



Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos

Procesamiento y técnicas de análisis

L. Almilla-Beltrán, P. Buera,
B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo
Compiladoras

 **INTA** Ediciones

Colección
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN

Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos

Procesamiento y técnicas de análisis

*L. Alamilla-Beltrán, P. Buera, B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo
Compiladoras*



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

*INTA Ediciones
Estación Experimental Agropecuaria San Pedro
2022*

66:63 Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos : procesamiento y
Su16 técnicas de análisis / Compiladoras: L. Alamilla-Beltrán...[et al.] –
Buenos Aires : Ediciones INTA, Estación Experimental Agropecuaria
San Pedro, 2022.
295 p. : il. (PDF)

Otros compiladores: P. Buera, B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo

ISBN 978-987-679-329-2 (digital)

i. Alamilla-Beltrán, L. ii. Buera, María del Pilar. iii. Camacho-Díaz, B.H. iv.
Gabilondo, J.

AGROINDUSTRIA – SUBPRODUCTOS – TECNOLOGIA – PROCESAMIENTO

DD-INTA

Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899.

Se enmarca dentro del Programa Nacional de Agroindustria y agregado de valor y el Proyecto Específico 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios”.

Fue elaborado con la inestimable colaboración del Programa CYTED.

Diseño de tapa y diagramación:

Mariana Piola
Fedra Albarracín

*Este libro
cuenta con licencia*



Autores



Miembros de la Red Iberoamericana CYTED 415RT0495 en la Universidad de La Sabana, Bogotá Colombia. De izquierda a derecha: Antonio Jiménez-Aparicio, César Augusto Cortes-García, Cecilia Abirached, Tatiana Aguirre-Costa, Patricio Santagapita, Florencia Mazzobre, Diomedes Díaz-Suárez, Patricia Risso, Fernando Ferreira, Sergio Rozycki, Pilar Buera, Fabiano Freire-Costa, Julieta Gabilondo, Rafael Giménez-Martínez, Liliana Alamilla-Beltrán, Franco Vasile, Paz Robert-Canales, Luis Panizzolo, Mónica Nazareno, Diany Arzuga-Pernett, Oscar Vega-Castro, Erick Rojas-Balcazar, Brenda Camacho-Díaz.



Miembros de la Red Iberoamericana CYTED 415RT0495 en la Universidad de La Sabana, Bogotá Colombia. De izquierda a derecha: arriba: César Augusto Cortes-García, Diomedes Díaz-Suárez, Aldo Fernández-Varela, Franco Vasile, Patricio Santagapita, Luis Panizzolo, Cecilia Abirached, Micaela Galante, Fernando Ferreira, Fabiano Freire-Costa. Abajo: Camilo Sandoval, Arjana Serrano, Julieta Gabilondo, Ximena Quintanilla-Carbajal, Florencia Mazzobre, Paz Robert-Canales, Antonio Jiménez-Aparicio, Pilar Buera, Erick Rojas-Balcazar, Sergio Rozycki, Patricia Risso, Liliana Alamilla-Beltrán, Myriam Villarreal, Mónica Nazareno, Brenda Camacho-Díaz, Leonardo Martín Calderón, Diany Arzuga-Pernett, Rafael Giménez-Martínez (en cuclillas).

Instituciones participantes

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Universidad de Buenos Aires. Argentina

Universidad Nacional del Litoral. Argentina

Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Bolivia

Universidad de Juiz de Fora. Brasil

Universidad de La Sabana. Colombia

Universidad de Chile. Chile

Universidad de Granada. España

Instituto Politécnico Nacional. México

Universidad de la República. Uruguay

Universidad Popular del César, Valledupar. Colombia

Universidad Nacional del Chaco Austral. Argentina

Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina

Universidad de Antioquía. Colombia

Universidad Nacional de Rosario. Argentina

Contenidos

Parte 1. Aprovechamiento de subproductos agroindustriales y disminución de pérdidas	7
Capítulo 1: Valorización de residuos de aguacate	8
Capítulo 2: Importancia de los fotoquímicos en los residuos de aguacate	18
Capítulo 3: Descartes de flores comestibles como fuente de compuestos bioactivos: caso rosas	26
Capítulo 4: Revalorización del suero de quesería. Productos lácteos funcionales	35
Capítulo 5: Desarrollo de biopolímeros innovadores a partir de residuos naturales	47
Capítulo 6: Ejemplo de proyecto de extensión: Negocio logístico para la cadena para la cadena hortofrutícola de pequeños parceleros en la región de Azúcar Buena, Valledupar, Colombia	59
Parte 2. Valorización de recursos regionales	66
Capítulo 7: Aprovechamiento de flores comestibles de la región como fuente de compuestos bioactivos: caso tagetes	67
Capítulo 8: Biomoléculas provenientes de la semilla de chíca: características y potencial aplicación en alimentos	75
Capítulo 9: Revalorización de la quinua y sus aplicaciones en la industria	95
Capítulo 10: Aplicaciones tradicionales y potenciales de recursos de bosques tropicales, y de cuatro especies en particular	105
Capítulo 11: Aprovechamiento y análisis de fuentes lácteas no convencionales para el desarrollo de alimentos innovadores	115
Capítulo 12: Alternativas para ampliar el potencial de gomas de fuentes regionales	128
Capítulo 13: Uso de hidrocoloide no convencional como modificador de viscosidad y textura: goma espina corona	137
Parte 3. Herramientas tecnológicas y analíticas	150
Capítulo 14: Optimización de la molienda de algarrobo para fomentar el uso no maderable de fuentes autóctonas. Aplicaciones alimentarias	151
Capítulo 15: Extrusión para el desarrollo de alimentos innovadores: Caso de productos a base de maíz	160
Capítulo 16: Evaluación de cambios fisicoquímicos en fibras de agave obtenidas por organosolv asistido por microondas	175
Capítulo 17: Reología y Textura. Aplicación en Productos Lácteos	187
Capítulo 18: Calorimetría diferencial de barrido como herramienta para promover el aprovechamiento de subproductos y recursos naturales	212
Capítulo 19: Encapsulación de compuestos bioactivos: métodos y caracterización	230
Capítulo 20: Técnicas de análisis microestructural de alimentos: análisis digital de imágenes en microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de barrido láser	252
Capítulo 21: Evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos en alimentos funcionales: modelos de digestión in vitro	265
Capítulo 22: Nuevas técnicas para la búsqueda de actividad antioxidante en mezclas naturales con aplicación en alimentos	276
Capítulo 23: Uso de herramientas estadísticas en el diseño experimental para el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios	284

Prólogo

En este volumen se abordan distintos aspectos clave para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales y la valorización de recursos regionales.

Esta publicación surgió de las exposiciones y debates que tuvieron lugar en el marco de la Red Iberoamericana LACFUN-CYTED 415RT0495, del Área Desarrollo Sostenible, entre 2015 y 2019. En esta red participaron investigadores de ocho países (Argentina, Bolivia, Brasil Chile, Colombia, España, México y Uruguay) y además dos empresas (Rocío del Campo y Biofe, ambas de la Provincia de Santa Fe, Argentina) y se combinó con las actividades de un Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS), financiado por CONICET (Argentina) y el CIN (Consejo Interuniversitario Nacional). Han sido invitados para contribuir a este libro los referentes internacionales relacionados con los temas abordados, relacionados con los grupos participantes. Especialmente, materializando el intercambio interredes, se ha invitado a miembros de la Red Iberoamericana de Alimentos Autóctonos Subutilizados (ALSUB-CYTED, 118RT0543), coordinada por la Dra. Sandra Sayago, a contribuir con un capítulo sobre análisis multivariado.

El desarrollo sostenible se basa en la necesidad de que exista un delicado equilibrio entre tres aspectos: el impulso económico de una región, la conservación del medio ambiente y el bienestar de la sociedad involucrada. Se plantea como uno de los objetivos de la FAO para contribuir a la seguridad alimentaria (ODS 2).

Las reuniones, que se realizaron en varios de los países miembros de la Red, tuvieron como objetivo el estudio y la difusión de los beneficios de la recuperación de subproductos agroindustriales y el aprovechamiento de recursos regionales para la producción de alimentos. Estos aspectos favorecen también la soberanía alimentaria, que es uno de los componentes de la seguridad alimentaria.

El libro está conformado por tres partes:

En la Parte 1 se discuten algunos casos sobre la utilización de subproductos agroindustriales, que además de contribuir a evitar pérdidas y desperdicios de alimentos, abren oportunidades para la obtención y desarrollo de nuevos productos, con potenciales propiedades funcionales. El aprovechamiento de desechos trae aparejado la disminución del impacto ambiental, y/o del costo de su tratamiento, a la vez que beneficia económicamente la organización por el agregado de valor a subproductos.

En la Parte 2 se tratan casos de valorización de recursos regionales con un rol central en el agregado de valor para el desarrollo económico de pequeños productores.

Por último, en la Parte 3 se discuten algunas herramientas para la obtención, caracterización e implementación de productos innovadores, que podrían producir impacto en las sociedades involucradas.

La tarea de impulsar el aprovechamiento de subproductos y de los recursos localmente disponibles para tender a la seguridad alimentaria requiere una acción concertada de los organismos de ciencia y técnica, la sociedad y los productores. Por ello, los temas se han analizado desde diversas perspectivas, con la participación de empresas que con vocación emprendedora han participado para acercar la investigación a la producción, y que sea posible llevar al mercado productos innovadores.

Hemos contado con el apoyo de programas que fomentaron la interrelación investigación-producción-desarrollo y con actores involucrados en la generación de estrategias de fomento a emprendimientos.

La creciente preocupación de los consumidores por el cuidado del medio ambiente, el reclamo de alimentos naturales y la legislación ambiental son fuerzas impulsoras importantes para la introducción de prácticas sostenibles en industrias procesadoras de alimentos, para impulsar el desarrollo de estos temas en los distintos niveles de educación y para promover su difusión al público en general.

A partir de 2021 la interacción de los grupos ha continuado en la Red AUIP (Asociación de Universitaria Iberoamericana de Posgrado), con el tema de Herramientas para una Economía Circular en Procesos Agroindustriales (riihec.org).

Agradecemos a todos los especialistas que han contribuido a la realización de este libro, a sus instituciones y al programa CYTED que ha hecho posible la interacción entre grupos de distintas latitudes, diferente formación y variada orientación temática, brindando las herramientas para la utilización integral de los recursos y contribuyendo a la seguridad alimentaria a través del desarrollo sostenible.

Dra. María del Pilar Buera
Investigadora Superior de CONICET, Argentina
FCEN-Universidad de Buenos Aires
Coordinadora Red Iberoamericana CYTED 415RT0495

Parte 1

Aprovechamiento de subproductos agroindustriales y disminución de pérdidas

Capítulo 1

Valorización de residuos de aguacate

José del Carmen Contreras Calderón¹, Fáver Gómez Narváez¹, Jorge Hoyos Arbeláez¹

¹Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. Departamento de Alimentos. Grupo de investigación Bioali, Ciudad Universitaria, Medellín. Colombia.

Resumen

La producción y consumo de aguacate ha venido creciendo en los últimos años, al igual que su industrialización, lo que ha generado una gran producción de residuos, los cuales dan lugar a un aumento en la contaminación ambiental, aparición de plagas y costos adicionales para su eliminación. A pesar de ser considerados residuos, se ha demostrado que la semilla y cáscara de aguacate presentan una gran variedad y cantidad de compuestos bioactivos y otros componentes de interés tecnológico. Dentro de estos compuestos se pueden citar grandes cantidades de compuestos fenólicos, minerales, almidón y fibra, los cuales pueden tener gran aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, entre otras. En la presente revisión se presentan la composición química de la semilla y la cáscara de aguacate, el contenido de compuestos bioactivos y algunas aplicaciones biológicas, en salud y tecnologías, en donde se demuestra el potencial de estos residuos, los cuales pueden contribuir al cuidado del medio ambiente y a la valorización de los mismos.

1. Introducción

En los últimos años, la producción y exportación de aguacate ha aumentado debido a la creciente demanda de esta fruta para fines alimenticios y medicinales debido a sus propiedades saludables (1, 2). En 2014, la producción mundial fue de más de 5 millones de toneladas, con 547849 hectáreas dedicadas a la producción de aguacate (3). De igual manera la industria ha seguido su ejemplo, desarrollando aplicaciones tan diversas como guacamoles, purés, helados, aceites, mayonesas y sándwiches (1). También se han realizado investigaciones sobre la deshidratación, la congelación y el enlatado de aguacates (4). Una vez que se procesa la pulpa; las semillas, las cáscaras y la pulpa agotada se descartan como desechos, lo que da como resultado una gran cantidad de residuos sólidos que representan de 21 % a 30 % de la fruta, con algunas excepciones en algunas variedades (2). Particularmente, las semillas descartadas representan aproximadamente el 16 % del peso seco de la fruta (5), lo que equivale a 148.000 toneladas/año aproximadamente (6), que de manera general se consideran un serio desafío desde el punto de vista del procesamiento, ya que si no se descartan de forma adecuada, pueden promover vectores de plagas como insectos y roedores (7). Además generan gastos adicionales debido al alto costo del transporte a las áreas de eliminación (8). Por tal razón, se están realizando esfuerzos para desarrollar estrategias de uso integrado para el aguacate.

La cáscara de aguacate y la semilla contienen grandes cantidades de compuestos fenólicos y muestran una mayor actividad antioxidante que la pulpa (9, 10). El contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las semillas y cáscaras de aguacate son varias veces mayores que las reportadas para el arándano, que es conocido por su alta capacidad antioxidante (11). Estas propiedades antioxidantes han mostrado ser útiles para prevenir enfermedades inflamatorias (12), además para prevenir la oxidación lipídica y deterioro microbiano en alimentos (10). Por lo tanto, los subproductos del aguacate muestran un gran potencial para la recuperación de compuestos fenólicos, que podrían usarse en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria como ingredientes bioactivos de bajo costo.

La semilla es rica en potasio, es una fuente excelente de fibra dietética (7) y contiene una importante cantidad de almidón. Esto la convierte en candidata para el estudio como parte del auge actual en la identificación de aplicaciones para subproductos vegetales, como la fibra dietética (13) y una prometedora fuente de almidón natural (1).

El uso potencial más importante en la industria alimentaria de estos subproductos de frutas tropicales puede ser como aditivos alimentarios incluyendo antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizantes y agentes espesantes (7). Además, la utilización de estos subproductos agrega valor a la industria del aguacate, minimiza el costo y el impacto ambiental (9, 10).

En el presente trabajo se muestra una revisión sobre el potencial de los residuos del aguacate y sus posibles usos como una alternativa para su valorización y contribución con el cuidado del medio ambiente.

2. Composición química de los residuos

Los residuos agroindustriales del aguacate son principalmente la semilla y la cáscara. La composición de estos subproductos ha sido caracterizada por diversos autores. La composición de la semilla y la cáscara se muestra en la Tabla 1. En general, los datos reportados en la literatura muestran un rango amplio en la composición de la semilla y la cáscara del aguacate. Esto es debido a que cada cultivar es diferente, así como a las diferentes condiciones geográficas y climatológicas de las zonas de cultivo (14) influyen la composición.

En la Tabla 1 se observan valores entre 54.45 % y 90.42 % de humedad para las semillas y 61.43 % a 93.55 % para la cáscara. Este contenido de humedad es alto y representa un reto en cuanto a la estabilidad de estos subproductos en el almacenamiento y la conservación antes de su transformación. El principal componente seco de estos subproductos son los carbohidratos, tales como fibra, hemicelulosa y almidón (14). Estos representan entre el 43.62 % y 80.57 % de los sólidos de la cáscara y 42.45 % y 89.92 % para la semilla. La fibra es uno de los carbohidratos que presenta un interés particular debido a sus propiedades funcionales. Esta representa entre el 1.34 % y 53.4 % de los sólidos en la cáscara y entre el 2.19 % y 11.6 % en las semillas. Barbosa-Martín *et al.* (2016) (15) cuantificaron el contenido de fibra dietaria total, fibra dietaria soluble e insoluble en semillas de aguacate Hass. Los autores encontraron que la fibra dietaria total representa alrededor de un 47 % a 48 %. A su vez, la fibra dietaria soluble e insoluble representan un 9.25 % a 11.1 % y 36.4 % a 38.2 %, respectivamente de la fibra dietaria total.

Los lípidos representan entre el 2.2 % y 10.4 % de los sólidos en las cáscaras y entre 1.91 % y 14.7 % en las semillas, lo que constituye una fuente importante de lípidos. En un estudio publicado por Bora *et al.* (2001) (16) acerca del contenido de ácidos grasos en semillas de aguacate se encontró que el 20.7 % de ellos corresponden a ácidos grasos monoinsaturados y el 46.7 % corresponden a ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son reconocidos como beneficiosos para la salud humana. El contenido de proteína está entre 0.19 % y 9.26 % (base seca) para la cáscara y 0.19 % y 9.63 % para la semilla. El contenido de proteína en las frutas suele ser bajo, siendo el aguacate uno de los frutos con mayor contenido (13). Las cenizas están entre 1.5 % y 9.16 % de los sólidos para la cáscara y 1.29 % y 4.25 % para la semilla. Entre los minerales presentes están fósforo, calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, manganeso, zinc y cobre (13, 17).

3. Compuestos bioactivos presentes en los residuos

Los residuos de aguacate son ricos en una mezcla compleja de compuestos polifenólicos como la catequina, y compuestos altamente poliméricos como las proantocianidinas (18). Se ha demostrado que los residuos de aguacate contienen compuestos fenólicos como los glucósidos de quercetina, los dímeros de procianidina de tipo A y B, los trímeros de procianidina de tipo A, la catequina, el ácido cafeicoquínico (ácido clorogénico) y el ácido cumaroquínico (2, 19). La semilla de aguacate también contiene varias clases de productos naturales como fitoesteroles y triterpenos, ácidos grasos olefínicos, acetilénicos, furanoico, dímeros de flavonoles y proantocianidinas oligoméricas, β -D-glucósido de ácido 8-hidroxi-esúsico y ácido epi-dihidrofásico β -D-glucósido (20, 21).

Un total de 61 compuestos (Tabla 2) de varias clases estructurales se han identificado en extracto de cáscara de aguacate, donde los grupos más representativos fueron procianidinas, flavonoles, ácido hidroxibenzoico y ácidos hidroxicinámicos (22). En la semilla han sido identificados 83 compuestos (Tabla 3), dentro de los cuales se destacan ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, derivados fenólicos del alcohol, flavonoides, catequinas, taninos condensados y otros compuestos polares (23).

