

TRABAJOS DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

METODOLOGÍAS VERDES PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE HOJAS DE PROSOPIS RUSCIFOLIA GRISEB (VINAL)

MIGONI, ARIANA¹

GALANTE, MICAELA²

HIDALGO, MARÍA EUGENIA³

¹ Lic. en Biotecnología, Becaria Doctoral de CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Concepción del Uruguay (UCU)-CONICET y Estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR)-CONICET; migoni_ariana@ucu.edu.ar

² Dra. en Ciencias Biológicas, Investigadora Asistente de CONICET y Docente del Área Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR)-CONICET.

³ Dra. en Ciencias Biológicas, Investigadora Adjunta de CONICET y Docente del Área Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR)-CONICET.

RESUMEN

El *Prosopis ruscifolia* Griseb, conocido popularmente como "vinal", es una leguminosa autóctona que crece en la zona del Parque Chaqueño Argentino. El vinal presenta elevada tolerancia a la salinidad y al estrés hídrico, y fue declarado "plaga nacional para la agricultura" por su capacidad colonizadora. Es por ello que se invirtieron importantes esfuerzos para controlar y erradicar los "vinalares" y, ante la dificultad de combatir su avance, esta leguminosa se ha convertido en objeto de estudio para promover el aprovechamiento de sus recursos. En particular, las hojas de vinal (HV) se utilizan en la medicina tradicional argentina por sus reconocidas actividades terapéuticas debido a la presencia de polifenoles (Pol) con elevada actividad antioxidante, que se sintetizan en las hojas cuando la planta es sometida a estrés salino. Actualmente, ha aumentado la demanda de antioxidantes naturales para su uso como nutraceuticos y por la industria de alimentos en reemplazo de los antioxidantes sintéticos. Sin embargo, el empleo de los Pol provenientes de HV está limitado solo a la medicina tradicional, no siendo aprovechado por la industria, debido a que la extracción de estos compuestos involucra el uso de solventes orgánicos, tales como etanol y/o metanol, proceso que resulta poco conveniente para la industria de los alimentos. Es por ello que actualmente se intenta reemplazar estos métodos extractivos tradicionales por otros que resulten ser más amigables con el medio ambiente por utilizar solventes acuosos, y que también permitan reducir los tiempos de extracción y el consumo energético con altos rendimientos para la recuperación de compuestos de interés. Estas nuevas metodologías se conocen como "métodos de extracción verde". El objetivo de este trabajo fue obtener extractos de HV (EHV), ricos en Pol empleando métodos de extracción amigables con el ambiente, para ser potencialmente incorporados a un alimento como antioxidantes naturales.

PALABRAS CLAVE

Extracción acuosa; polifenoles; química verde; leguminosa autóctona

ABSTRACT

The *Prosopis ruscifolia* Griseb, popularly known as "vinal," is a native legume that grows in the Parque Chaqueño Argentino region. It exhibits high tolerance to salinity and water stress and has been declared a "national pest for agriculture" due to its colonizing ability. Significant efforts have been invested in controlling and eradicating "vinalares," and due to the difficulty in combating its spread, this legume has become a subject of study to promote the use of its resources.

In particular, vinal leaves (VL) are used in traditional Argentine medicine due to their recognized therapeutic activities, which are attributed to the presence of polyphenols (Pol) with high antioxidant activity. These polyphenols are synthesized in the leaves when the plant is subjected to saline stress. There is currently an increased demand for natural antioxidants for use as nutraceuticals, and by the food industry to replace synthetic antioxidants. However, the use of polyphenols from VL

is limited to traditional medicine because the extraction of these compounds involves the use of organic solvents such as ethanol and/or methanol, a process deemed inconvenient for the food industry.

Therefore, efforts are underway to replace these traditional extraction methods with environmentally friendly alternatives that use aqueous solvents. These aim to reduce extraction times and energy consumption while achieving high yields for the recovery of compounds of interest. These new methodologies are known as "green extraction methods."

The objective of this study was to obtain VL extracts (VLE), rich in polyphenols, using environmentally friendly extraction methods, with the potential to be incorporated into food as natural antioxidants.

