento de bebidas de soja y de avena comerciales durante 14 meses, en donde no encontraron diferencias significativas en los valores de TBARS a lo largo de todo el período estudiado, lo cual refiere a la estabilidad lipídica de estas bebidas vegetales a lo largo del tiempo.

Cabe destacar que, si bien la técnica de TBARS expresada como $\text{mg}_{\text{MDAeq}}/\text{kg}$ es más adecuada para el análisis de la peroxidación lipídica en matrices animales, actualmente, es comúnmente empleada como estimación de peroxidación lipídica en estas matrices (Moretto et al., 2021; Cortés et al., 2005). Hay que tener en cuenta que en esta reacción se pueden generar interferencias de componentes vegetales que formarían un cromóforo amarillo-naranja, principalmente por reacciones de azúcares simples (sacarosa, glucosa y fructosa), proteínas solubles, péptidos o aminoácidos libres con el MDA. En nuestro trabajo, la presencia de estos compuestos secundarios se siguió realizando el espectro de absorción de la muestra reaccionante entre 400 a 600 nm y se detectó otro pico de máxima absorción a 443 nm, por lo que se registró la absorbancia a dicha longitud de onda de todos los ensayos realizados. Otros estudios complementarios como el valor peróxido o el estudio específico de la composición lipídica por HPLC podrían dar mayor información sobre la estabilidad lipídica de las bebidas, pero los mismos no pudieron ser realizados debido a la disponibilidad de las técnicas y de los materiales.

8. Conclusiones

Teniendo en cuenta que los objetivos estratégicos de FAO están orientados a contribuir a eliminar el hambre, la inseguridad alimentaria y la malnutrición; hacer que la agricultura sea más productiva y sostenible; reducir la pobreza rural; propiciar sistemas alimentarios sostenibles, inclusivos y eficientes; claramente a través de las legumbres se apunta en esa dirección, contribuyendo además al logro de las metas al 2030 de Desarrollo Sostenible.

En este sentido, el modelo estadístico de superficie de respuesta de Box-Behnken de tres puntos centrales, se utilizó con éxito para determinar los niveles óptimos de parámetros experimentales para la EUA de compuestos antioxidantes de la vaina de caupí. Se optimizaron tres variables de extracción (% de etanol, % de amplitud y tiempo total de tratamiento con US) para obtener el mayor rendimiento de extracción de compuestos antioxidantes, mostrando que la mejor condición fue de 50% etanol, 20% amplitud y un tiempo de tratamiento con US de 15 min. Cabe destacar que los resultados demostraron una alta robustez en la extracción ya que se encontró una amplia zona de posibles soluciones con máxima deseabilidad (1,000), pudiendo variar el rango de etanol entre 40 a 50% y la amplitud de ultrasonido entre 0 a 60%, sin modificar significativamente las características del extracto obtenido

Se incorporó el extracto rico en CPF en una bebida a base de caupí, a fin de aumentar la capacidad antioxidante y la estabilidad química de los lípidos. Para ello, determinaron las características físicas de las emulsiones, el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante (radical libre ABTS^{•+}) de bebidas sin EPF y con EPF incorporado (0,1 o 0,5%), al día 1 y 15 de su preparación. La incorporación de EPF aumentó ambos parámetros (contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante) en relación directa con la concentración. Con respecto a los días de almacenamiento, se observó una disminución de la actividad antioxidante durante el almacenamiento a 15 días.

Los EPF obtenidos de vainas de caupí podrían ser utilizados como potenciales antioxidantes, sin alterar significativamente la estabilidad física de las bebidas vegetales. La continuidad de los estudios en el tiempo y nuevos ensayos sobre la estabilidad oxidativa de los lípidos mostrarían si el agregado del EPF favorece la estabilidad física y lipídica de las bebidas. Se resalta la versatilidad de las proteínas de caupí como matriz de bebidas vegetales proteicas y diferentes fuentes de lípidos con propiedades funcionales importantes para preservar la salud de los consumidores.

9. Agradecimientos

- Agradezco a la Universidad Nacional del Nordeste, especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura por los procesos de formación que me han brindado en mi desarrollo, los cuales me han permitido crecer y mejorar en mi camino Profesional.
- Un reconocimiento especial a cada uno de los Docentes de la UNNE que han compartido sus conocimientos y experiencias en el desarrollo de la Carrera.
- Agradezco especialmente a mi directora, la Dra. Victoria Traffano Schiffo y Co-directora Dra. Felicita Peyrano por permitirme desarrollar mi TFG en base a sus temáticas de investigación, integrarme a su grupo de trabajo y por enseñarme innumerables técnicas o estrategias necesarias para poder desarrollar el presente trabajo.
- Agradecimiento al instituto de Química Básica y Aplicada del Nordeste Argentino (IQUIBA-NEA) y los profesionales que lo integran, por su trabajo en equipo y colaboración.
- Finalmente, Agradezco a mi Familia y Amigos que me acompañaron en estos años ya que estuvieron en las buenas y en las malas.