4. Aplicaciones de los residuos

Actualmente se sabe que los extractos de residuos de aguacate tienen muchas propiedades interesantes y muchas aplicaciones potenciales, dentro de las cuales se pueden mencionar aplicaciones como larvicida, antifúngico, antimicrobiano, antioxidante, antiprotozoario, actividades antidiabéticas, antihipertensivas, hipocolesterolémicas y antimicobacterianas, así como la inhibición de la oxidación de lípidos y proteínas (12, 21, 27, 28).

4.1. Aplicaciones Biológicas y en salud

La actividad antimicrobiana de extractos de etanol de semillas de aguacate (125 a 250 µg/mL) se ha demostrado en bacterias gram positivas y gram negativas seleccionadas (*Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes*) (29). Leite *et al.* (2009) (21) demostraron la actividad antifúngica de extractos en metanol y hexano de semillas de aguacate (0,125 – 625 mg/L) contra *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* y *Malassezia pachydermatis*, y actividad larvicida contra *Artemia salina* y *Aedes aegypti* en vivo. Falodun *et al.* (2014) (30) aislaron metabolitos de alcohol graso alifático de semillas de aguacate y encontraron una moderada actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *Mycobacterium intracellulare*, con valores de CI₅₀ > 200 µg/mL, y fuerte actividad contra *S. aureus* resistente a la metilina. Salinas-Salazar *et al.* (2017) (31) informaron la actividad inhibitoria de los derivados de ácidos grasos de semilla de aguacate conocidos como acetogeninas contra *Listeria monocytogenes*.

Estudios recientes han demostrado actividad anticancerígena mediante la inducción de la apoptosis de células MDA-MB-231 por extractos de metanol de semillas de aguacate (32), mientras que otros han demostrado que los compuestos triterpenoides aislados del extracto de etanol de la semilla de aguacate tienen una actividad citotóxica significativa contra células cancerígenas de mama e hígado MCF-7 y HepG2, respectivamente (32). Por otro lado, Alkhalf *et al.* (2018) (33) encontraron que el extracto lipídico de la semilla de aguacate exhibió efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos notablemente significativos, en comparación con un extracto lipídico de la fruta. Tremocoldi *et al.* (2018) (34) también reportaron buena capacidad antiinflamatoria de la cáscara de aguacate variedad Fuerte. Así mismo, los alcoholes grasos polihidroxilados extraídos de semillas y pulpa de aguacates con disolventes orgánicos tienen un papel importante como agentes fotoprotectores contra el daño inducido por rayos UV en las células de la piel (35).

Se ha encontrado también que la inclusión de semillas de aguacate en la dieta de ratas de laboratorio redujo los niveles de colesterol y glucosa en sangre, y mejoró el almacenamiento de glucógeno en el hígado (36). Athaydes *et al.* (2018) (37) demostraron que el extracto de semilla de aguacate tiene actividad gastroprotectora y puede usarse como una fuente valiosa de compuestos en la prevención o el tratamiento de la lesión de la mucosa gástrica inducida por la indometacina. Además, sugirieron que este efecto puede ser causado, al menos en parte, por la acción sinérgica de los componentes polifenólicos y que el modo de acción está mediado por el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas, como dismutasa (SOD) y la disminución de los factores oxidantes con la disminución del proceso inflamatorio y el aumento de la producción de moco.

De igual manera es importante resaltar que la mayoría de las actividades biológicas están asociadas con las semillas de aguacate, pero también se ha informado de que los extractos de semillas de aguacate poseen actividad tóxica y genotóxica en ratones a concentraciones de 500 mg/kg (10, 38).

4.2. Aplicaciones tecnológicas

Perea-Moreno, Aguilera-Ureña y Manzano-Aguigliaro (2016)(39), indicaron que la semilla de aguacate ofrece propiedades óptimas para la producción de energía térmica a través de procesos de combustión residenciales e industriales, por lo que la integración de este subproducto en las tecnologías de biocombustible ofrece el potencial para mejorar la biopotencia sostenible que abrirá nuevas perspectivas para utilizar este residuo como biocombustible. Las semillas de aguacate han surgido como una materia prima alternativa de bajo costo para obtener adsorbentes para el tratamiento y purificación del agua (40, 41, 42, 43, 44, 45, 46). Estos adsorbentes se han utilizado para la eliminación de colorantes (40, 46), compuestos fenólicos (41, 43, 45), metales pesados (42),

amonio (44) y como adsorbentes para la defluoración del agua, mostrando mejores propiedades de desfluoración que los reportados para otros carbones activados obtenidos de precursores tanto inorgánicos como orgánicos (47). Así mismo, la cáscara de aguacate se presenta como una tecnología prometedora en eliminación de los tintes por adsorción en material carbonoso gracias al bajo costo, la amplia disponibilidad del precursor, y la capacidad de adsorción probada (48).

Tabla 1. Composición de la semilla y la cáscara de aguacate según su variedad

	Cultivar	Humedad	Lípidos	Proteína	Cenizas	Fibra	Carbohidratos	Referencia	
Cáscara	Booth8	64.3	3.88	3.75	4.41	51.5	-	(13)	
		86.93	5.62	3.34	3.82	54.6	80.57	(24)	
	Hass	72.15	10.4	9.26	5.82	-	74.68	(25)	
		69.13	2.2	1.91	1.5	-	-	(26)	
		61.43	2.42	0.19	2.39	1.43	-	(17)	
		93.55	9.14	8.28	6.05	50.6	62.03	(24)	
	Panchoy	91.12	5	4.39	3.82	48.3	76.53		
	Papelillo	82.06	2.29	4.63	9.16	32.1	-	(13)	
	Shupte	87.28	4.31	5.75	4.9	34.5	43.62	(24)	
	Trinidad	66.31	2.26	3.19	2.6	71.7	-	(13)	
	Utz	92.41	5.47	2.88	2.34	53.4	77.14	(24)	
	Semilla	Booth8	65.39	3.01	4.5	3.19	2.67	-	(13)
			64.03	6.7	4.9	3.48	4.06	72.14	(24)
		Fuerte	56.04	4.25	4.44	4.25	11.6	75.45	(16)
54.45			14.7	2.19	1.29	-	-	(26)	
		60.27	3.68	0.16	3.12	4.4	-	(17)	
		52.68	2.35	5.3	2.43	-	89.92	(25)	
		88.45	5.52	3.44	3.85	3.98	79.54	(24)	
		Panchoy	85.36	6	3.86	2.73	2.67	81.58	
Papelillo		70.05	3.31	5.68	3.03	4.99	-	(13)	
Shupte		88.94	4.05	9.63	4.3	2.19	42.45	(24)	
Trinidad		66.09	1.91	6.18	3.09	3.96	-	(13)	
Utz		90.42	6.32	3.09	2.79	4.24	78.37	(24)	

La humedad se expresa en porcentaje en base húmeda, los demás resultados están expresados en porcentaje en base seca.

Las semillas de aguacate son una fuente natural de almidón, ya que contienen un alto contenido de este polisacárido, aproximadamente el 30 %, lo que convierte a las semillas en una fuente alternativa de almidón (49, 50). El almidón de aguacate tiene aplicaciones potenciales en productos como alimentos para bebés, salsas, productos de panadería, jaleas, dulces y embutidos. Otros usos posibles son como vehículo en productos farmacéuticos y polímeros biodegradables para envasado de alimentos (15). La semilla de aguacate es una fuente potencial alternativa de fibra, la cual ha presentado una capacidad de retención de cuatro veces su peso en agua y seis veces su peso en aceite, sugiriendo su uso como aditivos para aumentar la frescura, suavidad y viscosidad en productos horneados y jugosidad en productos cárnicos (7). De igual manera, la alta fracción de fibra insoluble podría proporcionarles efectos fisiológicos, tales como una mejora del tránsito intestinal, la retención de ácidos biliares y la reducción del colesterol (7), lo que puede favorecer el desarrollo de productos saludables.

Tabla 2. Compuestos fenólicos y otros compuestos polares en el extracto de cáscara de aguacate (22)

No	Formula molecular	Compuesto propuesto
1	C ₇ H ₁₆ O ₇	Perseitol
2	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido quínico
3	C ₄ H ₆ O ₅	Ácido málico
4	C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico
5	C ₄ H ₆ O ₄	Ácido succínico
6	C ₇ H ₆ O ₄	Ácido protocatechuico
7	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	Glúcosido de hidroxitirosol
8	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B (isómero 1)
9	C ₇ H ₆ O ₄	Ácido gentísico
10	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 3-O-cafeoilquínico
11	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B (isómero 2)

Tabla 2. Compuestos fenólicos y otros compuestos polares en el extracto de cáscara de aguacate (cont.)

No	Formula molecular	Compuesto propuesto
12	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Procianidina trímero B (isómero 1)
13	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	Glúcosido de tirosol
14	C ₇ H ₆ O ₃	Ácido 4-hidroxibenzoico
15	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(+)-Catequina
16	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A (isómero 1)
17	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₁	Tirosol-hexósido-pentósido
18	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	Penstemida 4'-O-beta-D-glucopiranosido
19	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina B2
20	C ₈ H ₈ O ₄	Ácido vinílico
21	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 5-O-cafeoquinico
22	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B (isómero 3)
23	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Procianidina trímero B (isómero 2)
24	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 4-O-cafeoquinico
25	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	Procianidina tetramero B
26	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B (isómero 4)
27	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A (isómero 2)
28	C ₇ H ₆ O ₂	Ácido benzoico
29	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido p-cumárico
30	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A (isómero 1)
31	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(-)-Epicatequina
32	C ₈ H ₈ O ₃	Vainillina
33	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B (isómero 5)
34	C ₉ H ₁₀ O ₄	Ácido dihidroxicaféico
35	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A (isómero 2)
36	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	Cinchonaina (isómero 1)
37	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido cafeico
38	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A (isómero 3)
39	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A (isómero 4)
40	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	Nudipósido
41	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B (isómero 6)
42	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercetina-diglucósido
43	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercetina-diglucósido
44	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A (isómero 5)
45	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	Quercetina-O-arabinosil-glucósido
46	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutina
47	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	Ácido (1'S, 6'R)-8'-hidroxiabscísico β-D-glucósido
48	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Luteolina 7-O- (2'' -Oepentosil) hexósido
49	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	Quercetina glucuronida
50	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina-3-glucósido
51	C ₉ H ₁₀ O ₄	Etil protocatechuato
52	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Multinosido A
53	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	Cinchonaina (isómero 2)
54	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol O-glucosil-ramnosido
55	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina
56	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	(±)-Naringenina
57	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	Ácido trihidroxioctadecenoico
58	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	Ácido dihidroxioctadecenoico
59	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido palmítico
60	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	Ácido hidroxioctadecadienoico
61	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	Ácido hidroxiocto-octadecenoico

Tabla 3. Compuestos fenólicos y otros compuestos polares en el extracto de semilla de aguacate (23)

No	Formula molecular	Compuesto propuesto
1	C ₇ H ₁₆ O ₇	Perseitol
2	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido quínico
3	C ₄ H ₆ O ₅	Ácido málico
4	C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico
5	C ₆ H ₈ O ₇	Ácido isocítrico
6	C ₄ H ₆ O ₄	Ácido succínico
7	C ₆ H ₆ O ₃	Pirogalol
8	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	Procianidina tetrámero A isómero 1
9	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	Procianidina tetrámero A isómero 2
10	C ₈ H ₈ O ₄	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
11	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	Procianidina tetrámero A isómero 3
12	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	Hidroxitirosol glucósido
13	C ₇₅ H ₆₀ O ₃₀	Procianidina pentámero A
14	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 1
15	C ₇ H ₆ O ₄	Ácido protocatechuico
16	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 3-O-cafeoilquinico
17	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 2
18	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	(Epi) catequina glucopiranosido (isómero 1)
19	C ₆ H ₆ O ₂	Pirocatecol
20	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A isómero 1
21	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 3
22	C ₉ H ₁₀ O ₅	Ácido siríngico
23	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 4
24	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Procianidina trímero B isómero 1
25	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	Tirosol-glucósido
26	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	Ácido ferúlico
27	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A isómero 2
28	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	(Epi)catequina glucopiranosido (isómero 2)
29	C ₇ H ₆ O ₃	Ácido 4-hidroxibenzoico
30	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	Procianidina tetrámero A isómero 4
31	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 5
32	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(+)-Catequina
33	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	Ácido hidroxiferúlico
34	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Ácido 3- <i>p</i> -cumaroquinico
35	C ₇ H ₆ O ₄	Ácido gentísico
36	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A isómero 3
37	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₁	Tirosol-glucosil-pentósido
38	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	Procianidina tetrámero A isómero 5
39	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	Penstemida
40	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 6 (B2)
41	C ₈ H ₈ O ₄	Ácido vanílico
42	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Ácido 3-feruliquínico
43	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 5-O-cafeoquinico
44	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 7
45	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀	Procianidina pentámero B isómero 1
46	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A isómero 4
47	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido 4-O-cafeoquinico
48	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Procianidina trímero B isómero 2
49	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	Procianidina tetrámero B isómero 1
50	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 8
51	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀	Procianidina pentámero B isómero 2
52	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A isómero 5
53	C ₇ H ₆ O ₂	Ácido benzoico
54	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 9
55	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido <i>p</i> -cumárico
56	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina, dímero A isómero 1
57	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(-)-Epicatequina
58	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	(Epi)catequina galato
59	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Ácido 5- <i>p</i> -cumaroquinico

Tabla 3. Compuestos fenólicos y otros compuestos polares en el extracto de semilla de aguacate (cont.)

No	Formula molecular	Compuesto propuesto
60	C ₈ H ₈ O ₃	Vainillina
61	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Ácido 4- <i>p</i> -cumaroquínico
62	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 10
63	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A isómero 6
64	C ₉ H ₁₀ O ₄	Ácido dihidrocafeico
65	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A isómero 2
66	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	Cinchonaina (isómero 1)
67	C ₉ H ₈ O ₄	Ácido cafeico
68	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Ácido 4-Feruloquínico
69	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A isómero 3
70	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Procianidina trímero A isómero 7
71	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A isómero 4
72	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina dímero B isómero 11
73	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercetina-diglucósido (isómero 1)
74	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercetina-diglucósido (isómero 2)
75	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Procianidina dímero A isómero 5
76	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	Glucósido del ácido hidroxiabscísico
77	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	(Epi)galocatequina
78	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina-3-β-glucósido
79	C ₉ H ₁₀ O ₄	Etil protocatehuato
80	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	Cinchonaina (isómero 2)
81	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina
82	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	(±)-Naringenina
83	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	Sakuranetina

5. Conclusiones

La evidencia científica demuestra que los residuos del aguacate (semilla y cáscara), considerados desechos e importantes fuentes de contaminación, son una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos con potencial uso como ingredientes o aditivos en diferentes sectores industriales.

Dentro de las propiedades y aplicaciones de los extractos de residuos de aguacate se pueden mencionar aplicaciones como larvicida, antifúngico, antimicrobiano, antioxidante, antiprotzoario, actividades antidiabéticas, antihipertensivas, hipocolesterolémicas y antimicobacterianas, así como actividad anticancerígena.

También se ha encontrado que la semilla de aguacate es una importante fuente de fibra y almidón, por lo que son materias primas potenciales en diferentes aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Así mismo la semilla se ha propuesto como un material con propiedades óptimas para la producción de energía térmica y es considerada una materia prima alternativa de bajo costo para obtener adsorbentes para el tratamiento y purificación del agua.

Referencias

- Chel-Guerrero, L., Barbosa-Martín, E., Martínez-Antonio, A., González-Mondragón, E., & Betancur-Ancona, D. (2016) Some physicochemical and rheological properties of starch isolated from avocado seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 86, 302–308.
- López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Pasini, F., Fiorenza Caboni, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2016) HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT - Food Science and Technology*. 73, 505–513.
- Food and agriculture organization of the United Nations. Agriculture Database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Consultado noviembre de 2018.
- Khatoun S. (2009) A process for extraction of avocado (*Persea americana*) oil, *IN 229982, dt. 24.2.2009*. Indian Patents. <http://www.allindianpatents.com/patents/229982-a-process-for-extraction-of-avocado-persea-americana-oil>.

5. Dabas, D., Elias, R.J., Lambert, J.D., & Ziegler, G.R. (2011). A Colored Avocado Seed Extract as a Potential Natural Colorant. *Journal of Food Science*. 76 (9), C1335–C1341.
6. Gutiérrez, M., Lara, M.B., Guillén, H., & Chávez, A. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*. 35 (9), 647–653.
7. Barbosa-Martín, E., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., & Mill, P. (2016) Chemical and technological properties of avocado (*Persea americana* Mill.) seed fibrous residues. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 457–463.
8. Ferrari, R.A., Colussi, F., & Ayub, R.A. (2004). Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26 (1), 101–102.
9. Wang, W., Bostic, T.R., & Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. 122 (4), 1193–1198.
10. Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., Andrade, M.J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011) Avocado (*Persea americana* Mill.) Phenolics, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (10), 5625–5635.
11. Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J.A., Siddiqui, M.W., Dávila-Aviña, J., & González-Aguilar, G. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 1866-1874.
12. Dabas, D., Shegog, R., Ziegler, G., & Lambert, J. (2013). Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6133–6140.
13. Ceballos, A., y Montoya, S. (2013). Evaluación química de la fibra en semilla, pulpa y cáscara de tres variedades de aguacate. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 11(1), 103–112.
14. Araújo, R.G, Rodríguez-Jasso, R.M., Ruiz, H.A., Pintado, M.M.E., & Noé, C. (2018) Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51–60.
15. Barbosa-Martín, E., Chel-Guerrero, L., González-Mondragón, E., & Betancur-Ancona, D. (2016). Chemical and technological properties of avocado (*Persea americana* Mill.) seed fibrous residues. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 457–463.
16. Bora, B.P.S., Narain, N., Rocha, R.V.M., y Paulo, M.Q. (2001) Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites*, 52(3–4), 171–174.
17. Regina, É., Tremocoldi, M.A., Alencar, S.M., Vieites, R.L., & Minarelli, P. (2014). Composicao química e atividade Antioxidante. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 36(2), 417–424.
18. Soong, Y.Y., & Barlow, P.J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*. 88 (3), 411–417.
19. Kosińska, A., Karama, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., & Dykes, G.A. (2012) Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(18), 4613–4619.
20. Maseko, R. (2006). *Synthesis of authentic organic standards of antibacterial compounds isolated from avocados*. (Thesis MsTech). Tshwane University of Technology. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.521.7983&rep=rep1&type=pdf>
21. Leite, J. J., Brito, E. H., Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S., Sidrim, J. J., Bertini, L. M., Morais, S. M., & Rocha, M. F. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), 110–113. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822009000200003>.
22. Figueroa, J.G., Borrás-Linares, I., & Lozano-Sánchez, J. (2018). Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*. 105, 752–763
23. Figueroa, J.G., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., & Segura-Carretero, A. (2018). Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass Q-TOF. *Food Chemistry*. 245, 707–716.
24. Bressani, R., Rodas, B., y Ruiz, A.S. (2009). *La composición química, capacidad antioxidativa y valor nutritivo de la semilla de variedades de aguacate*. CONCYT-Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología. FONACYT.