KEYWORDS

Aqueous extraction; polyphenols; green chemistry; native legume

INTRODUCCIÓN

El género *Prosopis*, perteneciente a la familia de las leguminosas Fabaceae y popularmente conocido como “algarrobo”, incluye 44 especies distribuidas en regiones áridas y semiáridas de Asia, África y América¹. En América del Sur, la mayor biodiversidad de este género se ubica en Argentina, donde se encuentran 28 especies de las cuales 13 son endémicas. Entre las especies nativas de Argentina se encuentra el *Prosopis ruscifolia* Griseb, conocido popularmente como “vinal”^{2, 3}(Figura 1 A).

Esta especie se distingue por su alta velocidad de instalación en nuevas tierras y por tener un crecimiento semejante al del algarrobo blanco. El vinal, que presenta elevada tolerancia a la salinidad y al estrés hídrico, crece en zonas de relleno o erosionadas, esteros, áreas abiertas por disturbios provocados por el hombre y en bosques en formación y degradados³. Los “vinalares” ocupan alrededor de 2 millones de hectáreas y se distribuyen en las provincias de Santiago del Estero, Chaco, Formosa, parte de Salta y norte de Santa Fe⁴. En el año 1941 fue declarada “plaga nacional para la agricultura” por su capacidad colonizadora. Sin embargo, a partir del 2007 se consideró que, con un adecuado manejo puede mantenerse la calidad de este recurso debido al aprovechamiento que le da la población de las áreas en que se encuentra presente⁵. Por esta razón, esta leguminosa se ha convertido en objeto de estudio para promover la utilización de sus recursos⁶.

La madera del vinal tiene una estabilidad dimensional excepcional, permitiendo obtener muebles y pisos con mucha menos tendencia a deformarse y torcerse que las maderas finas. Por otro lado, es rica en sustancias extraíbles como gomas y taninos, indicando un alto potencial para su uso industrial^{7, 8}. Los frutos, a pesar de ser ricos en fibra, proteínas, polisacáridos, lípidos y un alto contenido de potasio, fósforo y calcio^{9, 10}, se encuentran subutilizados y solo son aprovechados por los lugareños como alimento y forraje. Una alternativa podría ser la transformación de los frutos y/o semillas en harinas, que presentan buenas propiedades nutricionales y alta digestibilidad, además de tener actividad antioxidante debido a los polifenoles presentes¹¹. De esta manera, la harina de vinal tendría el potencial necesario para ser utilizada como ingrediente en alimentos para personas que padecen celiacía o alergia al gluten¹². Sin embargo, son pocos los trabajos reportados donde se emplee esta harina como suplementación de ingredientes para la obtención de productos panificados^{13, 14}.

Las semillas de vinal contienen un 97% de galactomanano o goma vinal, un hidrocoloide con características fisicoquímicas y reológicas similares a los espesantes comerciales empleados por la industria alimentaria, farmacéutica y/o cosmética (gomas guar y garrofin)^{15, 16}. Sin embargo, el uso de esta goma como estabilizante y/o espesante por parte de la industria es casi nulo.

En particular, las hojas de vinal (HV) se utilizan en la medicina tradicional argentina por sus reconocidas actividades analgésicas, antisépticas, antiinflamatorias, antihiper glucémicas, antibacterianas, antifúngicas, antitrombóticas y vasodilatadoras¹⁷⁻²³ (Figura 1 B). Estas propiedades terapéuticas se deben a la presencia de compuestos polifenólicos con reconocida actividad antioxidante, que se sintetizan en las hojas, especialmente cuando la planta es sometida a estrés salino^{23, 24}. Es sabido que

la incorporación de fenoles a la alimentación humana se correlaciona con una baja tasa de mortalidad y previene ciertas enfermedades. Sin embargo, el empleo de los polifenoles provenientes de las HV está limitado solo a la medicina tradicional, no siendo aprovechado por la industria. Una de las limitaciones puede ser que la extracción de estos compuestos involucra el uso de solventes orgánicos (etanol y/o metanol), operación unitaria poco conveniente para la industria alimentaria. En este contexto, se han comenzado a reemplazar los métodos tradicionales de extracción por metodologías de extracción verde, que no solamente son más amigables con el medioambiente, por no utilizar solventes orgánicos, sino que también han logrado reducir los tiempos de extracción y el consumo energético con altos rendimientos para la recuperación de compuestos antioxidantes²⁵⁻²⁸.