10. Bibliografía

- Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Eun, J. B., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2009). Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin modified by oxidised phenolic compounds. *Food Chemistry*, 117(1), 160-168.
- Agrahar-Murugkar, D., & Dixit-Bajpai, P. (2019). Physicochemical, textural, color, nutritional, scanning electron microscopy and sensorial characterization of calcium-rich breads fortified with sesame, malted finger millet, cumin and moringa leaves. *Nutrition & Food Science*, 50(1), 47–60.
- Akinyele, I. O. (1991). Effect of process method on the energy and protein content, antinutritional factors and *in-vitro* protein digestibility of cowpea milk (*Vigna unguiculata*). *Food Chemistry*, 42(2), 129-134.
- Aslan, N. E. V. Z. A. T., & Cebeci, Y. (2007). Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel*, 86(1-2), 90-97.
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1990). Official Methods of Analysis.
- Avanza, M. V., Álvarez-Rivera, G., Cifuentes, A., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2021). Phytochemical and functional characterization of phenolic compounds from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) obtained by green extraction technologies. *Agronomy*, 11(1), 162.
- Avanza, M. V., Chaves, M. G., Acevedo, B. A., & Añón, M. C. (2012). Functional properties and microstructure of cowpea cultivated in north-east Argentina. *LWT*, 49(1), 123-130.
- Avanza, M., Acevedo, B., Chaves, M., & Añón, M. (2013). Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: principal component analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 148-157.
- Awika, J. M., & Duodu, K. G. (2017). Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. *Journal of Functional Foods*, 38, 686-697.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bonfigli, M., Godoy, E., Reinheimer, M. A., & Scenna, N. J. (2017). Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 207, 56-72.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Reess, T., De Ferron, A., Pecastaing, L., Ruscassié, R., & Lanoisellé, J. L. (2012). Scale-up of high voltage electrical discharges for polyphenols extraction from grape pomace: Effect of the dynamic shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 129-136.
- Calvo, C., Durán, L., & Aguilera, J. M. (2002). Temas en Tecnología de Alimentos. México: Alfaomega.
- Carvalho, A.F.U.; Mateus, N.; Farias, D.; Brito, L.; Pereira, R.; Viana, M.; Gouveia, S.; Sampaio, S.; Barbosa, M.; Gomes, G.; Morais, S., Costa, C. y F. Freire (2012). *Journal of Food Composition and Analysis*, 26 (1), 81-88.
- Chaturvedi, S., & Chakraborty, S. (2022). Optimization of extraction process for legume-based synbiotic beverages, followed by their characterization and impact on antinutrients. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 28, 100506.

Cheetangdee, N., & Benjakul, S. (2017). Effects of rice hull phenolic extract on the stability of emulsions stabilized by rice bran protein hydrolysate. *International Food Research Journal*, 24(4).

Chikagwa-Malunga, S. K., Adesogan, A. T., Szabo, N. J., Littell, R. C., Phatak, S. C., Kim, S. C., ... & Krueger, N. A. (2009). Nutritional characterization of *Mucuna pruriens*: 3. Effect of replacing soybean meal with *Mucuna* on intake, digestibility, N balance and microbial protein synthesis in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2-4), 107-123.

Cortés, C., Esteve, M. J., Frigola, A., & Torregrosa, F. (2005). Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulsed electric fields during shelf-life. *Food Chemistry*, 91(2), 319-325.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. R. C. W., & Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008. *Grupo infostat, fca, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*, 115.

Diarra, K., Nong, Z. G., & Jie, C. (2005). Peanut milk and peanut milk based products production: a review. *Critical Reviews in Food Ccience and Nutrition*, 45(5), 405-423.

Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.

FAO. <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=7832>. (Consulta, 15/05/2018).

Fuentes Cuiñas, A. A. (2019). Cambios en el consumo y percepciones en torno a la alimentación saludable de la leche tradicional y bebidas de origen vegetal. *RIVAR (Santiago)*, 6(17), 1-14.

González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176-2184.

Jayakumar, T., Thomas, P. A., & Geraldine, P. (2009). *In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 228-234.

Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Augustin, L.S.A., Mitchell, S., Sahye-Pudaruth, S., Blanco Mejia, S., et al. (2012). Effect of legumes as part of a low glycemic index diet on glycemic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*; 172(21): 1653-1660.