25. Saavedra, J., Córdova, A., Navarro, R., Díaz-Calderón, P., Fuentealba, C., Astudillo-Castro C., Toledo, L., Enrione, J., & Gálvez, L. (2017). Industrial avocado waste: Functional compounds preservation by convective drying process. *Journal of Food Engineering*. 198, 81–90.
26. Vinha, A., Moreira, J., & Barreira, S. (2013). Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea Americana* Mill). *Journal of Agricultural Science*. 5(12), 100–109.
27. Jiménez-Arellanes, A., Luna-Herrera, J., Ruiz-Nicolás, R., Cornejo-Garrido, J., Tapia, A., & Yépez-Mulia, L. (2013). Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13(1), 109.
28. Yasir, M., Das, S., & Kharya, M. (2010). The phytochemical and pharmacological profile of *Persea Americana* Mill. *Pharmacognosy Reviews*. 4(7), 77.
29. Chia, T.W., & Dykes, G.A. (2010). Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea Americana*) of three cultivars. *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 753–756.
30. Falodun, A., Erharuyi, O., Imieje, V., Ahomafor, J., Akunyuli, C., Jacobs, M., Khan, S., Hamann, M.T., & Langer, P. (2014). *In vitro* evaluation of aliphatic fatty alcohol metabolites of *Persea americana* seed as potential antimalarial and antimicrobial agents. *Nigerian journal of biotechnology*, 27, 1–7.
31. Salinas-Salazar, C., Hernández-Brenes, C., Rodríguez-Sánchez, D. G., Castillo, E.C., Navarro-Silva, J.M., & Pacheco, A. (2017). Inhibitory Activity of Avocado Seed Fatty Acid Derivatives (Acetogenins) Against *Listeria Monocytogenes*. *Journal of food science*, 82(1), 134–144.
32. Abubakar, A.N.F., Achmadi, S.S., & Suparto, I.H. (2017). Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 397–400
33. Alkhalf, M.I., Alansari, W.S., Ibrahim, E.A., & Elhalwagy, M.E.A. (2018). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea Americana*) fruit and seed extract. *Journal of King Saud Un. Science*. 31(4).
34. Tremocoldi, M.A., Rosalen, P.L., Franchin, M., Massarioli, A.P., Denny, C., Daiuto, É.R., Paschoal, J., Melo, P.S., & Alencar, S.M. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PLoS one*, 13(2), e0192577.
35. Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A., Lion, G., Ingber, A., & Hochberg, M. (2011). Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Archives of dermatological research*, 303(4), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s00403-010-1088-6>
36. Uchenna, U.E., Shori, A.B., & Baba, A.S. (2017) Inclusion of avocado (*Persea Americana*) seeds in the diet to improve carbohydrate and lipid metabolism in rats. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 54(3), 140–148.
37. Athaydes, B.R., Alves, G.M., Assis, A.L., Gomes, J.V., Rodrigues, R.P., Campagnaro, B.P., Nogueira, B., Silveira, D., Kuster, R., Pereira, T.M., Kitagawa, R.R., & Gonçalves, R.C. (2019). Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Food research international*, 119, 751-760.
38. Padilla-Camberos, E.; Martínez-Velázquez, M.; Flores-Fernández, J.M., & Villanueva-Rodríguez, S. (2013). Acute toxicity and genotoxic activity of avocado seed extract (*Persea americana* Mill., c.v. Hass). *The Scientific World Journal*. ID245828.
39. Perea-Moreno, A.J., Aguilera-Ureña, M.J., & Manzano-Agugliaro, F. (2016). Fuel properties of avocado stone. *Fuel*, 186, 358–364.
40. Elizalde-González, M.P., Mattusch, J., Peláez-Cid, A.A., & Wennrich R. (2007). Characterization of adsorbent materials prepared from avocado kernel seeds: Natural, activated and carbonized forms. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 78(1), 185–193.
41. Alvares, L., Lucia, M., Pinto, C., Alvarez-Mendes, M.O., Coutinho, R., & Patrocínio, G. (2011). Phenol removal from aqueous solution by activated carbon produced from avocado kernel seeds. *Chemical Engineering Journal*, 174(1), 49–57.
42. Bhaumik, M., Choi, H.J., Seopela, M.P., McCrindle, R.I., & Maity, A. (2014). Highly effective removal of toxic Cr(VI) from wastewater using sulfuric acid-modified avocado seed. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(3), 1214–1224.
43. Dejene, K., Siraj, K., & Kitte, S.A. (2016). Kinetic and Thermodynamic Study of Phenol Removal from Water Using Activated Carbon Synthesized from Avocado Kernel Seed. *International Letters of Natural Sciences*, 54, 42–57.
44. Zhu, Y., Kolar, P., Shah, S.B., Cheng, J.J., & Lim, P.K. (2016). Avocado seed-derived activated carbon for mitigation of aqueous ammonium. *Industrial Crops and Products*, 92, 34–41.

45. Leite, A.J., Sophia, C.A., Thue, P.S., Reis, G.S. dos, Dias, S.L., Lima, E.C., Vaghetti, J.C., Pavan, F., & Alencar, W. (2017). Activated carbon from avocado seeds for the removal of phenolic compounds from aqueous solutions. *Desalination and water treatment*, 71,168-181.
46. Regti, A., Laamari, M.R., Stiriba, S.E., & Haddad, M. El. (2017). Use of response factorial design for process optimization of basic dye adsorption onto activated carbon derived from *Persea* species. *Microchemical Journal*, 130,129–136.
47. Salomón-Negrete, M.A., Reynel-Ávila, H.E., Mendoza-Castillo, D.I., Bonilla-Petriciolet, A., & Duran-Valle, C.J. (2018). Water defluoridation with avocado-based adsorbents: Synthesis, physicochemical characterization and thermodynamic studies. *Journal of Molecular Liquids*, 254, 188–197.
48. Palma, C., Lloret, L., Puen, A., Tobar, M., & Contreras, E. (2016) Production of carbonaceous material from avocado peel for its application as alternative adsorbent for dyes removal. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 24, 521–528.
49. Domínguez, M.P., Araus, K., Bonert, P., Sánchez, F., San Miguel, G., & Toledo, M. (2014). The Avocado and Its Waste: An Approach of Fuel Potential/Application. In: *Environment, Energy and Climate Change II*. (p. 199–223) Springer.
50. Lacerda, L.G., Colman, T.A.D., Bauab, T., Silva Carvalho Filho, M.A. da, Demiate, I.M., Vasconcelos, E.C. de, & Schnitzler, E. (2014). Thermal, structural and rheological properties of starch from avocado seeds (*Persea Americana*, Miller) modified with standard sodium hypochlorite solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115(2),1893–1899.

Capítulo 2

Importancia de los fitoquímicos en los residuos de aguacate

Alicia Ortiz Moreno, Carla Patricia Plazola Jacinto, Liliana Alamilla Beltrán

Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
Departamento de Ingeniería Bioquímica. Ciudad de México. México.
ortizalicia@hotmail.com

Resumen

El aguacate es originario de México y Centro América. Botánicamente, pertenece a la familia Lauraceae y su nombre científico es *Persea americana* Mill. Al ser un cultivo que se adapta a diferentes condiciones, en la actualidad se produce en más de 60 países entre los que se encuentran México, Israel, Estados Unidos, Colombia y República Dominicana; siendo México el mayor productor con el 30 % de la producción mundial. El aguacate es un cultivo económicamente importante, debido al elevado consumo de su fruto, sin embargo, solo se consume la pulpa del mismo. La cáscara y la semilla que tienen compuestos bioactivos, no son utilizadas, al igual que las hojas de los árboles. Estos residuos, son una fuente atractiva de aditivos para su uso en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica; evitando también el impacto ambiental que tienen estos residuos al ser descartados. La semilla y la cáscara de aguacate han demostrado tener una mayor concentración de compuestos fenólicos en comparación con la pulpa. Las hojas de los árboles de aguacate por ser un árbol perenne se encuentran disponibles todo el año y contiene gran cantidad de compuestos bioactivos, como lo son los compuestos fenólicos utilizados en la medicina tradicional. Estos compuestos han sido estudiados principalmente por su actividad antioxidante, antiinflamatoria, reducción de los niveles de colesterol, su efecto positivo en la inhibición de la α -glucosidasa. Las hojas de aguacate también contienen β -caroteno, vitamina C, clorofila y minerales, que pueden actuar como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. También se ha demostrado: la actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y negativas de diferentes extractos de semilla o hojas de aguacate. La capacidad de la semilla de aguacate como biocombustible. La cáscara y semilla de aguacate se han utilizado como biosorbentes en la remoción de compuestos contaminantes de aguas residuales de diferentes industrias. En este capítulo se particularizan varias investigaciones que muestran el valor agregado que pueden tener los residuos agroindustriales de aguacate, contribuyendo así a mitigar el impacto ambiental, que conlleva el desechar estos residuos.

1. Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es originario de México y Centroamérica (1). Existen tres razas, las cuales son erróneamente llamadas variedades o subespecies; estas razas son: criollo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), guatemalteco (*P. americana* var. *guatemalensis* L. O. Wms.) y antillano (*P. americana* var. *americana*) (Figura 1). Las principales diferencias entre estas se encuentran en la forma y tamaño del fruto y de su semilla, en su textura y en el color de la cáscara, así como en el grado de maduración del fruto (2).

El aguacate actualmente se produce en más de 60 países entre los que se encuentran México, Israel, Estados Unidos, Colombia y República Dominicana; siendo México el mayor productor con el 30 % de la producción mundial (3,4). Este fruto se caracteriza por su contenido nutricional por lo que recientemente ha despertado un creciente interés mundial, por lo que se ha convertido en uno de los cultivos de mayor importancia económica (4).



Figura 1. Razas de aguacate existentes. Criollo a la izquierda. Guatemalteco al centro y Antillano a la derecha

El fruto del aguacate está formado por tres partes principales: la pulpa, la cáscara y la semilla. La cáscara del fruto tiene diferentes características de acuerdo con la variedad, el color de ésta varía de verde a negro. El fruto contiene una sola semilla, la cual es dura de color café y de tamaño diferente de acuerdo a la variedad de aguacate. Al solo consumirse la pulpa del fruto, la industrialización del aguacate produce cantidades importantes de residuos, principalmente cáscaras y semillas, los cuales equivalen a 21- 30 % de la fruta (5,6,2).

Mediante la adecuada aplicación de diferentes tecnologías, estos residuos pueden ser utilizados como fuentes potenciales de ingredientes naturales y aditivos. De los fitoquímicos que se encuentran se pueden citar: fitoesteroles, triterpenos, ácidos grasos (palmitico, palmitoleico, esteárico, oleico y linoleico), aceites esenciales, fibras (hemicelulosa), pigmentos, así como compuestos fenólicos entre los que se encuentran la catequina, glucósidos de quercetina, dímeros de procianidina de tipo A y B, los trímeros de procianidina de tipo A, el ácido cafeicoquinámico, el ácido cumaroquinínico. El bajo costo de estos residuos, los hacen una fuente atractiva para su uso en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica; evitando también el impacto ambiental que tienen estos residuos al ser descartados (2).

Las hojas de los árboles de aguacate no se consideran como un subproducto del procesamiento del aguacate, sin embargo, son una fuente de compuestos bioactivos que está disponible todo el año y que ha sido aprovechada en la medicina tradicional, pero no ha sido explotada de forma industrial. Algunos estudios han logrado identificar a los compuestos fenólicos presentes en hojas de aguacate, entre los que se identificaron: ácido siríngico, euegnol, ácido vanílico, isoeugenol, guayacol, kampferol, ácido p-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, apigenina, naringenina, epigallocatequina, epicatequina, lupeol (7).

2. Fitoquímicos y sus propiedades

2.1. Polifenoles

Las semillas y cáscaras de aguacate han demostrado tener una mayor concentración de polifenoles en comparación con la pulpa (8). Estos compuestos polifenólicos han sido estudiados por su actividad antioxidante, por lo cual algunos autores, han buscado introducir estos compuestos en matrices alimentarias con el fin de evitar la oxidación de sus componentes. Un extracto rico en polifenoles provenientes de cáscara y semilla de aguacate se probó como ingrediente en un producto cárnico, obteniendo que el extracto fue capaz de proteger a los lípidos y a las proteínas contra la oxidación, por lo que recomiendan la adición de este tipo de extractos, como un ingrediente funcional que contribuye a mejorar el valor nutricional y tecnológico de productos cárnicos por su actividad antioxidante (8,9).

Segovia Gómez, Peiró Sánchez *et al.* (2014) (9) obtuvieron un extracto etanólico de semillas de aguacate y evaluaron el efecto de éste, sobre la oxidación primaria de una emulsión aceite en agua, midiendo el índice de peróxidos, así como el efecto del extracto en la oxidación secundaria de carne de res mediante el ensayo TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, obteniendo un 30 % de inhibición de la oxidación de las emulsiones y un 60 % de inhibición de la oxidación cuando el extracto se adicionaba con albúmina de huevo. El extracto fue añadido a carne de res, lográndose la inhibición del 90 % de la formación de TBARS.

Segovia, Hidalgo *et al.* (2018) (10) realizaron la extracción de compuestos polifenólicos de semillas de aguacate utilizando metanol o etanol 50 %, obtuvieron una mayor extracción de compuestos polifenólicos utilizando etanol 50 % (30.98 mg equivalentes de ácido gálico/g en peso seco) y midieron la actividad antioxidante de los extractos utilizando los métodos ORAC, ABTS y FRAP teniendo una actividad antioxidante de 1310, 263.58 y 438.89 $\mu\text{mol TE/g}$ peso seco respectivamente. También se evaluó la adición del extracto de semilla de aguacate a aceite de girasol y el efecto que tenía el extracto sobre la oxidación del aceite midiendo el índice de peróxidos y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), consiguiendo que el extracto retrase la oxidación del aceite de girasol, debido a la presencia de polifenoles como catequinas, flavonoides e isómeros del ácido clorogénico.

Jiménez, García *et al.* (2017) (11) evaluaron el efecto que tiene la adición de extractos hidroalcohólicos de hojas de aguacate o de oliva en la estabilidad térmica de aceite de canola y de girasol durante el freído de papas a 180 °C. Los extractos de las hojas, demostraron tener efecto antioxidante en los aceites utilizados, protegiéndolos de la oxidación debida al freído. Este efecto se atribuyó a los compuestos fenólicos presentes en los extractos entre los cuales los trimeros de procianidinas fueron identificados como los compuestos de mayor presencia

Además de las propiedades antioxidantes, los polifenoles, poseen propiedades de quelación, adsorción, formación de complejos, entre las más significativas, las cuales resultan interesantes para la remoción de contaminantes ambientales como metales pesados, colorantes, bacterias patógenas, mediante técnicas de bioadsorción o fito-extracción (12).

2.2. Actividad biológica

Los residuos de aguacate contienen una alta concentración de compuestos fenólicos, derivados del metabolismo secundario de la planta, compuestos que les confieren algunas propiedades biológicas como antioxidantes y contra algunos padecimientos. Debido a la presencia de estos compuestos fenólicos, diversos investigadores han probado los efectos benéficos a la salud, con el fin de obtener suplementos naturales que puedan servir para algunas afecciones y que sean de fácil acceso (7, 2).

Tremocoldi, Rosalen *et al.* (2018) (1), evaluaron las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de extractos etanólicos de cáscaras y semillas de aguacate, los cuales tuvieron una elevada actividad antioxidante, y los extractos de la cáscara lograron la supresión de TNF- α y la generación de NO, evitando el proceso inflamatorio. Los extractos de semillas de aguacate han demostrado tener un efecto benéfico como coadyuvantes en el tratamiento de la hipertensión. Se evaluó el efecto de un extracto acuoso, sobre la presión sanguínea, los lípidos en plasma y tejidos de ratas hipertensas. El extracto en dosis de 500 mg/kg de peso, logró la reducción de la presión arterial, así como la disminución de los niveles del colesterol total, LDL y triacilglicéridos en plasma, riñón, hígado y corazón, por lo que se concluyó que además de ayudar en el tratamiento de la hipertensión, también ayuda a tener un perfil lipídico favorable (13).

También ha sido evaluado el efecto que tienen los extractos acuosos de semillas de aguacate sobre la glicemia en diferentes modelos animales. Edem, Ekanem *et al.* (2009) (14), evaluaron el extracto obteniendo, teniendo como resultados la disminución de los niveles de glucosa en 75 % en ratas diabéticas y en 36 % en ratas sanas, lo que demostró el efecto hipo y antihiper glucémico de los extractos. Koffi, Kouakou *et al.* (2009) (15), obtuvo una disminución de la glicemia en conejos a los que se les indujo diabetes, la glicemia disminuyó 2 g/L al ser tratados con 20 g/L de extracto, sin embargo, la hiperglicemia se presentó de nuevo unas semanas después de interrumpir el tratamiento.

Otras de las propiedades de los compuestos fenólicos que ha sido estudiada, es la capacidad de estos compuestos de actuar sobre células cancerosas. Extractos etanólicos de semillas de aguacate han demostrado tener un efecto citotóxico en células de cáncer de mama (MCF-7) y células de cáncer de hígado (HepG2) (16).

Se demostró que un extracto metanólico de hojas de aguacate, tuvo un efecto positivo en la inhibición de la α -glucosidasa, la cual es una enzima clave relacionada con la diabetes tipo II, también se demostró que los extractos fueron capaces de reducir el estrés oxidativo causado por la peroxidación lipídica inducida en páncreas de rata (7). Investigadores de África, evaluaron el efecto anti convulsión de extractos acuosos de hojas de aguacate y lo compararon con fármacos que se utilizan para el tratamiento de estas afecciones; obtuvieron como resultados que los extractos de hojas de aguacate producen un

efecto anti convulsionante por lo que puede ser utilizado en el tratamiento de epilepsia infantil. También ha sido evaluado el efecto cardiovascular de los extractos acuosos de hojas de aguacate, los cuales tuvieron efectos vaso relajantes, que contribuyen a los efectos antihipertensivos que tuvo el extracto. Lo que sugiere que las hojas de aguacate, podrían ser usadas como suplemento en el tratamiento de hipertensión y en algunos casos de disfunciones cardiacas (17,18).