El aprovechamiento de las HV y la extracción de biomoléculas de interés con miras a su aplicación en la formulación de alimentos, no solo contribuirá a la obtención de compuestos antioxidantes naturales que podrían reemplazar a los sintéticos que se emplean en la actualidad, sino también que se le daría valor a un recurso natural con escaso o nulo aprovechamiento industrial, fomentando el desarrollo de una zona económicamente desfavorecida, como lo es la Región del Parque Chaqueño, promoviendo el empleo de mano de obra local.

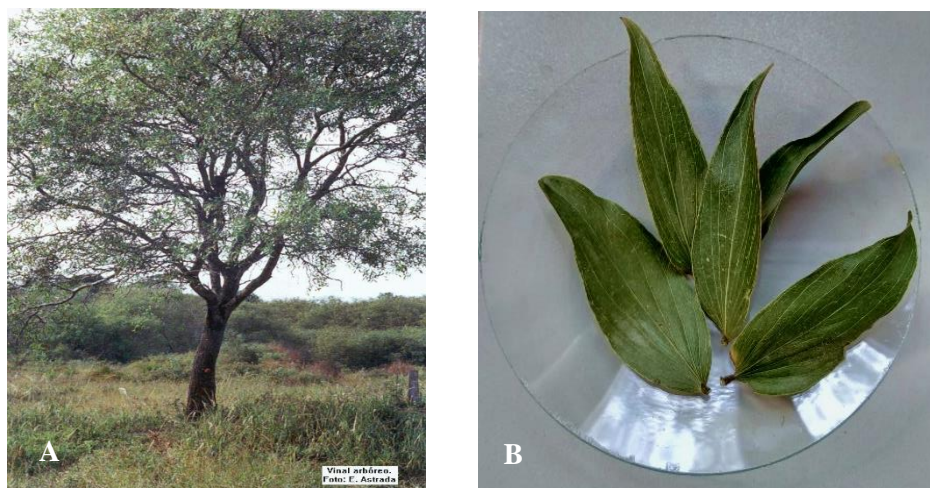


Figura 1: (A) Ejemplar de vinal de mediana edad con porte arbóreo³; (B) Hojas de vinal recolectadas en Roque Sáenz Peña - Chaco

OBJETIVOS

Obtener extractos ricos en compuestos polifenólicos a partir de hojas de vinal, empleado metodologías verdes de extracción.

MÉTODOS

➤ Tratamiento de las HV: Se trabajó con HV obtenidas de plantas crecidas en Roque Sáenz Peña, Chaco. Las mismas fueron lavadas con agua destilada (H_2O_d) y secadas en estufa a $40^{\circ}C$ durante 48 h. Se constató que el peso fuera constante y se

las trituró en molino coloidal hasta polvo. Este polvo de HV (PHV) se pasó por un tamiz de ensayo con una abertura de 297 μm . El PHV fue almacenado a -4°C al abrigo de la luz, hasta su posterior uso.

➤ Obtención de extractos de HV (EHV): Con el PHV se prepararon EHV acuoso por métodos de extracción verde variando las condiciones de procesamiento: medio extractivo, pH y método de extracción utilizado (infusión, decocción, extracción asistida por ultrasonido y agitación *overnight*). Se realizaron diferentes ensayos en etapas sucesivas con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de extracción.

Infusiones: Se calentaron 25 mL del medio extractivo hasta hervor y se adicionaron 2,5 g de PHV. Luego de mezclar, se dejó reposar durante 15 min y se filtró con papel de filtro. Las INF obtenidas se almacenaron en frascos color caramelo al abrigo de la luz y a -4°C hasta su posterior uso.

Decocciones: Para las decocciones (DEC), 2,5 g de PHV se agregaron a 25 mL del medio extractivo. Posteriormente, la mezcla se llevó a hervor, y luego, fuera del fuego, se dejó reposar durante 15 min. Los sistemas se filtraron con papel de filtro y guardaron en frascos color caramelo al abrigo de la luz y a -4°C hasta su posterior uso.

Extracción asistida por Ultrasonido (EAU): En este caso, 2,5 g de PHV se mezclaron con 25 mL del medio extractivo. La mezcla fue sometida a un tratamiento de EAU durante 15 min a 25°C , empleando un baño ultrasónico termostatzado.

Agitación overnight (AgitaciónON): Los sistemas formados por 2,5 g de PHV en 25 mL de medio extractivo se agitaron durante toda la noche a temperatura ambiente en un agitador magnético a velocidad constante. Pasado el tiempo de agitación, los EHV se filtraron con papel de filtro y almacenaron a -4°C y al abrigo de la luz.