Jeske, S., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Evaluation of physicochemical and glycaemic properties of commercial plant-based milk substitutes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1), 26-33.

Jeske, S., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2018). Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Research International*, 110, 42-51.

Jiménez-Colmenero, F. (2013). Emulsiones múltiples: compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutrición Hospitalaria*, 28(5), 1413-1421.

Jorcín, S., Guamis, B., & López, T. (2012). Influencia de la aplicación de ultra alta presión de homogeneización (UAPH) y de la [Ca⁺⁺] en la estabilidad de la leche de arroz. *Innotec*, 16-20.

Kaur Bhangu, S., Ashokkumar, M., & Lee, J. (2016). Ultrasound assisted crystallization of paracetamol: crystal size distribution and polymorph control. *Crystal Growth & Design*, 16(4), 1934-1941.

León, Jorge. (1968). Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. IICA Biblioteca Venezuela.

Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2016). Foods for special dietary needs: Non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 339-349.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47.
- Moldovan, M. L., Bogdan, C. Ț. Ț. L. I. N. A., Iurian, S., Roman, C., Oniga, I., & Benedec, D. (2020). Phenolic content and antioxidant capacity of pomace and canes extracts of some *Vitis vinifera* varieties cultivated in Romania. *Farmacia*, 68(1), 15-21.
- Moretto, L., Tonolo, F., Folda, A., Scalcon, V., Bindoli, A., Bellamio, M., ... & Rigobello, M. P. (2021). Comparative analysis of the antioxidant capacity and lipid and protein oxidation of soy and oats beverages. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 1-10.
- Natolino, A., & Da Porto, C. (2020). Kinetic models for conventional and ultrasound assistant extraction of polyphenols from defatted fresh and distilled grape marc and its main components skins and seeds. *Chemical Engineering Research and Design*, 156, 1-12.
- Nelson, A. I., Steinberg, M. I., & Wei, L. S. (1976). Illinois process for preparation of soymilk. *Journal of Food Ccience*, 41(1), 57-61.
- Nguyen, V. T. (2017). Potential, uses and future perspectives of agricultural wastes. *Recovering Bioactive Compounds from Agricultural Wastes*, 1-32.
- Onyeluchey, C. M., Nwabanne, T. J., Onyeluchey, O. E., & Onuoha, O. E. (2016). Dilute acid hydrolysis of cowpea hulls: a kinetic study. *International Journal on Advances Science Engineering Information Technology*, 6(4), 451-455.
- Pearce, R.J., Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716-723.
- Peyrano, F., de Lamballerie, M., Avanza, M. V., & Speroni, F. (2019). Rheological characterization of the thermal gelation of cowpea protein isolates: Effect of pretreatments with high hydrostatic pressure or calcium addition. *LWT*, 115, 108472.
- Peyrano, F., Speroni, F., & Avanza, M. V. (2016). Physicochemical and functional properties of cowpea protein isolates treated with temperature or high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 38-46.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rodrigo, D., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2007). Combined thermal and high pressure colour degradation of tomato puree and strawberry juice. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 553-560.
- Rojas, T., Fuentes Campos, M. E., Contreras-López, E., Gómez, S., & Muñoz-Jáuregui, A. M. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de

compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(2), 258-267.

Senayah, M. A. K. (1993). Production and evaluation of vegetable (imitation) milk from groundnuts & melon seeds (egushie). *B. Sc. Project Report, Department of Nutrition and Food Science, University of Ghana*.

Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-19.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.

Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I. E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., & ContrerasAndrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: Proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3), 723-737.

Swer, T. L., Chauhan, K., Mukhim, C., Bashir, K., & Kumar, A. (2019). Application of anthocyanins extracted from *Sohiong (Prunus nepalensis L.)* in food processing. *LWT*, 114, 108360.

Traffano-Schiffo, M. V., Calvo, T. R. A., Avanza, M. V., & Santagapita, P. R. (2020). High-intensity ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cowpea pods and its encapsulation in hydrogels. *Heliyon*, 6(7), e04410.

Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.

Varshney, R. K., Chen, W., Li, Y., Bharti, A. K., Saxena, R. K., Schlueter, J. A., ... & Jackson, S. A. (2012). Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nature Biotechnology*, 30(1), 83.

Vázquez, C. V., Rojas, M. G. V., Ramírez, C. A., Chávez-Servín, J. L., García-Gasca, T., Martínez, R. A. F., ... & de la Torre Carbot, K. (2015). Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food Chemistry*, 176, 480-486.

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.

POSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA

A lo largo del año, el trabajo se dividió en distintas etapas, una primera etapa se enfocó en la obtención de extractos ricos en compuestos polifenólicos de la vaina del caupí, con propiedades funcionales. Para ello, se tuvieron en cuenta los antecedentes relacionados en la temática, los cuales contribuyeron a cumplir con la puesta a punto de las técnicas de medida que se utilizaron, a la aplicación de las tecnologías de transformación y a la discusión e interpretación de los resultados. Trabajamos con vainas de caupí (*Vigna unguiculata*) de la variedad colorado, provistas por el INTA-Corrientes, Argentina. Las mismas se sometieron a una molienda y tamizado, obteniendo harina de vainas, utilizada para la extracción de los compuestos polifenólicos. Se optimizaron las condiciones para maximizar la extracción de compuestos polifenólicos con alta actividad antioxidante, realizando un estudio estadístico por superficie de respuesta, utilizando el modelo Box-Behnken con 3 variables: % de etanol (X_1 : 0-50%), % amplitud de ultrasonido (X_2 : 20-80%) y tiempo total de tratamiento de ultrasonido de alta intensidad (X_3 : 0-20 minutos). Las respuestas estudiadas de cada muestra distintas fueron: contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante. Una vez obtenidos los resultados para todas las corridas, se evaluó la condición óptima y la misma fue validada mediante las respuestas estudiadas, determinando como condición óptima una extracción con 50% etanol, 20% amplitud de ultrasonido en un tiempo de tratamiento de 15 min. En una segunda etapa, el extracto polifenólico (EPF) óptimo se incorporó a una bebida vegetal a base de caupí desarrollada por el grupo de investigación, con la finalidad de aumentar la capacidad antioxidante y contribuir a la estabilidad química de la misma, a diferentes tiempos de almacenamiento. El EPF se incorporó a la bebida en dos concentraciones diferentes (0,1 y 0,5 %) y se evaluó su comportamiento durante el almacenamiento a 4°C durante 15 días. Se estudiaron las características físicas, el contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu), la actividad antioxidante (radical libre ABTS^{•+} y FRAP) y la peroxidación lipídica (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), al día 1 y 15 de su preparación.

OBSTÁCULOS Y DIFICULTADES EN EL DESARROLLO DEL PLAN

Uno de los principales inconvenientes que tuvimos que afrontar es la falta o escasez de materia prima para la extracción de compuestos polifenólicos. Las vainas de caupí son suministradas por el INTA Estación Experimental Agropecuaria El Sombrero, INTA-Corrientes, y debido a los incendios y a la sequía que sufrió la región del NEA en este último año, la cosecha se vio muy afectada, por lo que este inconveniente dilató los tiempos propuestos en el plan de trabajo. La validación del extracto óptimo obtenido a través de la superficie de respuesta también requirió más tiempo que el previsto ya que la materia prima provista por el INTA presentaba mucha variabilidad con respecto a la utilizada en la primera etapa del trabajo. A pesar de los inconvenientes planteados, se logró la ejecución de la mayor parte del plan de trabajo y la más relevante científicamente.

EVALUACIÓN DE DIRECTORES

La labor desarrollada por el becario Fernando Castillo, ha sido satisfactoria. Esta afirmación se basa en las siguientes consideraciones:

- a) Se han logrado hacer dos presentaciones a reuniones científicas de distinto alcance: XXVII REUNIÓN DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS UNNE, en el cual el becario fue el ponente y el presentador del poster y, además, la participación en un Congreso Internacional específica de la temática de trabajo, el VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2022), realizado en Córdoba Capital, Argentina.
- b) El rendimiento académico del becario se ha mantenido en niveles aceptables. Durante el período del desarrollo de la beca, el rendimiento del alumno se mantuvo estable y positivo.
Logró aprobar dos materias y regularizar otras dos, manteniendo el promedio histórico estable.
- c) El alumno fue beneficiario de una beca EVC-CIN (convocatoria 2020), la cual llevó a cabo de forma muy satisfactoria durante el año 2021/2022, cumpliendo con los objetivos planteados.
- d) Concepto general del becario: ha demostrado aptitudes adecuadas para la investigación, como ser actitud pro-activa, pensamiento crítico, perseverancia, responsabilidad y dedicación al trabajo. Además, ha mejorado sus habilidades en cuanto al manejo de materiales y equipos de laboratorio, adquiriendo destreza en la puesta a punto de técnicas analíticas.



Castillo Fernando
Ezequiel

Tesinista



Dra. Ma. Victoria
Traffano Schiffo

Directora



Dra. Felicitas
Peyrano

Co-Directora