Deuschle, Brusco *et al.* (2018) (19), evaluaron una formulación tópica (gel) que contenía extracto de hojas de *P. americana* en un modelo de quemadura inducida por radiación UVB en ratones. El gel con 3 % de extracto pudo prevenir la radiación UVB inducida en el segundo y tercer día después de la irradiación con inhibición máxima del 60 ± 12 % en el segundo día. Dicho efecto puede atribuirse a compuestos fenólicos como la (+) - catequina (302.2 ± 4.9 $\mu\text{g/g}$), ácido clorogénico (130 ± 5.1 $\mu\text{g/g}$) y rutina (102.4 ± 0.9 $\mu\text{g/g}$), los cuales tienen efectos antinociceptivo y antiinflamatorios.

Algunos de los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo confirman la presencia de compuestos bioactivos en las semillas de aguacate. Se realizó la evaluación del efecto de los polifenoles y la fibra de harina de semilla de aguacate, sobre los niveles lipídicos de ratones sometidos a dieta hiperlipidémica. Se cuantificó la concentración de compuestos fenólicos (292.00 ± 9.81 mg equivalentes de ácido gálico/g semilla en peso seco), identificando al ácido protocatecuico, kaempferide y al ácido vanílico como los compuestos fenólicos de mayor presencia, La ingesta de la harina de semilla de aguacate, redujo niveles de colesterol total, LDL-C y la predicción del índice aterogénico. Estos efectos se relacionaron con la actividad antioxidante, contenido de fenoles y contenido de fibra (34.8 %) (20).

2.3. Pigmentos

Además de los compuestos fenólicos presentes en residuos de aguacate, también hay presencia de pigmentos como clorofilas, carotenoides y antocianinas. Entre los pigmentos identificados en la cáscara son luteína, α -caroteno, β -caroteno, neoxantina, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina, clorofila a y b, feofitinas a y b y cianidina 3-O-glucósido (21). La concentración de pigmentos en la semilla, es menor en comparación con la concentración en cáscara, y también es posible encontrar clorofilas a y b y carotenoides. Sin embargo, la concentración de pigmentos en semilla es menos significativa que la presencia de compuestos fenólicos (5). Se han realizado investigaciones para la obtención de un colorante proveniente de la semilla de aguacate. Dabas, Elias *et al.* (2011) (22), observaron que la semilla en agua produce un color anaranjado debido a la actividad de la polifenol oxidasa en los polifenoles que contiene la semilla. El color resultó estable a pH entre 2 a 11 y a la presencia de oxígeno, sin embargo, no fue estable a altas temperaturas o a condiciones anaeróbicas. Arlene, Prima *et al.* (2015) (23), analizaron el colorante obtenido utilizando una extracción asistida con ultrasonido y atribuyeron que el color naranja, se debe a la presencia de furfural.

En las hojas de aguacate se lleva a cabo la fotosíntesis por tal razón contienen una alta concentración de pigmentos necesarios para que la planta realice este proceso. Estos compuestos (clorofilas y carotenoides) son de naturaleza hidrofóbica, por lo que recientemente nuestro grupo de trabajo, evaluó la capacidad de los aceites vegetales para la extracción de clorofilas y carotenos presentes en hojas de aguacate variedad Hass y criollo, esto se realizó con el fin de utilizar un disolvente que tenga un menor impacto ambiental. Fueron evaluados dos aceites (maíz y cártamo) y comparados con extractos de hexano. La cantidad de clorofilas y carotenoides extraídos de las hojas de aguacate criollo fue mayor que para la variedad Hass, lo que se comprobó realizando la extracción de estos compuestos utilizando un disolvente de baja polaridad como el hexano. El contenido diferenciado de ácidos grasos saturados entre los aceites de maíz y cártamo utilizados como disolventes, provocan la extracción de bioactivos con diferente capacidad antioxidante, el aceite de maíz al contener una mayor cantidad de ácidos grasos saturados, extrae la mayor cantidad de carotenoides con actividad antioxidante (24).



Figura 2. Extractos de hojas de aguacate criollo y Hass, con aceite de maíz y cártamo

2.4. Actividad antimicrobiana

Los frutos del aguacate, contienen en su cáscara células especializadas denominadas *idioblastos*, las cuáles producen una sustancia oleosa que contiene alcaloides, hidroperóxidos y otros terpenos, los cuales además de poseer actividad antioxidante, pueden ser capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de hongos patógenos para el aguacate (25,26). Adikaram, Ewing *et al.* (1992) (27), aislaron tres compuestos antifúngicos de cáscaras de aguacates inmaduros, mismos compuestos que habían sido previamente aislados de semillas de aguacate, estos compuestos se probaron frente *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la antracnosis, enfermedad que provoca pérdidas para los productores de aguacate.

Se han realizado estudios en extractos de cáscaras y semillas de aguacate para determinar su actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos como hongos, bacterias gram positivas y negativas; así como su actividad larvicida. Leite, Brito *et al.* (2009) (28), evaluaron el efecto antifúngico de extractos de semillas de aguacate utilizando hexano y metanol, contra tres levaduras de interés en la medicina humana y veterinaria, las cuales fueron: *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* y *Malassezia pachydermatis*. La concentración inhibitoria para el crecimiento de *Candida*, fue de 0.312 -1.25 mg / mL para el extracto de hexano (HE) y de 0.125 a 0.625 mg / mL para el extracto metanólico (ME). Para *Cryptococcus neoformans* fue de 0.31 – 0.63 mg/mL HE y 0.08 – 0.156 mg / mL ME. En el caso de *Malassezia pachydermatis*, los valores de concentración inhibitoria fueron de 0.03 y 0.63 mg / mL HE y 0.32 a 0.63 mg / mL ME (28).

Raymond Chia & Dykes (2010) (29), confirmaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de semillas de aguacate contra cuatro bacterias gram positivas, seis bacterias gramnegativas y una levadura. Una concentración de 104.2 a 416.7 µg/mL de extractos etanólico, mostró actividad antimicrobiana frente bacterias gram positivas y gram negativas, con excepción de *E. coli*. Y es necesaria una concentración de 500 µg/mL de extracto etanólico, para inhibir a *Zygosaccharomyces bailii*. El extracto etanólico de semillas de aguacate no fue capaz de lograr la inhibición de *Penicillium spp.* y *Aspergillus flavus*.

Debido a los estudios que demuestra la actividad inhibitoria de crecimiento microbiano de extractos de residuos de aguacate, se ha evaluado la incorporación de estos extractos en sistemas alimenticios, como aditivos naturales eficientes para extender su vida útil. Rodríguez-Carpena, Morcuende *et al.* (2011) (8), probaron diferentes extractos de semillas de aguacate contra patógenos y microorganismos de productos cárnicos, concluyendo que los extractos de semilla de aguacate, presentaron actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y negativas. El efecto inhibitorio más alto fue para *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Las bacterias más resistentes fueron *Pseudomonas spp.* y *Aspergillus niger*.

Boadi, Saah *et al.* (2015) (30), investigaron el efecto antimicrobiano de extractos de hojas de aguacate obtenidos con methanol, etil acetato, cloroformo y éter de petróleo. Obteniendo como resultados, que todos los extractos fueron efectivos contra el crecimiento de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*; siendo los extractos metanólicos los que presentaron una mayor zona de inhibición.

Salinas-Salazar, Hernández-Brenes *et al.* (2017) (31), determinaron la capacidad de acetogeninas extraídas de las semillas de aguacate para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, con el fin

de eliminar el uso de aditivos sintéticos. Por lo que la actividad del extracto rico en acetogeninas, fue comparado con dos antimicrobianos comerciales, obteniendo como resultados que el extracto rico en acetogeninas, así como las moléculas purificadas como persenona C, A y AcO-avocadenina, tuvieron efectos similares a los productos comerciales utilizados para la eliminación de la *Listeria*. Por lo que concluyeron que las acetogeninas provenientes de semillas de aguacate pueden ser utilizadas como un aditivo natural para la eliminación de *Listeria*.

En nuestro grupo de trabajo, fueron evaluados un extracto metanólico (70 %) y uno con hexano-diclorometano (1:1) de cáscara de aguacate, tanto en su capacidad antioxidante (método DPPH) como en su capacidad antimicótica. La actividad antioxidante de los extractos de cáscara de aguacate, fue medida como el porcentaje de inhibición del radical DPPH, en esta determinación, los extractos metanólicos fueron los que mostraron un mejor resultado (44 %) en comparación con el resultado obtenido para los extractos de hexano-diclorometano (2 %). La evaluación de la actividad antimicótica de la cáscara de aguacate, fue realizado utilizando la técnica de los sensidiscos, utilizando cepas de *C. albicans* y *Actinomicetos*. Los resultados obtenidos fueron que los extractos preparados, muestran un efecto inhibitorio del crecimiento a las 24 h de la incubación de los microorganismos, sin embargo, esta inhibición del crecimiento desciende paulatinamente hasta perder su actividad de inhibición, por lo que es necesario realizar una evaluación más profunda de estos extractos con el fin de evaluar su potencial antimicótico.

2.5. Biocombustibles

Debido al reciente interés hacia residuos como la semilla de aguacate, se ha evaluado su composición química, obteniendo que sus principales componentes son lípidos, proteínas y carbohidratos (28,8). Entre los carbohidratos que se encuentran en las semillas de aguacate, se encuentra el almidón, ya que contiene aproximadamente el 30 % de este. Este polímero puede ser utilizado para diferentes aplicaciones como gelificante en alimentos, en la producción de papel, en la industria farmacéutica, entre otros (2), además de estas aplicaciones, el almidón extraído de semilla de aguacate se ha estudiado como una fuente para la producción de bioetanol, después de someter las semillas a diferentes pretratamientos con el fin de optimizar la extracción. Para la producción de este combustible, el almidón es hidrolizado y posteriormente se fermenta utilizando a *Saccharomices cerevisiae*, obteniendo como producto final etanol. Woldu and Tsigie (2015) (32), optimizaron las condiciones de fermentación para la obtención de bioetanol. Las condiciones óptimas con las que se obtuvo la mayor producción de etanol, fueron 3 días de fermentación a 30 °C, utilizando un pH 5.5.

Además de la producción de bioetanol, la semilla ha sido evaluada como posible biocombustible para la futura sustitución de biocombustibles que tienen su origen en madera. Después de la evaluación de parámetros energéticos, concluyeron que la semilla de aguacate podría ser utilizada como combustible doméstico o para el calentamiento a nivel industrial (33).

2.6. Biosorción

Algunos estudios, han demostrado que los residuos de aguacate pueden ser utilizados para la remoción de compuestos contaminantes de aguas residuales de diferentes industrias. Elizalde-González, Mattusch *et al.* (2007) (34), obtuvieron un adsorbente a partir de semillas de aguacate, la preparación del material consistió en una activación física a temperaturas mayores a 1000 °C y bajo diferentes condiciones (con y sin ácido fosfórico; con y sin carbonizar). El material adsorbente obtenido, tuvo concentraciones elevadas de oxígeno, y después de la carbonización, la superficie retiene grupos ácidos, principalmente restos fenólicos y también aumenta la superficie activa específica. Los adsorbentes, fueron capaces de adsorber colorantes básicos como violeta 16 y azul 9, debido a la presencia de grupos ácidos en sus superficies activas, pero también fue capaz de adsorber colorantes ácidos como azul 74 y verde 25.

Cristiani-Urbina, Netzahuatl-Muñoz *et al.* (2011) (35), utilizaron la cáscara de aguacate para remover cromo hexavalente de soluciones acuosas, obtuvieron como resultados que la cáscara de aguacate fue capaz de remover el cromo hexavalente vía biotransformación del Cr (VI) a Cr (III) y por biosorción de cromo. Logrando la remoción de 101.81 mg de Cr (VI)/ g de cáscara. Analizando la cinética de biosorción, sugirieron que la adsorción se realizó debido al intercambio de electrones entre la cáscara y los iones cromo, la complejación, coordinación y/o la quelación.

Vázquez-Palma, Netzahuatl-Muñoz *et al.* (2017) (36), evaluaron el uso de cáscara de aguacate como bioasorbente en la remoción de Ni (II), mediante FTIR, demostraron que la presencia de grupos carboxilo y grupos funcionales aromáticos, son los responsables del potencial de la cáscara de aguacate como biosorbente.

3. Conclusiones

Las investigaciones realizadas hasta el momento, con cáscara, semilla y hojas de aguacate, en los que se demuestra la presencia de compuestos que les confieren algunas propiedades como antioxidantes, antiinflamatorios, disminución de colesterol, biosorbentes, entre otras propiedades; son un buen antecedente para demostrar el potencial de estos residuos, como fuente atractiva de aditivos para su uso en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, dándoles un valor agregado a los residuos y mitigando el impacto ambiental que se genera al desecharlos.

Referencias

1. Tremocoldi, M.A., Rosalen, P.L., Franchin, M., Massarioli, A.P., Denny, C., Daiuto, É.R., Paschoal, J., Melo, P.S., & Alencar, S.M. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PLoS one*, *13*(2), e0192577.
2. Araújo, R.G., Rodríguez-Jasso, R.M., Ruíz, H.A., Pintado, M., & Aguilar, C.N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, *80*, 51-60.
3. Chel-Guerrero, L., Barbosa-Martín, E., Martínez-Antonio, A., González-Mondragón, E., & Betancur-Ancona, D. (2016). Some physicochemical and rheological properties of starch isolated from avocado seeds. *International journal of biological macromolecules*, *86*, 302-308.
4. Duarte, P.F., Chaves, M. A., Borges, C.D., & Mendonça, C.R.B. (2016). Avocado: characteristics, health benefits and uses. *Ciência Rural*, *46*, 747-754.
5. Wang, W., Bostic, T.R., & Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, *122*(4), 1193-1198.
6. López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Pasini, F., Caboni, M.F., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2016). HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS and HPLC-FLD-MS as valuable tools for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part and by-products of avocado. *LWT*, *73*, 505-513.
7. Oboh, G., Isaac, A.T., Akinyemi, A.J., & Ajani, R.A. (2014). Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rats' pancreas by phenolic extracts of avocado pear leaves and fruit. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, *10*(3), 208.
8. Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., Andrade, M.J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(10), 5625-5635.
9. Segovia Gómez, F., Sánchez, S., Iradi, M., Azman, N., & Almajano, M. (2014). Avocado Seeds: extraction optimization and possible use as antioxidant in food. *Antioxidants*, *3*(2), 439.
10. Segovia, F., Hidalgo, G., Villasante, J., Ramis, X., & Almajano, M. (2018) Avocado Seed: A comparative study of antioxidant content and capacity in protecting oil models from oxidation. *Molecules*, *23*(10), 2421.
11. Jiménez, P., García, P., Bustamante, A., Barriga, A., & Robert, P. (2017). Thermal stability of oils added with avocado (*Persea americana* cv. Hass) or olive (*Olea europaea* cv. Arbequina) leaf extracts during the French potatoes frying. *Food Chemistry*, *221*, 123-129.
12. Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2015). Bioremediation potential of natural polyphenol rich green wastes: A review of current research and recommendations for future directions. *Environmental Technology & Innovation*, *4*, 17-28.
13. Imafidon, K.E., & Amaechina, F.C. (2013). Effects of Aqueous Seed Extract of *Persea americana* Mill. (Avocado) on Blood Pressure and Lipid Profile in Hypertensive Rats. *Advances in Biological Research*, *4*(2), 116-121.
14. Edem, D., Ekanem, I., & Ebong, P. (2009). Effect of aqueous extracts of alligator pear seed (*Persea americana* mill) on blood glucose and histopathology of pancreas in alloxan-induced diabetic rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, *22*(3).
15. Koffi, N., Kouakou, E., & Dodiomon, S. (2009). Effect of aqueous extract of *Persea americana* seeds on the glycemia of diabetic rabbits. *European Journal of Science Research*, *26*(3), 376-385.

16. D'Ambrosio, S.M., Han, C., Pan, L., Kinghorn, A.D., & Ding, H. (2011). Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409 (3), 465-469.
17. Ojewole, J.A., & Amabeoku, G.J. (2006) Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice. *Phytotherapy Research*, 20 (8), 696-700.
18. Gondwe, M.M., Ojewole, J.A., Moodley, K., Musabayane, C.T., & Kamadyaapa, D.R. (2007). Cardiovascular effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (avocado) aqueous leaf extract in experimental animals: cardiovascular topic. *Cardiovascular Journal of South Africa*, 18 (2), 69-76.
19. Deuschle, V., Brusco, I., Piana, M., Faccin, H., de Carvalho, L. M., Oliveira, S. M., & Viana, C. (2019). *Persea americana* Mill. crude extract exhibits antinociceptive effect on UVB radiation-induced skin injury in mice. *Inflammopharmacology*, 27 (2), 323-338.
20. Pahlua-Ramos, M.E., Ortiz-Moreno, A., Chamorro-Cevallos, G., Hernández-Navarro, M.D., Garduño-Siciliano, L., Necochea-Mondragón, H., & Hernández-Ortega, M. (2012). Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 67 (1), 10-16.
21. Ashton, O.B., Wong, M., McGhie, T.K., Vather, R., Wang, Y., Requejo-Jackman, C., Ramankutty, P., & Woolf, A.B. (2006). Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (26), 10151-10158.
22. Dabas, D., Elias, R.J., Lambert, J.D., & Ziegler, G.R. (2011). A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. *Journal of food science*, 76 (9), C1335-C1341.
23. Arlene, A.A., Prima, K.A., Utama, L., & Anggraini, S.A. (2015). The Preliminary Study of the Dye Extraction from the Avocado Seed Using Ultrasonic Assisted Extraction. *Procedia Chemistry*, 16, 334-340.
24. Plazola-Jacinto, C.P. (2018) *Efecto de la microencapsulación sobre los compuestos bioactivos de extractos oleosos de hojas de aguacate (Hass y criollo)*. Tesis de Doctorado en Ciencias Químico-biológicas, E.N.C.B. -I.P.N.
25. Sivanathan, S., & Adikaram, N.K.B. (1989) Latency of infection in unripe avocados by *Colletotrichum gloeosporioides* is not due to inadequate enzyme potential. *Journal of Phytopathology*, 125 (2), 110-116.
26. Domergue, F., Helms, G.L., Prusky, D., & Browse, J. (2000). Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry*, 54 (2), 183-189.
27. Adikaram, N.K.B, Ewing, D.F, Karunaratne, A.M., & Wijeratne, E.M.K. (1992). Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. *Phytochemistry*, 31 (1): 93-96
28. Leite, J.J., Brito, E.H., Cordeiro, R.A., Brilhante, R.S., Sidrim, J.J., Bertini, L.M., Morais, S.M., & Rocha, M.F. (2009). Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42 (2), 110-113.
29. Raymond Chia, T.W., & Dykes, G.A. (2010). Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. *Pharmaceutical biology*, 48 (7), 753-756.
30. Boadi, N.O., Saah, S.A., Mensah, J.K., Badu, M., Addai-Arhinand, S., & Mensah, M. B. (2015). Phytoconstituents, antimicrobial and antioxidant properties of the leaves of *Persea americana* Mill cultivated in Ghana. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9 (36), 933-939.
31. Salinas-Salazar, C., Hernández-Brenes, C., Rodríguez-Sánchez, D.G., Castillo, E.C., Navarro-Silva, J.M., & Pacheco, A. (2017). Inhibitory Activity of Avocado Seed Fatty Acid Derivatives (Acetogenins) Against *Listeria Monocytogenes*. *Journal of food science*, 82 (1), 134-144.
32. Woldu, A.R., & Tsigie, Y.A. (2015) Optimization of hydrolysis for reduced sugar determination from avocado seed wastes. *American Journal of Environment Energy and Power Research*, 3, 1-10.
33. Perea-Moreno, A.J., Aguilera-Ureña, M.J., & Manzano-Agugliaro, F. (2016) Fuel properties of avocado stone. *Fuel*, 186 358-364.
34. Elizalde-González, M.P., Mattusch, J., Peláez-Cid, A.A., & Wennrich, R. (2007). Characterization of adsorbent materials prepared from avocado kernel seeds: natural, activated and carbonized forms. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 78, 185-193.
35. Cristiani-Urbina, E., Netzahuatl-Muñoz, A.R., & Cristiani-Urbina, M. (2011). Removal of Hexavalent and Total Chromium from Aqueous Solution by Avocado Shell. *Chemical engineering transactions*, 24, 1339-1344.
36. Vazquez-Palma, D.E., Netzahuatl-Munoz, A.R., Pineda-Camacho, G., & Cristiani-Urbina, E. (2017). Biosorptive removal of nickel (II) ions from aqueous solutions by hass avocado (*Persea Americana* mill. Var. Hass) shell as an effective and low-cost biosorbent. *Fresenius Environmental Bulletin*, 3501-3513.