Los medios extractivos acuoso evaluados fueron: H_2O_d , etanol 70%, solución acético/acetato 100 mM pH 5,0 (*buffer* pH 5), solución fosfato 100 mM pH 7,0 (*buffer* pH 7) y solución Tris-HCl 100 mM pH 9,0 (*buffer* pH 9).

➤ Determinación de la concentración de polifenoles totales ([Pol]): Se empleó el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microescala modificando el modo de incubación^{29,30}. Para ello se mezclaron 790 μL de H_2O_d , 10 μL de EHV y 50 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Pasado 1 min de incubación se adicionaron 150 μL de carbonato de sodio al 20 % y se homogeneizó. El sistema se incubó a 37°C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación se registró la absorbancia (A) a 730 nm y la [Pol] y se calculó a partir de una curva de calibración en la que se utilizó ácido gálico (AG) como patrón. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de AG/mL.

➤ Análisis estadístico: El análisis de los resultados y la obtención de gráficos, parámetros y/o variables respuestas se realizaron con el programa para PC Sigma-Plot versiones 10 y 12. Las relaciones entre variables fueron analizadas estadísticamente por análisis de correlación (ANOVA) considerando significativas aquellas con un $p < 0,05$.

RESULTADOS

✓ Determinación de la [Pol] presentes en los EHV obtenidos por INF y DEC

En la Figura 2 se muestran los resultados correspondientes a la [Pol] presente en los EHV obtenidos por INF y DEC. Respecto a los EHV obtenidos por INF, se observó que en las obtenidas a pH 5 y 9, la [Pol] fue significativamente menor a la obtenida por INF con el resto de los medios extractivos. No se observaron cambios significativos ($p > 0,05$) en la [Pol] obtenida en H_2O_d y etanol 70%, lo que indicaría que es posible obtener EHV ricos en Pol por infusión acuosa, evitando el uso de solventes orgánicos. Estos resultados coinciden con los reportados en otros trabajos donde se ha logrado optimizar la extracción acuosa de antocianinas (otro tipo de compuesto flavonoide) a partir de frutos rojos³¹. En el caso de las DEC, solo se observaron cambios estadísticamente significativos en la [Pol] determinada en los EHV obtenidos en *buffer* pH 9 como medio extractivo. Comparando ambas metodologías, se observó que, en general, la [Pol] obtenida por INF fue superior a la obtenida por DEC. Esto podría atribuirse al efecto negativo que podría tener la exposición prolongada del material vegetal a las altas temperaturas en la estabilidad de los Pol presentes en los extractos²⁹. Por otro lado, la [Pol] obtenida en los EHV por INF y DEC utilizando H_2O_d como medio extractivo fue similar y no se observaron cambios significativos con respecto a la [Pol] obtenida cuando se empleó etanol 70% como medio extractivo.

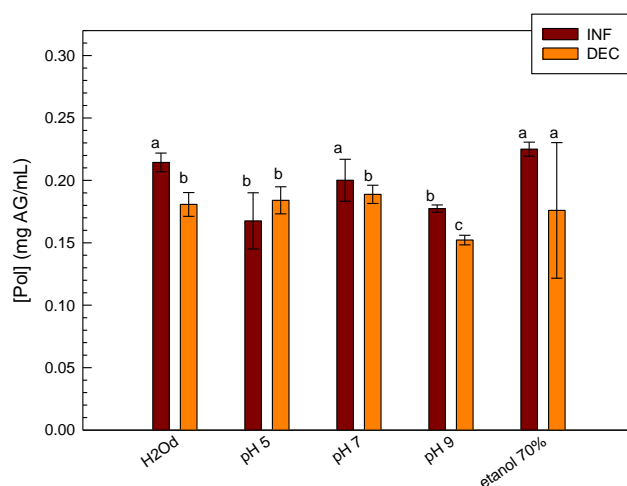


Figura 2: Determinación de la concentración de polifenoles ([Pol]) en los EHV obtenidos por infusión (INF) y decocción (DEC). Medios extractivos ensayados: agua destilada (H_2O_d), *buffer* pH 5, *buffer* pH 7, *buffer* pH 9 y etanol 70 %. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores.