Capítulo 3

Descartes de flores comestibles como fuente de compuestos bioactivos: caso rosas

Julieta Gabilondo¹, Laura Sara Malec²

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria San Pedro. Argentina. gabilondo.julieta@inta.gob.ar

²Universidad de Buenos Aires. Facultad. Ciencias Exactas y Naturales. Dpto. Química Orgánica. Argentina. malec@qo.fcen.uba.ar

Resumen

Desde tiempos remotos se han empleado diversos tipos de flores en la elaboración de alimentos debido a su valor nutricional, efectos medicinales, sabor y apariencia estética. Entre las flores más populares, el género *Rosa* es considerado uno de los más versátiles, ofreciendo una amplia gama de formas de planta y flores de diversos tamaños y colores. Sus pétalos presentan elevados contenidos en vitaminas, minerales y compuestos bioactivos, particularmente polifenoles. En este capítulo se detallan los principales compuestos bioactivos identificados, las diferencias encontradas entre los diferentes cultivares, la relación de estos compuestos con el color de los pétalos, así como también otras posibles fuentes de variación en los contenidos de estos compuestos. Se describe además, la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos. Finalmente, se proponen posibles usos, tanto de los pétalos como de los bioactivos extraídos, con el fin de aprovechar sus características funcionales, reducir los desechos y lograr una producción más eficiente del cultivo.

1. Flores comestibles. Características

El consumo de flores como alimento (florifagia) es una práctica muy antigua pero poco conocida. Desde tiempos remotos, en distintas culturas (china, romana, medio oriente, india, europea y americana) se han empleado diversos tipos de flores en la elaboración de alimentos debido a su valor nutricional, efectos medicinales, sabor y apariencia estética (1,2). Entre las flores más populares se encuentran amapolas, rosas, claveles, azahares, crisantemos, pensamientos, jazmines, gladiolos y violetas, que suelen utilizarse en la elaboración de infusiones, tortas, ensaladas, postres, bebidas e innumerables comidas (2,3). A pesar de que se describen más de 55 géneros como flores comestibles (4,5), en la actualidad no hay listas oficiales de las mismas emitidas por ningún centro internacional, como Food and Agriculture Organization (FAO), World Health Organization (WHO) o European Food Safety Authority (EFSA). Debido a su uso en la alimentación humana, las flores deberían ser aptas microbiológicamente y estar libre de todo tipo de agroquímicos (pesticidas, fertilizantes no orgánicos, funguicidas o herbicidas). Sin embargo, no existen requisitos legales para su comercialización.

Por lo general, las flores se consumen enteras. Aunque en algunas, como rosas, tulipanes y crisantemos, sólo los pétalos son comestibles. También es importante tener en cuenta la cantidad consumida, ya que en determinadas flores su toxicidad depende de la dosis ingerida, como por ejemplo es el caso de la madreleña, crisantemo blanco e hibiscus chino (5). Otro factor a considerar es que ciertas flores pueden generar alergia en algunas personas como es el caso de las flores de tilo, manzanilla y diente de león (6).

De acuerdo a Mlcek y Rop (2), desde el punto de vista nutricional, las flores se pueden dividir en tres componentes principales: polen, néctar y pétalos y otras partes, como, por ejemplo, el pistilo en el azafrán. El polen es fuente de proteínas, carbohidratos, lípidos saturados e insaturados, carotenoides y flavonoides. El néctar contiene una mezcla equilibrada de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa), junto con aminoácidos, proteínas, iones inorgánicos, lípidos, ácidos orgánicos, sustancias fenólicas, alcaloides y terpenoides entre otros. Los pétalos son ricos en vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes.

2. El género Rosa

2.1. Características generales

El género *Rosa* es considerado uno de los más versátiles, ofreciendo una amplia gama de formas de planta y flores de diversos tamaños y colores. Otra particularidad es que florecen constantemente desde principios de primavera hasta finales de otoño. Pertenecen a la familia *Rosaceae*, que está compuesta por más de cien especies de arbustos espinosos y floridos (7).

La American Rose Society (Sociedad Americana de Rosas, EUA) clasifica a las rosas en 3 grupos principales:

- **Especies**, a menudo denominadas "rosas silvestres", suelen ser de pétalos simples (4-8 pétalos), que florecen una vez y tienen un tamaño de arbusto que varía de 60 cm a 6 m.
- **Rosas antiguas**: en 1966, la American Rose Society las definió como aquellas que existían antes de 1867, año de la introducción del primer híbrido de té, 'La France'. Las más conocidas son *R. centifolia*, *R. china*, *R. damascena*, *R. china híbrida* y *R. gállica híbrida*. Se caracterizan por poseer fuerte fragancia.
- **Rosas modernas** (clases que no existían antes de 1867), que representan más del 95 % de los rosales que se plantan; dentro de este grupo podemos encontrar distintos tipos de rosas:

Híbridos de té y Grandiflora: se caracterizan por presentar flores grandes que contienen de 30 a 50 pétalos. Las flores se llevan en tallos largos, su ciclo de floración es de 6 a 7 semanas. Las Grandifloras, a su vez, se caracterizan por la capacidad de formar racimos de flores y crecer hasta una altura de hasta 2 m.

Floribunda y Polyantha: son plantas de porte bajo (0,5 m aproximadamente), se caracterizan por su gran capacidad para llevar flores en grandes racimos y presentan floración continua. Las Polianthas son generalmente plantas más pequeñas pero robustas con grandes grupos de pequeñas floraciones.

Miniatura y Miniflora: La altura de la planta promedio es de aproximadamente 40 a 80 cm, y la forma de la flor y el follaje son versiones en miniatura de Híbridos de té y Floribundas.

Arbusto: Pueden crecer de 1.5 a 4.5 m o más en todas direcciones, dado el clima y las condiciones de crecimiento correctas. Se destacan por su resistencia, generalmente son vigorosos y producen grandes cantidades de racimos de flores.

Existe una enorme variedad de cultivares de rosa, que se obtienen a partir de diversas hibridaciones. Las especies mayormente implicadas en los cultivares son: *Rosa moschata*, *Rosa gallica*, *Rosa damascena*, *Rosa californica* y *Rosa rugosa*.

El cultivo de las plantas de rosa puede realizarse para la industria de la flor de corte o para ser vendidas como plantas ornamentales. Estas últimas, se venden en maceta o a raíz desnuda. En el tiempo que lleva la obtención de una planta de tamaño comercial, se producen varias floraciones, las cuales se desechan, dejando el material a campo (Figura 1).



Figura 1. Vista de un lote de rosas en producción para su posterior venta en maceta

2.2. Composición, compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Se realizaron pocos estudios acerca de la composición nutricional de flores comestibles, y la mayor parte de éstos reportaron que el contenido de los componentes principales, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y vitaminas, no es muy diferente de la composición de otros vegetales (4,8). Como se mencionó previamente, los análisis realizados en los pétalos revelaron elevados contenidos en vitaminas, minerales y antioxidantes. En particular, Prata *et al.* (9) reportaron que algunos cultivares de rosas presentaban en sus pétalos contenidos significativamente mayores de ciertos minerales que los de otras flores. Por el contrario, la cantidad de trabajos acerca de la actividad antioxidante y compuestos bioactivos en flores es elevada, reportándose altos contenidos de antioxidantes, especialmente compuestos fenólicos, en los pétalos de la mayor parte de las flores comestibles analizadas (8,10,11).

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de fitoquímicos clasificados como metabolitos secundarios. Éstos desempeñan diversas funciones fisiológicas en las plantas, como intervenir en el crecimiento, reproducción y procesos defensivos frente a distintos tipos de estrés. Por otro lado, la actividad antioxidante de estos compuestos está implicada en la prevención de los procesos oxidativos que intervienen en numerosas patologías. Dentro de las actividades biológicas asociadas a beneficios para la salud humana se encuentran sus efectos anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, antialérgicos, antivirales e inhibidores de enzimas prooxidantes (12-14). Por lo tanto, el consumo de alimentos con elevado contenido de compuestos fenólicos podría proteger el cuerpo humano contra diversos trastornos como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (15,16). La capacidad antioxidante de los polifenoles está definida por su habilidad para atrapar radicales libres, donar átomos de hidrógeno o electrones y quelar iones metálicos (17). Por lo tanto, estos antioxidantes naturales, no sólo pueden aportar beneficios para la salud, sino que también tienen la capacidad de evitar o retardar la oxidación lipídica, mejorando la calidad y estabilidad de los alimentos (18,19).

Entre los diferentes estudios realizados en flores, los pétalos de rosa han demostrado contener elevados niveles de antioxidantes, particularmente polifenoles. Li *et al.* (10) evaluaron la actividad antioxidante y el contenido de los fenoles totales de 51 especies de flores silvestres y comestibles y hallaron que *Rosa híbrida* fue la que presentó el mayor contenido de estos compuestos. También VanderJagt *et al.* (20), al analizar la actividad antioxidante en infusiones acuosas de 30 plantas medicinales, reportaron que los niveles en los pétalos de rosa (*Rosa* sp.) se encontraban entre los más elevados.

Entre los trabajos realizados con rosas, los valores de actividad antioxidante y los contenidos de compuestos bioactivos no siempre son sencillos de comparar, ya que los estándares utilizados y las formas de expresión de los resultados pueden variar, así como también los métodos de extracción de los compuestos responsables de la actividad antioxidante. Los procedimientos para extraer antioxidantes incluyen diferentes temperaturas, tiempos, solventes y métodos de extracción. Las extracciones a baja temperatura requieren tiempos mucho más prolongados, generalmente mayores que 12 hs. La selección del solvente depende en gran medida de la naturaleza de los compuestos bioactivos a analizar. En el caso de las rosas, los de mayor polaridad demostraron ser los más efectivos. Metanol y soluciones metanólicas son los solventes más frecuentemente utilizados. También se suelen utilizar etanol y sus mezclas con agua, acetona, isopropanol y agua (8,21). En particular, Patil *et al.* (22) analizaron los antioxidantes de *Rosa damascena* utilizando diferentes solventes de extracción y encontraron que la actividad antioxidante y los mayores contenidos de fenoles totales y flavonoides totales en los pétalos frescos y secos se obtuvieron en el extracto etanólico. Por otro lado, Pal *et al.* (23), al analizar extractos de pétalos de rosas rojas en solventes de diferente polaridad, encontraron que las soluciones acuosas presentaron el mayor potencial antioxidante. De acuerdo a Friedman *et al.* (24), todos los cultivares de rosa analizados presentaron mayores niveles de antioxidantes hidrofílicos que lipofílicos, siendo el contenido de los primeros, en promedio, 100 veces más elevados. Sin embargo, a pesar de la preponderancia de compuestos bioactivos polares, con extractos de *Rosa rugosa* en hexano también se logró inhibir la peroxidación lipídica y prevenir el daño oxidativo (25).

Por otra parte, algunos autores observaron variaciones significativas en el contenido de compuestos fenólicos durante el crecimiento de los pétalos de algunas variedades de rosas, pero los resultados varían de acuerdo a los cultivares y a los compuestos estudiados (34,35). También pueden influir la estación y el medio en que se desarrolla la planta, fundamentalmente aspectos como la luz solar, la temperatura y el suelo (36). Se deduce entonces que, al momento de seleccionar las flores, tanto para

su consumo como alimento funcional como para la obtención de antioxidantes naturales, debería tenerse en cuenta el tipo y color del cultivar, la etapa de desarrollo con mayor contenido de estos compuestos y los factores ambientales, con el fin de optimizar su aprovechamiento.

Los flavonoides constituyen los principales compuestos fenólicos de los pétalos de flores. Entre éstos, los principales grupos identificados en las rosas son las antocianinas y los flavonoles, habiéndose atribuido a estos compuestos algunos efectos farmacológicos (26,27).

También se han encontrado en los pétalos de algunos cultivares de rosas, cantidades significativas de carotenoides (9,28), los que serían probablemente, los principales responsables de la actividad antioxidante en los extractos lipofílicos. Estos compuestos tienen también, la capacidad de disminuir el riesgo de deficiencia de vitamina A, cáncer y enfermedades cardiovasculares (29,30).

Los compuestos bioactivos, fundamentalmente flavonoides y carotenoides, han sido asociados, además, a los diferentes colores que pueden presentar las flores (2). Las antocianinas son los principales responsables de la mayor parte de los colores rojos, púrpura y azulados, mientras que los carotenoides se asocian a los amarillos y anaranjados. Los colores de las rosas abarcan un amplio espectro que va desde el blanco hasta el púrpura intenso, siendo los carotenoides los principales responsables de los colores amarillos, las antocianinas de los rojos y rosas, y los naranjas se deben a una mezcla de ambos (31,32). Se deduce entonces, que la cantidad y variedad de estos compuestos puede diferir considerablemente entre los diferentes cultivares.

En estudios realizados en nuestro laboratorio con cultivares de rosas de diferentes colores (Figura 2), se observó una positiva correlación entre el parámetro b^* del espacio CIELAB, que representa la desviación hacia el color amarillo, y el contenido de carotenoides totales, siendo el coeficiente de determinación (R^2) 0,770. En particular, el cultivar *Cristóbal Colón*, de color naranja, presentó un contenido notablemente más alto ($p < 0,05$) que el resto de los cultivares analizados. Asimismo, Bhattacharyya *et al.* (33), analizando flores de caléndula de diferentes colores informaron mayores contenidos de luteína en las variedades de color naranja.

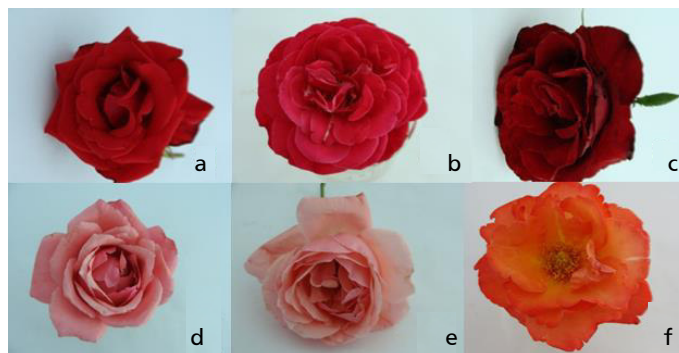


Figura 2. Flores de los cultivares: a) "Kardinal", b) "Traviata", c) "Gran Gala", d) "Bella Época", e) "Queen Elizabeth", f) "Cristóbal Colón"

En cuanto al contenido de fenoles totales y de flavonoides de los mismos cultivares, las correlaciones con el parámetro a^* , que representa la desviación hacia el color rojo (R^2 0,880 y 0,883 respectivamente), y con la luminosidad (L^*) (R^2 0,929 y 0,938 respectivamente), resultaron considerablemente elevadas. Otros trabajos también reportaron buenas correlaciones entre estos mismos índices colorimétricos y el contenido de fenoles totales (9) o de antocianinas en rosas (34).

2.3. Compuestos bioactivos individuales

Como mencionamos anteriormente, los principales compuestos fenólicos hallados en las flores son los flavonoles y antocianinas. En los pétalos de las rosas, las antocianinas identificadas en los diferentes cultivares estudiados fueron cianidina, pelargonidina y sus derivados mono o diglicosilados en las posiciones 3- o 3,5-, generalmente con glucosa, pero también en algunos casos con ramnosa o arabinosa. La proporción de cianidina y pelargonidina varía dependiendo del cultivar (34, 37,38). Lee *et al.* (27) al analizar

las antocianinas en *Rosa hybrida* cultivar 'Noblered', identificaron los compuestos cianidin3, 5-di O-glucósido y pelargonidina 3,5-di O-glucósido como componentes mayoritario y minoritario respectivamente. El primero exhibió una elevada actividad antioxidante, mientras que el segundo demostró una alta actividad anticáncer.

De acuerdo a Dela *et al.* (39), la temperatura es uno de los principales factores externos que afectan la acumulación de antocianinas en los tejidos de las plantas. Estos autores observaron que la concentración de estos pigmentos aumentaba a bajas temperaturas y disminuía a temperaturas elevadas, probablemente debido a un aumento de la degradación de los mismos y a una disminución de la velocidad de síntesis con el incremento de la temperatura; también indicaron que la temperatura podría afectar la proporción pelargonidina / cianidina.

Entre los flavonoles identificados en los pétalos de rosas, los principales fueron kaempferol y quercetina, fundamentalmente como glicósidos. Al igual que las antocianinas, la proporción de estos flavonoles varía de acuerdo al cultivar (2, 37, 40,41). Otros fenoles encontrados en pétalos de algunos cultivares de rosas fueron ácido gálico y los flavonoidespeonidina y miricetina, aunque generalmente en menores concentraciones (8).

Por otro lado, en cultivares de colores amarillo y naranja, se han identificado una amplia variedad de compuestos carotenoides, entre los que predominaron las xantófilas, principalmente violaxantina y sus isómeros (28,31). La gran diversidad de los carotenoides identificados en estas rosas contrasta con un número mucho más acotado de antocianinas. A pesar de esto, las antocianinas son más determinantes para los diversos colores de estas flores, ya que abarcan una mayor parte del espectro.

En cuanto a la variación de los diferentes compuestos bioactivos durante el desarrollo de la flor, Schmitzer *et al.* (34) observaron en *Rosa hybrida* 'KORcsett', una disminución de todos los compuestos fenólicos analizados. Algunos compuestos se encontraban en concentraciones considerablemente mayores en los pimpollos, observándose las diferencias más notables en el ácido gálico, con concentraciones seis veces mayores que en las flores senescentes. También Wan *et al.* (28) reportaron variaciones en los contenidos de los diferentes flavonoides y carotenoides durante el desarrollo de rosas 'Sun City'.

2.4. Actividad antimicrobiana

En el transcurso de su ciclo de vida, las plantas están sujetas a diversas formas de ataques por plagas, depredadores y patógenos como bacterias, hongos y virus, así como por organismos herbívoros como insectos, reptiles y mamíferos. Entre sus mecanismos de defensa se encuentra la síntesis de una amplia variedad de metabolitos secundarios que van desde moléculas orgánicas muy simples como los monoterpenos hasta compuestos orgánicos altamente complicados como los taninos, saponinas y ligninas (42). Estos compuestos son capaces de brindarles protección contra los agentes infecciosos otorgando así un sistema de defensa natural para la reproducción y perpetuación a través de la formación de semillas.

En los últimos años se ha generado una búsqueda de nuevas fuentes de compuestos antimicrobianos naturales debido a que éstos reducen el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los antibióticos, controlan la contaminación cruzada por patógenos transmitidos por alimentos, mejoran las tecnologías de conservación de los alimentos y fortalecen el sistema inmunitario en el organismo humano. Dentro de las fuentes naturales en las que se ha comenzado a investigar este tipo de compuestos se encuentran las plantas o partes de ellas, que pueden incluir semillas, frutas, raíces, rizomas y flores. Los extractos florales y sus aceites esenciales también se consideran potenciales agentes antimicrobianos naturales. Algunos autores han reportado que poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos y de deterioro atribuyendo su eficacia a sus constituyentes bioactivos (43).

La actividad antimicrobiana en los pétalos de rosas parece variar entre los diferentes cultivares, así como también de acuerdo con las técnicas de evaluación (44,45). Mankar (46) halló que la actividad antibacteriana de 22 cultivares de rosa fue similar a la de los antibióticos estándar en términos de la zona de inhibición. Otro estudio realizado con extractos metanólicos de pétalos de *Rosa rugosa* mostró actividad antimicrobiana contra ocho bacterias (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *M. luteus*, *E. Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) y dos cepas de levaduras (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*) (47). Por otro lado, Hirulkary Agrawal (44) evaluaron extractos de pétalos de rosa usando distintos solventes y en todos hallaron actividad antimicrobiana contra 10 cepas bacterianas, como *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacteria erogens*, *Proteus vulgaris*,

Staphylococcus aureus, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Incluso, los extractos alcohólicos mostraron mayores zonas de inhibición para *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con el antibiótico estreptomina. Al igual que en los estudios acerca de la actividad antioxidante, se encontró mayor actividad antimicrobiana en los extractos de pétalos de rosa utilizando solventes polares, como agua, etanol o metanol que en los no polares como éter de petróleo, cloroformo o hexano (43).

Gabilondo *et al.* (48) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de cultivares de rosa de distinto color de pétalos y hallaron que los cultivares 'Kardinal' y 'Gran Gala', ambos de pétalos rojos (Figura 2), fueron efectivos sobre todos los indicadores evaluados (*Zygosaccharomyces bailii*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shewanella putrefaciens*). Es de destacar que ambos cultivares presentaron mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante que otros de pétalos color amarillo, rosa y naranja analizados. También China *et al.* (49) observaron mayor actividad antimicrobiana en extractos con elevados contenidos de polifenoles y actividad antioxidante.

2.5. Usos y aplicaciones de los pétalos de rosas

Las flores son usadas en la gastronomía mundial para mejorar la estética de los platos, crear nuevas recetas y dar aromas frescos y exóticos. En los últimos años aumentó el interés por las flores comestibles dentro del campo de las investigaciones en fitoquímicos debido a los efectos positivos observados, asociados a la salud humana (5). Los pétalos de rosa se utilizan para elaborar infusiones, mermeladas, ensaladas, sopas, platos principales, postres y bebidas (3). En infusiones elaboradas con pétalos de rosa de diferentes cultivares, los niveles de antioxidantes resultaron similares a los de los téis (*Camellia sinensis*) negro y verde (50) y a los de otras plantas medicinales (20). Las infusiones de pétalos de rosa presentaron características sensoriales aceptables (48,50) y podrían ser consumidas solas o en combinación con otras hierbas. Además, ofrecen una ventaja nutricional con respecto a los téis convencionales debido a que no contienen cafeína ni alcaloides similares, representando estos últimos un factor que favorece el incremento transitorio de la presión sanguínea (51).

Algunos autores han reportado que los polifenoles de pétalos de rosa actúan como agentes estabilizantes de antocianinas mediante un mecanismo natural de estabilización del color en el que una antocianina y otra molécula, generalmente incolora (co-pigmento), forman un complejo coloreado estable. En este sentido, Mollov *et al.* (52) observaron que se redujo la degradación térmica de las antocianinas de una bebida de frutilla al fortificarla con copigmentos polifenólicos extraídos de destilados de pétalos de rosa. Shikovet *et al.* (53-55), corroboraron el mismo efecto en una solución modelo de antocianinas de frutilla y en la misma fruta enlatada y congelada.

Otros investigadores han evaluado el potencial de los pétalos de rosa como colorante natural. Ekrami *et al.* (56) tiñeron lana con pétalos de *Rosa damascena* y obtuvieron un color sólido, además de diferentes tonos mediante el uso de distintos mordientes. Por otro lado, Pervaiz *et al.* (57) evaluaron el extracto acuoso de los pétalos de esta misma especie en cueros de cabra curtidos al cromo, hallando también la permanencia de buenos atributos del color. El uso de pétalos de rosa como fuente de pigmentos en diferentes industrias, como la textil, cosmética, del cuero y de alimentos, contribuiría a minimizar los problemas ambientales y a disminuir los problemas dérmicos ocasionados por los colorantes sintéticos.

El creciente interés en los alimentos funcionales ha impulsado nuevas investigaciones hacia la búsqueda de compuestos bioactivos naturales de diferentes orígenes. En este contexto, las rosas constituyen una fuente interesante de este tipo de compuestos. Sin embargo, para catalogar un alimento como funcional, es necesario determinar el efecto causado por los compuestos bioactivos de dicho producto y probar el efecto real de éste en la salud. Con este fin, deben realizarse ensayos *in vitro* e *in vivo*, además de estudios de biodisponibilidad para conocer la capacidad de absorción de estos compuestos y su disponibilidad dentro del cuerpo humano.

Por otro lado, el rechazo de los consumidores hacia los alimentos que contienen aditivos sintéticos, ha cambiado el enfoque hacia el uso de agentes naturales proporcionando una oportunidad para el mercado de los ingredientes bioactivos. Los extractos de los pétalos de rosa, al contener compuestos con una fuerte actividad antimicrobiana y antioxidante, como los carotenoides, antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos, podrían utilizarse como alternativas más seguras a las de los compuestos utilizados mayoritariamente en la

actualidad con esos fines. De todas maneras, se requieren estudios adicionales para la identificación de los componentes químicos, determinar los límites de ingesta y evaluar sus efectos en la salud humana.

Además, en los últimos años se ha despertado el interés por maximizar la eficiencia de las distintas producciones agroalimentarias para reducir la cantidad de desechos. Las rosas descartadas durante el desarrollo del cultivo podrían utilizarse como alimento e incluso, para extraer sustancias de interés con el fin de sustituir aditivos sintéticos, tanto en la industria de alimentos como farmacéutica, cosmética o textil. De esta manera, se lograría una producción más eficiente del cultivo agregando valor a la economía local mediante una alternativa a la comercialización tradicional.

Referencias

1. Newman, S.E., & O'Connor, A.S. (2009) *Edible flowers*. Colorado State University Extension. 12/96, Fact Sheet no. 7. 237.
2. Mlcek, J., & Otakar, R. (2011) Fresh edible flowers of ornamental plants: A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 561-569.
3. Barash, C.W. (1998). The flavors of flowers. *HerbCompanion*, 10(4), 32-37.
4. Lara-Cortés, E., Osorio-Díaz, P., Jiménez-Aparicio, A., & Bautista-Baños, S. (2013). Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles. Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(3), 197-208.
5. Lu, B., Li, M., & Yin, R. (2016). Phytochemical Content, Health Benefits, and Toxicology of Common Edible Flowers: A Review (2000-2015). *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(Suppl 1), S130-S148.
6. Rodríguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchiel, S.W., Herrera-Ruiz, D., & Torres, E. (2008). Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicology and applied pharmacology*, 227(1), 125-135.
7. American Rose Society (2018). *Handbook for Selecting Roses*. <https://www.rose.org/single-post/2018/06/11/Rose-Classifications>.
8. Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J.A., Saraiva, J.A., & Ramalhosa, E. (2017). Edible flowers: a review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38-50.
9. Prata, G.B., Souza, K.O., Lopes, M., Oliveira, L.S., Aragão, F.A., Alves, R., & Silva, S.M. (2017). Nutritional characterization, bioactive compounds and antioxidant activity of brazilian roses (*Rosa spp*). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19, 929-941.
10. Li, A., Li, S., Li, H., Xu, D., Xu, X., & Chen, F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *Journal of Functional Foods*, 6, 319-330.
11. Loizzo, M.R., Pugliese, A., Bonesi, M., Tenuta, M.C., Menichini, F., Xiao, J., & Tundis, R. (2016). Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(12), 2467-2474.
12. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
13. Rajeshwari, C.U., Shobha, R.I., & Andallu, B. (2014) Review: phytochemicals in diet and human health with special reference to polyphenols. *Annals of Phytomedicine*, 3, 4-25.
14. De Ancos, B., Colina-Coca, C., González-Peña, D. & Sánchez-Moreno, C. (2015). Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products. In: Gupta VK, Tuohy MG, Lohani M, O'Donovan A (ed). *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. John Wiley.
15. Rao, C.V., Rivenson, A., Simi, B., & Reddy, B.S. (1995). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer research*, 55(2), 259-266.
16. Liu, R.H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78, A18-A25.
17. Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., & Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97, 137-150.
18. Maqsood, S., Benjakul, S. (2010) Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry*, 119, 123-132.

19. Ramful, D., Aumjaud, B., Neergheen, V.S., Soobrattee, M.A., Googoolye, K., Aruoma, O., & Bahorun, T. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. *Food Research International*, *44*, 1190-1196.
20. VanderJagt, T. J., Ghattas, R., VanderJagt, D. J., Crosse, M., & Glew, R. H. (2002). Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life sciences*, *70*(9), 1035-1040.
21. Choi, J.K., Lee, Y., Lee, K.H., Im, H.C., Kim, Y.B., Choi, E.K., Joo, S.S., Jang, S.K., Han, N., & Kim, C. (2015). Extraction Conditions for Phenolic Compounds with Antioxidant Activities from White Rose Petals. *Journal of Applied Biological Chemistry*, *58*, 117-124.
22. Tatke, P., Patil, P., & Gabhe, S. (2015). In vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Extracts of *Rosa damascena* Flower Petals. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, *3*, 589-601.
23. Pal, A., Bhushan, B., Narwal, R.K., & Saharan, V. (2018). Extraction and evaluation of antioxidant and free radical scavenging potential correlated with biochemical components of red rose petals. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, *42*(3), 1027-1036.
24. Friedman, H., Agami, O., Vinokur, Y., Droby, S., Cohen, L., Refaeli, G., Resnick, N., & Umiel, N. (2010). Characterization of yield, sensitivity to *Botrytis cinerea* and antioxidant content of several rose species suitable for edible flowers. *Scientia Horticulturae*, *123*, 395-401.
25. Park, D., Jeon, J.H., Kwon, S.C., Shin, S., Jang, J.Y., Jeong, H.S., Lee, D.I., Kim, Y.B., & Joo, S.S. (2009). Antioxidative activities of white rose flower extract and pharmaceutical advantages of its hexane fraction via free radical scavenging effects. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, *87*(6), 943-952.
26. Cutler, R.R. (2003). Medicinal and pharmaceutical uses. In: Roberts, A.V., Debener, T. & Gudim, S. (eds). *Encyclopedia of rose science*. (p. 716-726). Academic press.
27. Lee, J.H., Lee, H. & Choung, M. (2011). Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (*Rosa hybrida* cv. Noblered). *Food Chemistry*, *129*(2), 272-278.
28. Wan, H., Yu, C., Han, Y., Guo, X., Ahmad, S., Tang, A., Wang, J., Cheng, T., Pan, H., & Zhang, Q. (2018). Flavonols and Carotenoids in Yellow Petals of Rose Cultivar (*Rosa* 'Sun City'): A Possible Rich Source of Bioactive Compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(16), 4171-4181.
29. Aydemir, G., Kasiri, Y., Bartók, E.M., Birta, E., Fröhlich, K., Böhm, V., Mihály, J. & Rühl, R. (2016). Lycopene supplementation restores vitamin A deficiency in mice and possesses thereby partial pro-vitamin A activity transmitted via RAR signaling. *Molecular nutrition & food research*, *60*(11), 2413-2420.
30. Di Pietro, N., Di Tomo, P. & Pandolfi, A. (2016) Carotenoids in Cardiovascular Disease Prevention. *JSM Atheroscler*, *1*(1), 1002.
31. Eugster, H., Chem, D. & Fischer, M. (1991). The chemistry of rose pigments. *Angewandte Chemie*, *30*, 654-672.
32. Schulz, D.F., Schott, R.T., Voorrips, R.E., Smulders, M.J., Linde, M., & Debener, T. (2016). Genome-Wide Association Analysis of the anthocyanin and carotenoid contents of rose petals. *Frontiers in plant science*, *7*, 1798.
33. Bhattacharyya, S., Roychowdhury, A., & Ghosh, S. (2008). Lutein content, fatty acid composition and enzymatic modification of lutein from marigold (*Tagetes patula* L.) flower petals. *Journal of the Indian Chemical Society*, *85*(9), 942-944.
34. Schmitzer, V., Veberic, R., Osterc, G., & Štampar, F. (2009). Changes in the phenolic concentration during flower development of rose 'KORcrisett'. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *134*, 491-496.
35. Sood, S., & Nagar, P.K. (2003). Changes in abscisic acid and phenols during flower development in two diverse species of rose. *Acta Physiologiae Plantarum*, *25*, 411-416.
36. Shou Ping, L.U., Sui, X.X., Sun, Q., & Sun, B.Q. (2006). Biological functions of secondary metabolism of medicinal plants and influences of ecological environment. *Natural Product Research and Development*, *18*, 1027-1032.
37. Biolley, J.P., Jay, M., & Viricel, M.R. (1994). Flavonoid diversity and metabolism in 100 *Rosa x hybrida* cultivars. *Phytochemistry*, *35*, 413-419.
38. Cai, Y.Z., Xing, J., Sun, M., Zhan, Z.Q., & Corke, H. (2005). Phenolic antioxidants (hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins) identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(26), 9940-9948.
39. Dela, G., Or, E., Ovadia, R., Nissim-Levi, A., Weiss, D., & Oren-Shamir, M. (2003). Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. *Plant Science*, *164*, 333-340.

40. Kumar, N., Bhandari, P., & Singh, B. (2009). Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 361-367.
41. Zhang, J., Xiao, Y., Guan, Y., Rui, X., Zhang, Y., Dong, M., & Ma, W. (2019). An aqueous polyphenol extract from *Rosa rugosa* tea has antiaging effects on *Caenorhabditis elegans*. *Journal of food biochemistry*, *43* (4), e12796.
42. Williams, H., Stone, M.J., Houck, P.R., & Rahman, S.K. (1989). Why are secondary metabolites biosynthesized? *Journal of Natural Products*, *52* (6), 1189-1208.
43. Voon, H.C., Bhat, R., & Rusul, G. (2012). Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*, 34-55.
44. Hirulkar, N.B., & Agrawal, M. (2010). Antimicrobial activity of rose petals extract against some pathogenic bacteria. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*, *1* (5), 478- 484.
45. Zhang, W., Abdel-Rahman, H.H., & Saleh, M.A. (2011). Natural resistance of rose petals to microbial attack. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, *46*, 381–393.
46. Mankar, S.S. (2015). Screening of antibacterial activity of rose varieties against bacterial pathogens, *International Journal of Life Sciences*, *3* (1), 99-104.
47. Nowak, R., Olech, M., Pecio, L., Oleszek, W., Los, R., Malm, A., & Rzymowska, J. (2014). Cytotoxic, antioxidant, antimicrobial properties and chemical composition of rose petals. *Journal of the science of food and agriculture*, *94* (3), 560–567.
48. Gabilondo, J., Corbino G.B., Schelegueda, L.I., Campos, C.A., Carduza, F.J., Langman, L.E., Soteras, T., y Arroyo L.E. (2016). Utilización de pétalos de rosa como insumo en la industria de alimentos. *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, Córdoba, Argentina.
49. China, R., Mukherjee, S., Sen, S., Bose, S., Datta, S., Koley, H., Ghosh, S., & Dhar, P. (2012). Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological research*, *167* (8), 500–506.
50. Vinokur, Y., Rodov, V., Reznick, N., Goldman, G., Horev, B., Umiel, N., & Friedman, H. (2006). Rose petal tea as an antioxidant-rich beverage : Cultivar effects. *Journal of Food Science*, *71*, s42-s47
51. Hodgson, J.M., Puddey, I.B., Burke, V., Beilin, L.J., & Jordan, N. (1999). Effects on blood pressure of drinking green and black tea. *Journal of hypertension*, *17* (4), 457–463.
52. Mollov, P., Mihalev, K., Shikov, V., Yoncheva, N., & Karagyozov, V. (2007). Colour stability improvement of strawberry beverage by fortification with polyphenolic copigments naturally occurring in rose petals. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *8*, 318-321.
53. Shikov, V., Kammerer, D.R., Mihalev, K., Mollov, P., & Carle, R. (2008). Heat stability of strawberry anthocyanins in model solutions containing natural copigments extracted from rose (*Rosa damascena* Mill.) petals. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56* (18), 8521–8526
54. Shikov, V., Kammerer, D., Mihalev, K., Mollov, P., & Carle, R. (2012). Antioxidant capacity and colour stability of texture-improved canned strawberries as affected by the addition of rose (*Rosa damascena* Mill.) petal extracts. *Food Research International*, *46*, 552-556.
55. Shikov, V., Mihalev, K., Yoncheva, N., Karagyozov, V., & Mollov, P. (2012). Antioxidant capacity of frozen strawberries as affected by the vacuum impregnation in polyphenol-rich extract. *Journal of EcoAgriTourism*, *8*, 231-237.
56. Ekrami, E., Saberi, M., Motlagh, & Mafi, M. (2011). Wool dyeing using Rose flower petal. *World Applied Sciences Journal*, *13*, 295-299.
57. Pervaiz, P., Mughal, T.A., Najeebullah, M., & Khan, F.Z. (2016). Extraction of natural dye from *Rosa damascena* Mill. - a cost effective approach for leather industry. *International Journal of Biosciences*, *8* (6), 83-92.