✓ Determinación de la [Pol] presentes en los EHV obtenidos por EAU y Agitación ON

En la Tabla I se muestran los resultados correspondientes a la [Pol] presente en los EHV obtenidos por extracción asistida por ultrasonido (EAU) y agitación *overnight* (agitación ON). En este caso los medios extractivos ensayados fueron H₂O_d, solución fosfato 100 mM pH 7,0 (*buffer* pH 7) y solución Tris-HCl 100 mM pH 9,0 (*buffer* pH 9).

Tabla I: Determinación de la [Pol] en los EHV obtenidos por EAU y Agitación ON

Método extractivo	Medio extractivo	[Pol] (mg AG/mL)*
EAU	H ₂ O _d	0,22 ± 0,01 ^a
	<i>buffer</i> pH 7	0,32 ± 0,02 ^b
	<i>buffer</i> pH 9	0,20 ± 0,03 ^a
AgitaciónON	H ₂ O _d	0,42 ± 0,02 ^c
	<i>buffer</i> pH 7	0,33 ± 0,02 ^b
	<i>buffer</i> pH 9	0,333 ± 0,006 ^b

*Datos expresados como el valor promedio de las determinaciones ± desvío estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores.

La mayor [Pol] se obtuvo utilizando H₂O_d como medio extractivo y agitación ON como método extractivo. El uso de un único ciclo de EAU originó en general, los EHV con menor [Pol]. Por otro lado, se observó que la extracción a pH 7 y 9 originó EHV con una menor concentración de [Pol]. Esta última observación, podría estar relacionada a la presencia de una elevada cantidad de iones provenientes de las sales que se utilizaron para regular el pH de los medios extractivos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los EHV obtenidos por agitación ON empleando H₂O_d como medio extractivo serían los más ricos en polifenoles. En general, este método extractivo resultó ser el más eficiente para la extracción de polifenoles a partir de las HV, independientemente del medio extractivo acuoso empleado.

CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en este artículo, fue posible obtener extractos a partir de las hojas de una fuente abundante no aprovechada, como lo es el “vinal” empleando metodologías verdes. En este trabajo se obtuvieron extractos acuosos ricos en polifenoles utilizando infusiones, decocciones, extracción asistida por ultrasonido y agitación *overnight* como método extractivo, evaluando diferentes medios acuosos extractivos. Los EHV obtenidos por agitación ON empleando H₂O_d como medio extractivo resultaron ser los más ricos en polifenoles. Estos extractos

presentarían ventajas respecto a los obtenidos por métodos tradicionales de extracción, no solamente porque otorgarían una ventaja económica a nivel industrial, reduciendo los costos al aplicar menor cantidad de operaciones unitarias, sino que al emplear métodos verdes se estaría disminuyendo el impacto ambiental que generan estas operaciones. Además, al tratarse de extractos acuosos podrían ser incorporados, previa estabilización de los compuestos extraídos, a algún producto alimenticio otorgándole valor agregado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burkart, A. (1976) A monograph of the Genus *Prosopis* (Leguminosae Subfam. Mimosoideae). *Journal Arnold Arboretum* (57), 219–249.
2. Ríos, N.; Cejas, M. & Maldonado, M. (2008) El vinal (*Prosopis rusCIFolia* Griseb.) Una especie importante en el gran Chaco Americano, Argentina. *Foresta Veracruzana*, 10 (2), 17-26.
3. Giménez, A. M. & Moglia, J. G. (2003) Árboles del Chaco Argentino. *Guía para el reconocimiento dendrológico*. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. Capítulo 4, Ficha dendrológica N°: 47, 42-43.
4. Astrada, E. & Adámoli, J. (2005) Ecología y manejo de vinalares. *Grupo de Estudios Sobre Ecología Regional (GESER) Dto de Cs. Biológicas, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA. Universidad Nacional de La Plata*, 1-23.
5. Boletín oficial Sanidad Vegetal – Decreto 746/2007: Derogación del Decreto N° 85.584 del 1 de marzo de 1941. Recuperado de <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/125000-29999/129290/norma.htm> (Fecha: 28/08/2023).
6. Blasco, C.; Carenzo, S. & Astrada, E. (2005) Evaluación de un sistema silvopastoril sobre vinalares en Formosa, Argentina. *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica* (2), 57-68.
7. Pometti, C. L., Pizzo, B., Brunetti, M., Macchioni, N., Ewens, M., & Saidman, B. O. (2009). Argentinean native wood species: physical and mechanical characterization of some *Prosopis* species and *Acacia aroma* (Leguminosae; Mimosoideae). *Bioresource technology*, 100 (6), 1999-2004.
8. Pizzo, B., Pometti, C. L., Charpentier, J. P., Boizot, N., & Saidman, B. O. (2011). Relationships involving several types of extractives of five native Argentine wood species of genera *Prosopis* and *Acacia*. *Industrial Crops and Products*, 34 (1), 851-859.
9. Freyre, M. R., et al. (2010) Parámetros de interés nutricional en semillas de vinal (*Prosopis rusCIFolia*). *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 9 (1), 91-96.
10. Freyre, M., Astrada, E., Blasco, C., Baigorria, C., Rozycki, V. & Bernardi, C. (2003). Valores nutricionales de frutos de vinal (*Prosopis rusCIFolia*): Consumo humano y animal. *CYTA-Journal of Food*, 4 (1), 41-46.