Capítulo 4

Revalorización del suero de quesería. Productos lácteos funcionales

Erick Rojas¹, Sergio Rozycki², Juan Diego Cortez-Latorre²

¹Universidad Autónoma "Gabriel Rene Moreno", Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Carrera de Ingeniería de Alimentos, Santa Cruz de la Sierra. Bolivia
erickrojas@uagrm.edu.bo

²Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ingeniería Química (FIQ). Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA). Área Leche y Productos Lácteos, Santa Fe. Argentina.
sdrozycki@hotmail.com

Resumen

Técnicamente, todos los alimentos son funcionales por cumplir necesidades humanas básicas y proveer un valor nutritivo. Sin embargo, El término Alimento Funcional (AF) fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's, y se refiere a aquellos alimentos que contienen componentes que desempeñan una función específica sobre las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutricional tradicional. Este efecto promueve la disminución del riesgo a contraer enfermedades y/o al mantenimiento del bienestar y la salud.

A partir de los años 90, los alimentos funcionales han desarrollado gran interés en los sectores comercial, académico e industrial, usándose actualmente como una estrategia para prevenir enfermedades crónicas, debido a los beneficios fisiológicos que poseen. A varios de estos alimentos se les han agregado, como suplementación o fortificación, compuestos bioactivos específicos, por los beneficios que producen en la salud; sin embargo, este grupo de alimentos oportunamente sufrió un declive por falta de credibilidad, por lo que es necesario que las propiedades funcionales que se atribuyen a determinados componentes, deben ser sustentadas mediante estudios científicos. En este capítulo se analiza el desarrollo de productos funcionales para la revalorización de suero lácteo.

1. Introducción

Los alimentos funcionales han sido reconocidos como una categoría por separado en el mercado de alimentos y es una de las áreas de mayor interés en los que respecta a la innovación de alimentos (1, 2).

Los alimentos en general son una fuente de energía para los organismos vivos. Sirven tanto para satisfacer el hambre como para transportar ciertos minerales, factores de crecimiento, promotores y reguladores de varias funciones biológicas, con el fin de mejorar el bienestar físico y mental de los organismos. De acuerdo a la Functional Food Science en Europa (FuFoSe), en concordancia con el International Life Science Institute (ILSI), un producto alimenticio puede ser considerado como funcional si en conjunto con el impacto nutricional básico, tiene un efecto benéfico sobre una o más funciones del organismo humano, de manera de mejorar las condiciones físicas o generales, y/o reducir el riesgo de evolución de enfermedades (3).

El desarrollo de alimentos funcionales a partir de alimentos que poseen un valor nutricional normal, debe cumplir con alguno de los siguientes enfoques:

- Eliminar componentes que poseen algún efecto negativo en el cuerpo.
- Incrementar de la concentración de algún componente alimentario que presente alguna propiedad benéfica.
- Adicionar de algún componente que no se encuentre presente en el alimento y que aporta algún efecto positivo en el organismo.
- Reemplazar algún componente del alimento, cuyo consumo genere algún efecto negativo por alguno con propiedades deseadas.
- Incrementar la bioaccesibilidad o estabilidad de un componente alimenticio, el cual es conocido que presenta cierto efecto positivo y/o a su vez reduce el riesgo de enfermedades.

2. Productos lácteos funcionales

La industria láctea es probablemente una de las más tradicionales a nivel mundial. Sin embargo, en las últimas tres décadas, la introducción del concepto de funcionalidad ha producido cambios importantes en la demanda de alimentos por parte de los consumidores, debido a que han generado conciencia respecto a los conceptos de nutrición y salud, así como también, la búsqueda de alternativas distintas a la medicina, que sean menos costosas y más naturales, de manera de mantener la salud a través de estrategias preventivas y estilos de vida inteligentes (4).

En ese sentido la industria láctea trabaja fuertemente en el desarrollo de alimentos "saludables", gracias a los beneficios que de por sí tiene la leche, y a que los productos lácteos son vehículos adecuados para la incorporación de componentes con propiedades benéficas para la salud.

Existen estudios clínicos que han comprobado los beneficios que existen al consumir leche y sus derivados, principalmente en la mantención del peso corporal, la prevención y control de la diabetes, la salud cardiovascular, la inflamación y estrés oxidativo, entre otros. Dichos beneficios se han evidenciado en las distintas etapas del desarrollo, principalmente en la niñez y adolescencia (5).

Actualmente, existen diversos productos lácteos denominados funcionales, como ser: yogures y leches fermentadas, bebidas con agregado de probióticos y/o prebióticos y quesos untables, entre otros. Los productos lácteos son de consumo masivo, por lo cual la característica de ser funcionales eleva su potencial comercial, y eleva el valor agregado de los productos. Poseen además la ventaja de ser matrices alimenticias a las cuales se les puede incorporar con gran facilidad los componentes bioactivos, siendo las bebidas fermentadas con prebióticos y probióticos las que predominan en el mercado (6).

En general, se agregan bacterias probióticas, oligosacáridos prebióticos (GOS, FOS), fibra, ácido linoléico conjugado (CLA), ácidos grasos omega-3, fitoesteroles y fitoestanoles (4), minerales bioactivos (hierro, zinc, calcio), semillas (quinoa, chía), entre otros.

a. Microorganismos probióticos en productos lácteos

Los microorganismos probióticos (MOP) son reconocidos como bacterias buenas o amigables. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la alimentación y la agricultura de las Naciones Unidas (FAO), las definen como organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del hospedador. El uso de MOP se ha centrado principalmente en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales y se ha observado su efectividad en el tratamiento de distintos tipos de diarrea. El mecanismo de acción de los MOP puede ser: la producción de peróxido, ácidos, compuestos antimicrobianos (por ejemplo bacteriocinas), competencia por nutrientes y adición a receptores, acción antitoxinas y estimulación del sistema inmune.

Los géneros de microorganismos más estudiados son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Saccharomyces*. Asimismo, los MOP han sido estudiados por su impacto en el tratamiento contra infecciones por *Helicobacter pylori*, en tratamientos para tratar inflamación en el intestino, infección en el tracto urogenital, y también como potencial en algunos tratamientos contra el cáncer (4).

b. Sustancias prebióticas en productos lácteos

Son ingredientes alimentarios no digeribles que mejoran la salud del huésped, estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad metabólica de la flora benéfica presente en el tracto intestinal (4). Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino grueso donde son degradados por la microflora bacteriana, principalmente por las *Bifidobacterias* y *Lactobacilos*, generando de esta forma una biomasa bacteriana saludable y un pH óptimo (5). Un ingrediente alimenticio puede ser considerado prebiótico si cumple con los siguientes criterios o acciones:

- Alterar positiva y saludablemente la microflora del colon, como por ejemplo *Bifidobacterias* y *Lactobacilos*, reduciendo por competencia microbiana las especies putrefactivas y aumentando las sacarolíticas.

- Ser fermentado selectivamente por un adecuado número de bacterias colónicas potencialmente benéficas, como los *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*.
- No ser transformado (absorbido o hidrolizado) en la parte superior del tracto digestivo.

El principal sustrato de las bacterias anaeróbicas indeseables del colon son los hidratos de carbono de la alimentación, que no son digeridos en el tracto gastrointestinal alto.

Las sustancias prebióticas (inulina, fructooligosacáridos-FOS y galactooligosacáridos-GOS) producen fermentación bacteriana en el colon y con ella cantidades importantes de: hidrógeno, metano, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), dióxido de carbono, lactato e incremento de la biomasa bacteriana, confirmado por estudios in-vitro.

La elevación de la concentración de acetato y lactado disminuye el pH intraluminal, inhibiendo el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos (*E. coli*, *Clostridium*) y otros patógenos como *Listeria*, *Shigella*, y *Salmonella*, aumentando la concentración de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*.

La acumulación de elevadas cantidades de AGCC (butírico, propiónico y acético) favorece la absorción de magnesio y calcio, por el aumento de la solubilización de sus sales, activándose el mecanismo de transporte para la absorción de minerales. Las bacterias utilizan parcialmente estos AGCC en su metabolismo, y el resto es eliminado por las heces. Se han estudiado como prebióticos a la lactulosa (isómero de la lactosa, generada durante los tratamientos térmicos), FOS, GOS, xilo-oligosacáridos, trans-galacto-oligosacáridos e isomalto-oligosacáridos, algunos derivados de la soja.

Entre los principales efectos benéficos de los oligosacáridos están: ayudar al desarrollo del cerebro, prevenir infecciones, mejorar la absorción de minerales, estimular el sistema inmune y también han sido estudiados en tratamientos contra el cáncer (4, 6).

c. Fibra en productos lácteos

Los términos "fibra dietaria", "funcional" y "total" fueron definidos por la Food and Nutrition Board y La National Academy of Sciences (NAS) (2002). Se entiende como fibra dietaria "a aquellos glúcidos no digeribles y la lignina intactos presentes en las plantas". Además, la "Fibra Funcional" fue descrita como "aquellos hidratos de carbono no digeribles aislados para los cuales se han acumulado evidencias de efectos fisiológicos benéficos en la salud de los seres humanos". Por último, la fibra total se definió como "la suma de la fibra dietaria y la fibra funcional". El Codex Alimentarius, en el año 2005, definió fibra dietaria como "los polímeros de carbohidratos con un grado de polimerización mayor o igual a 3, que no son digeridos y/o absorbidos en el intestino delgado". La American Dietetic Association (ADA) recomienda un consumo para los adultos de 20-30 g/día de fibra dietaria, proponiendo que la fibra soluble sea aproximadamente de 3-10 g, procedente de diversas fuentes vegetales.

La Food and Drugs Administration (FDA) recomienda un consumo de parte de los adultos de 25 g/día de fibra, cada 2000 kcal/día. Además, el National Cancer Institute (NCI) considera como óptimo consumo para la prevención del cáncer de colon entre 20-30 g/día, sugiriendo no exceder los 35 g/día de fibra dietaria.

d. Antioxidantes y ácidos grasos omega-3 en productos lácteos

Según Santillán-Urquiza *et al.* (6), en el mercado se encuentran algunos lácteos con agregado de antioxidantes, como yogures con té, con elevada riqueza en polifenoles, habiendo asociado el consumo de estos productos a una menor incidencia de cáncer.

Existen lípidos saludables, como los omega 3, que se sostiene que producen varios beneficios para la salud, como por ejemplo la reducción de colesterol, del riesgo de enfermedades cardiovasculares, de ciertos tipos de cáncer, mejora de la respuesta inmune, reducción de los niveles de insulina en la sangre, entre otros beneficios (7). En la industria láctea suelen usarse ácidos grasos Omega-3, como ser el ácido linoléico (ALA), ácido eicosa-pentanóico (EPA) y ácido decosa-hexaenóico (DHA). El mercado de productos lácteos que contienen omega-3 ha ido aumentando durante los últimos años, siendo la leche líquida no fermentada y algunas leches saborizadas, las matrices lácteas que más usadas para fortificar con estos lípidos (6, 8).

e. Fitoesteroles y fitoestanoles en productos lácteos

Las plantas producen varios metabolitos que les sirven para mejor adaptación, autoprotección y resistencia al estrés biótico y abiótico.

El colesterol es el esteroles principal en animales, incluyendo el ser humano. Por su parte, los fitoesteroles son compuestos naturales derivados de las plantas, que poseen similitud estructural con aquel. Además, se consideran lípidos funcionales.

Los aceites vegetales, como también las nueces y el aceite de oliva, los granos enteros y las legumbres se consideran como las mejores fuentes alimenticias. Por otra parte, los fitoesteroles incorporados en varios productos lácteos (quesos y yogur), en concentraciones de aproximadamente 2 g/día, reduce los niveles de colesterol LDL en casi un 9 % (9).

f. Minerales bioactivos en productos lácteos

El zinc es uno de los de los elementos traza más importantes, por participar en más de 200 reacciones metabólicas, lo que convierte a su deficiencia en una problemática nutricional. Es vital para la síntesis de ADN y ARN, el crecimiento, el desarrollo del cerebro, la protección de la piel, la cicatrización de las heridas, el buen funcionamiento del sistema inmunológico, activación de hormonas, la digestión, la reproducción y fertilidad, formación de proteínas e insulina, el gusto, y el olfato (10).

Además, el calcio es el oligoelemento más abundante en el cuerpo humano, como también en la leche. Participa en la contracción muscular, la coagulación sanguínea y el impulso nervioso; participa en la dilatación de los vasos sanguíneos (reducción de presión arterial) y el ritmo cardíaco; junto con la vitamina D reduce la posibilidad de cáncer de: colon, mama y gástrico, participa de la pérdida de grasa y de peso, mejora la salud ósea, combate la debilidad y fatiga, impide el retraso del crecimiento, participa en la prevención de la diabetes, osteoporosis y mejora la salud bucal (esmalte de dientes y caries), considerándose un tranquilizante natural (induce el sueño) (10).

El hierro es esencial para la formación de la hemoglobina (glóbulos rojos), por lo cual la OMS ha declarado su deficiencia como una epidemia mundial, y ha propuesto la fortificación y enriquecimiento de los alimentos como una forma válida de contrarrestarla. Participa además de los mecanismos de defensa del cuerpo humano, combate la fatiga, anemia, astenia y anorexia.

Por lo expuesto, el enriquecimiento de alimentos con estos minerales bioactivos puede ser considerado como una forma de contrarrestar la deficiencia en su ingesta.

El yogur es buen candidato para la incorporación de estos minerales, no sólo por su alto consumo y aceptación masiva, sino también por su alto valor nutricional y su efecto regulador de los procesos de digestión y de absorción de los mismos. Otra característica que hace del yogur la opción lógica para la fortificación y/o enriquecimiento es su pH bajo, que aumenta su solubilización y biodisponibilidad (10).

g. Semillas bioactivas

Hoy en día se están usando semillas ricas en ácidos grasos insaturados, fitoesteroles y aminoácidos esenciales, en la fortificación de yogur, como es el caso de la Chía y Quinoa. La chía ha demostrado su efecto de saciedad y aceptabilidad sobre los consumidores. Además, su tercera parte en peso se compone de ácidos poliinsaturados (PUFA) y aproximadamente el 80 % de éstos son omega-3. También contiene adecuada cantidad de compuestos antioxidantes, mejora las propiedades digestivas y reduce el apetito (11).

La quinoa tiene una muy buena composición de aminoácidos, dentro de los cuales se encuentran los 8 aminoácidos esenciales, en buena proporción. También contiene omega-3 y es rica en magnesio (mineral que participa activamente en la vía metabólica de la glucosa).

Se han realizado pruebas de incorporación de semillas molidas en queso untable, encontrándose que dosis superiores a 3 % en peso generan sabores amargos (chía) y "a pasto" (quinoa).

3. El yogur como alimento funcional

El yogur es un alimento muy apreciado desde hace mucho tiempo, debido a que es un alimento que se lo puede apreciar de muchas formas. En particular, la innovación en el procesamiento de yogur funcional incluye la adición de probióticos, prebióticos o sus combinaciones, o la incorporación de varios compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales, utilizados para mejorar los valores nutricionales, las características sensoriales, fisioterapéuticas o como alternativas terapéuticas. Las cepas convencionales del yogur son *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus and *Streptococcus thermophilus*; estas pueden considerarse que poseen una limitada capacidad como probióticos debido a que tienen una capacidad reducida de colonizar el intestino. Sin embargo, al yogur se lo ha asociado con varios beneficios para la salud, por lo cual a los dos microorganismos starter, se los considera como probióticos (12).

Hoy en día se incorporan durante la fermentación otras sepas con propiedades benéficas importantes, las cuales es necesario que se encuentren viables durante la vida útil del producto. Hoy en día hay técnicas como la encapsulación, que permiten proteger al microorganismo. Asimismo, se han usado fitoquímicos bioactivos con la idea de mejorar el potencial saludable del yogur, sobre todo por su capacidad antioxidante, y por los beneficios que ofrecen para mejorar la salud. Es por ello que, como una alternativa para aprovechar los residuos de la industria alimentaria, se está investigando sobre la incorporación de estos compuestos en yogur, sin que estos pierdan sus propiedades funcionales (13).

Además, se ha observado hoy en día, la incorporación de fibra en el yogur, en una cantidad máxima aceptable de hasta el 3 %, con potencial benéfico. Entre los principales beneficios se encuentran: previene o disminuye la hipertensión, enfermedades coronarias, reducción de los niveles de lípidos y glucosa en la sangre, mejora la absorción del calcio y promueve la salud de la flora intestinal. Entre las principales fibras solubles que se han agregado a los lácteos para mejorar las características funcionales están la povidona, inulina, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, pectina, beta-glucano, goma guar, goma xantán, carragenina, entre otros (4).