11. Picariello, G., Sciammaro, L., Siano, F., Volpe, M. G., Puppo, M. C. & Mamone, G. (2017). Comparative analysis of C-glycosidic flavonoids from *Prosopis* spp. and *Ceratonia siliqua* seed germ flour. *Food Research International*, (99), 730-738.
12. Mamone, G., et al. (2019) Comparative analysis of protein composition and digestibility of *Ceratonia siliqua* L. and *Prosopis* spp. seed germ flour. *Food Research International* (120), 188-195.
13. Bernardi, C.; Sánchez, H.; Freyre, M. & Osella, C. (2010) Gluten-free bread formulated with *Prosopis ruscifolia*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(3), 245–255.
14. Bigne, F. (2016) Aplicación de harina de fruto de algarrobo en el desarrollo de productos panificados saludables. Tesis doctoral Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, Capítulo 1, 13-16.
15. Busch, V. M., Kolender, A. A., Santagapita, P. R. & Buera, M. P. (2015). Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*, (51), 495-502.
16. Busch, V. M. et al. (2018). Rheological characterization of vinal gum, a galactomannan extracted from *Prosopis ruscifolia* seeds. *Food Hydrocolloids*, (74), 333-341.
17. Salvat, A., Antonacci, L., Fortunato, R. H., Suárez, E. Y. & Godoy, H. M. (2004). Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine*, 11 (2-3), 230-234.
18. Gomez, A. A. et al. (2020). Antifungal and antimycotoxigenic metabolites from native plants of northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of *Aspergillus* species. *Natural product research*, 34 (22), 3299-3302.
19. Rondina, R. V., Bandoni, A. L. & Coussio, J. D. (2008). Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. *Dominguezia*, 24 (1), 47-69.
20. Scarpa, G. F. (2004). Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *Journal of Ethnopharmacology*, 91 (1), 115-135.
21. Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99 (1), 191-203.
22. Kennedy, M. L. et al. (2022). Effect of *Prosopis ruscifolia* on incretin and insulin secretion in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Vitae* (29) 01, Article 348245, 1- 9.
23. Gomez, A. A. et al. (2019). In situ histochemical localization of alkaloids in leaves and pods of *Prosopis ruscifolia*. *Flora* 256, 1- 6.
24. Meloni, D. A., Gulotta, M. R. & Cano, M. O. (2008). El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en vinal (*Prosopis ruscifolia* G.). *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales*, (15), 27-31.

25. Pagano, I., Campone, L., Celano, R., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2021). Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. *Journal of Chromatography A*, 1651, 462295.
26. Tsaltaki, C., Katsouli, M., Kekes, T., Chanioti, S., & Tzia, C. (2019). Comparison study for the recovery of bioactive compounds from *Tribulus terrestris*, *Panax ginseng*, *Gingko biloba*, *Lepidium meyenii*, *Turnera diffusa* and *Withania somnifera* by using microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 142, 111875.
27. Xu, B., et al. (2022). Multi-frequency power ultrasound green extraction of polyphenols from *Pingyin* rose: Optimization using the response surface methodology and exploration of the underlying mechanism. *LWT*, 156, 113037.
28. Kyriakoudi, A., & Mourtzinou, I. (2022). Green Extraction Technology of Polyphenols from Food By-Products. *Foods*, 11(8), 1109.
29. Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of food composition and analysis*, 15(6), 655-665.
30. Lamuela-Raventós, R. M. (2018). Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications*, 107-115.
31. Acciarri, G.; Risso, P. H.; Hidalgo, M. E. (2016) Extracción acuosa de antocianinas de arándanos. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC) Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de la Provincia de Córdoba.