4. Desarrollo de yogures funcionales

Se desarrollaron leches fermentadas probióticas con colesterol reducido (~ 90 % de reducción), fortificadas con calcio y caseína, formulando el producto con leche fluida, leche en polvo descremada (LPD), concentrado de proteínas de suero (WPC 35, con 35 % de proteínas en base seca) y mezcla de hidrocoloides normalmente utilizados en este tipo de productos, como ser: gelatina (G - 220 grados Bloom, 0,2-0,4 %) y almidón modificado (AM, 0,8-1,2 %), junto a un hidrocoloide novedoso como la goma espina corona (GEC, 0,4-0,6 %), galactomanano de composición similar a la Goma Guar, cuya planta que produce los frutos con las semillas crece como plaga en Argentina. Además, se agregó azúcar grado A (8-10 %), sorbato de potasio (conservante, 200-300 ppm), citrato de calcio (sal fortificante de calcio, según diseño experimental) y saborizante vainilla (1 ml/Kg).

Para extraer el colesterol en condiciones tecnológicas optimizada se utilizó, como agente acomplejante-extractor, β -ciclodextrina (99 % de pureza, en concentraciones entre 1 y 3 %), siguiente el esquema de la Figura 1.

Se utilizó un cultivo iniciador/acidificante de yogur YC-180 (Chr-Hansen), compuesto por las cepas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Adicionalmente, se empleó la cepa probiótica comercial *L. rhamnosus* SP1 (Sacco SRL, Italia). La concentración agregada de hidrocoloides y fermento se determinó con experiencias preliminares, de modo de lograr una consistencia correspondiente a un yogur cremoso/batido, y la dosis del *L. rhamnosus* fue propuesta por el fabricante.

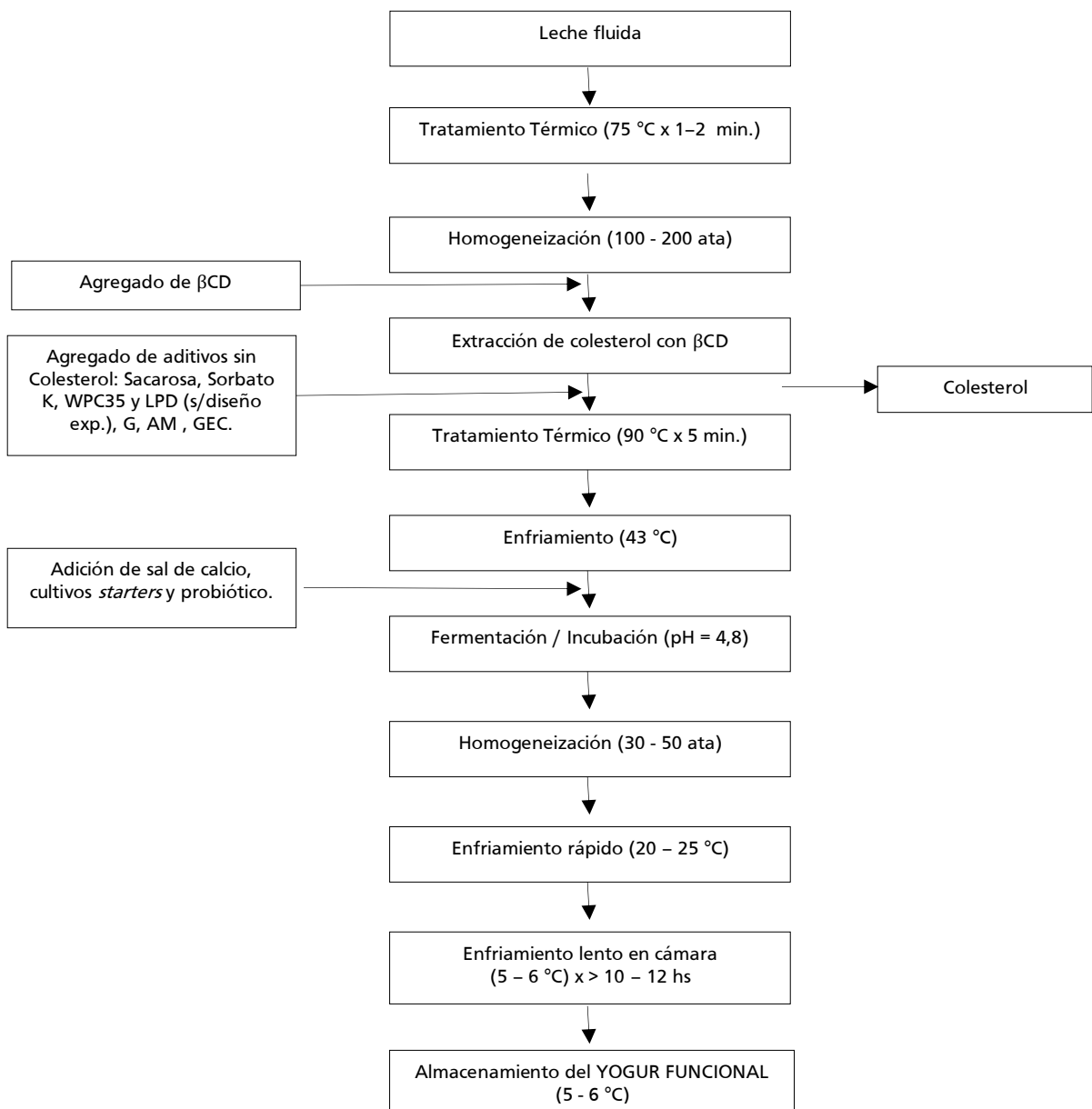


Figura 1. Esquema de elaboración del YOGUR FUNCIONAL (Probiótico, Fortificado y con Colesterol Reducido)

Se utilizó un diseño experimental factorial, de 2 variables en 3 niveles (3^2), con dos repeticiones del centro del diseño ($3^2 + 2 = 11$ experiencias en total), por duplicado, según tabla 1. Las variables fueron las concentraciones de calcio y caseína, en el producto final.

Tabla 1: Valores (%) de las variables tecnológicas investigadas, codificados y no codificados

Variables	Denominación		Niveles de factor ^a		
	Codificada	No codificada	-1	0	1
Calcio	X ₁	CAL	0,01	0,05	0,09
Caseína	X ₂	CAS	0,08	0,40	0,72

X₁: Concentración de calcio (CAL), adicionado como citrato de calcio. X₂: Concentración de caseína (CAS), obtenida variando la relación de los agregados de LPD / WPC 35, manteniendo constante el total agregado de ambos (3 %) respecto a leche fluida, según: relación 1:10 (0,28 % LPD / 2,72 % WPC35); 1:1 (1,5 % de cada uno); 10:1 (2,72 % LPD / 0,28 % WPC35).

Las concentraciones de calcio utilizadas se eligieron tomando como referencia lo planteado por Gurmeet y Kasiviswanathan (14), en la cual el yogur fue fortificado con diferentes concentraciones de calcio (250, 500, 750 y 1000 mg Ca / L), y se observó que las concentraciones óptimas de fortificación debían ser menores a 500 mg /L, ya que por encima de dicho valor se encontraron defectos sensoriales. Este valor se adoptó como la experiencia central del estudio (nivel 0, codificado).

Se logró elaborar leches fermentadas probióticas con un contenido de colesterol remanente menor a 5 mg %, logrando aproximadamente un 90 % de extracción promedio del mismo, manteniendo la grasa láctea y el aporte de sus propiedades (textura/cremosidad, sapidez, vitamina D y CLA).

Respecto al estudio de la cinética de acidificación durante la fermentación la velocidad de fermentación se vio disminuida con una mayor concentración de CAL y menor contenido de WPC (mayor CAS), posiblemente debido a la capacidad buffer del calcio y a que el WPC tiene efecto promotor de acidificación, por una posible liberación de péptidos de cadena corta, debido al elevado tratamiento térmico inicial, más fácilmente asimilables (y digeribles) por los microorganismos del fermento.

El aumento del contenido de CAL y de WPC 35 favoreció la formación de un coágulo muy estable, con mínima sinéresis (retención de agua > 99 %, durante toda la vida útil), evidenciándose una interacción sinérgica.

El análisis reológico demostró la dependencia de los parámetros (Índice de consistencia - K, Índice de comportamiento - n, viscosidad de Kokini, resistencia máxima inicial - A y velocidad de ruptura estructural del coágulo - B) con las variables tecnológicas investigadas (CAL y CAS), todos menos *n* relacionados en forma directa, o sea, al aumentar CAL y CAS aumentan dichos parámetros, mientras que *n* disminuye, alejándose del comportamiento newtoniano ($n = 1$), ejerciendo un mayor efecto el CAL.

Conviene recordar que un Fluido Newtoniano es aquel que presenta una viscosidad constante, solo dependiente de la temperatura (y no del tratamiento mecánico o gradiente de deformación - GD, ni del tiempo de tratamiento). La viscosidad de Kokini es aquella medida a un GD de 50 s^{-1} , que ocurre en una masticación normal.

El CAL demostró ejercer una mayor influencia sobre la consistencia sensorial y conjuntamente con el aumento de LPD aumentaron la cremosidad de las leches fermentadas obtenidas. La aspereza, astringencia y los sabores a "suero" y "leche en polvo" alcanzaron puntajes muy bajos en todas las evaluaciones. En cambio, el gusto ácido y dulce se encontró, por lo general, en forma moderadamente perceptible y más del 80 % de los panelistas los detectaron. Generalmente, las características sensoriales se conservan durante la vida de anaquel, lo que permite asegurar la calidad y estabilidad sensorial de las leches fermentadas durante este período.

5. Revalorización del suero de quesería

a. Producción de WPC (Whey Protein Concentrated)

El WPC es un concentrado de proteínas de suero con diferentes purezas o porcentajes de dichas proteínas en base seca (WPC 35, 50, 60, 80, entre otros). Esto se obtiene a través de una primera etapa de ultrafiltración (UF) y, eventual y posteriormente, diafiltración (para WPC 50 en adelante).

La utilización de WPC 35 (proteínas de suero en polvo, con concentración proteica de 35 % en base seca) supone una revalorización de este efluente, de difícil y costoso tratamiento, y un aporte nutricional extra al Yogur (o cualquier otro producto lácteo), ya que dichas proteínas poseen un valor biológico (VB ~ 125) aproximadamente un 50 % mayor que las propias caseínas de la leche (VB ~ 88), y 25 % mayor que las proteínas del huevo (VB = 100 , referencia).

La elaboración industrial de este WPC 35, como materia prima, supone en primer lugar una ultrafiltración hasta un factor de concentración entre 2,5 y 3 (% de ST entre 15 y 20 %), lo cual permite una concentración de las proteínas de suero en base seca, una posterior concentración de todos los componentes sólidos (solubles y no solubles) hasta un 50 – 55 % ST, en un sistema de evaporadores "falling – film" o película descendente, de múltiple efecto (generalmente entre 3 y 4 efectos o cuerpos), y un posterior secado spray hasta la obtención del producto en polvo.

Cuando se quiere obtener WPC en polvo de mayor concentración o pureza en base seca de proteínas de suero (WPC 50, 60, 80, entre otros) se debe llegar a un factor de concentración mayor (mínimamente 4 a 5) y diafiltrar agregando agua desmineralizada, que produce una reducción (“lavado”) de lactosa y sales.

Las industrias pequeñas (PYMES) generalmente no poseen equipos de ultrafiltración y secado spray, por lo cual necesitan enfriar el suero líquido y mantenerlo refrigerado, hasta la venta a industrias de mayor envergadura, que puedan procesarlo.

Previo al secado spray, luego de la ultrafiltración, la lactosa se encuentra en forma amorfa, muy higroscópica, por lo cual el secado spray se dificulta debido a que la válvula rotativa de la parte inferior del equipo se atasca (por la elevada pegajosidad del suero concentrado y secado), dejando de girar y no permitiendo que el producto seco sea retirado del secadero.

Para evitar esto, el suero ultrafiltrado debe concentrarse (50-55 % ST) antes de ingresar al secadero, y posteriormente debe dársele un perfil determinado de enfriamiento (en 2 etapas), relativamente lento, para favorecer que la lactosa amorfa pase mayoritariamente a lactosa cristalina, mucho menos higroscópica que aquella, lo cual minimiza o elimina el riesgo de atascamiento de la válvula rotativa mencionado.

Este perfil lleva en total aproximadamente 2 hs debiéndose llegar en una primera etapa hasta una temperatura intermedia (~30 °C) desde la de salida del último efecto del sistema de evaporadores múltiple efecto (aproximadamente 37–40 °C), para posteriormente disminuirla en la segunda etapa de enfriamiento hasta aproximadamente 20 °C. La operación se da por finalizada cuando los cristales de lactosa se observan a simple vista y al tacto, en gran número.

b. Producción y usos de proteínas de suero recuperadas por coagulación térmica

Las PYMES queseras, el único proceso de recuperación de las proteínas séricas lo realizan por desnaturalización térmica obteniendo un precipitado proteico (WPC) con un 70 % de humedad. Este subproducto lo utilizan como aditivo frecuentemente en diferentes productos, principalmente en empanadas de trigo nominándolas “Empanada de ricota” y dándole mayor valor agregado al producto.

Para darle mayor utilidad a este subproducto se realizó una investigación denominada “Estudio de las propiedades sensoriales, fisicoquímicas y reológicas del yogur aflanado enriquecido con concentrado de proteínas del suero lácteo (WPC)”. Ortega y Rojas (15), tuvieron como objetivo generar un alimento altamente nutritivo conjuntamente con el aprovechamiento de un subproducto lácteo como el suero líquido. Para esto desarrollaron yogur aflanado (firme o set), fortificado con concentrado de proteínas de suero de leche (WPC, 70 % de humedad, finamente triturado), formulando el producto con leche fluida y este concentrado de proteínas de suero. Además, se agregó azúcar grado A (8-10 %), sorbato de potasio (conservante, 200-300 ppm), siguiendo el esquema de la Figura 2.

Se utilizó un cultivo iniciador/acidificante de yogur YF-L812 (Chr-Hansen), compuesto por las cepas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Adicionalmente, la concentración agregada de WPC como fortificante se realizó a modo de lograr una leche fluida con similitud a la leche materna tomando como base la relación de caseína / proteínas de suero de leche de 20/80, de modo de lograr una consistencia correspondiente a un yogur aflanado y nutricionalmente altamente efectivo.

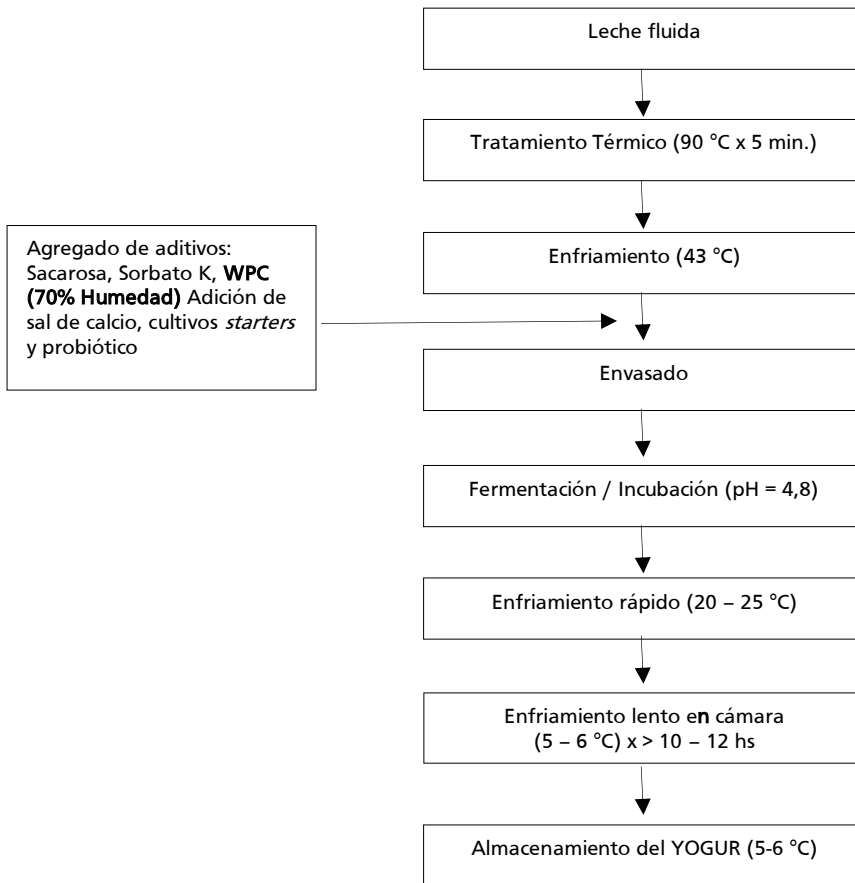


Figura 2. Esquema de elaboración del yogur aflanado fortificado

En los resultados obtenidos del análisis sensorial se evidenció que hubo diferencias estadísticamente significativas (DES) entre todas las unidades experimentales. Los tratamientos que obtuvieron mayor aceptabilidad según Tukey ($P < 0,05$) fueron las combinaciones con agregado de 5, 10 y 15 % WPC, inoculados con el cultivo YF-L812 y una fermentación de 40 °C por 6 horas, resaltando preferentemente en el análisis el parámetro aspereza y el sabor a "suero". Todos los productos obtuvieron puntajes muy buenos en todas las evaluaciones, siendo el de mayor aceptación por los panelistas el fortificado con 10 % de WPC.

Las propiedades fisicoquímicas de los productos de mayor aceptabilidad presentaron DES respecto a la acidez, pH y sinéresis, disminuyendo ésta cuanto mayor es el agregado de WPC (Figura 3).

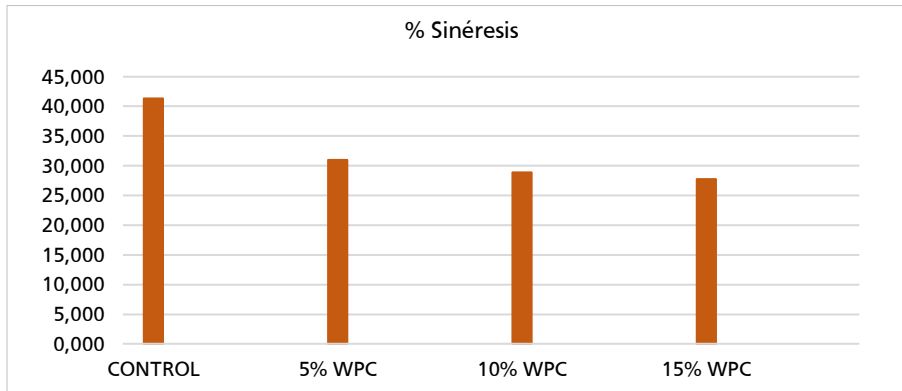


Figura 3. Porcentaje de sinéresis en función del porcentaje de WPC agregado al yogur aflanado

El análisis reológico mostró la dependencia de los parámetros (Índice de consistencia - K, Índice de comportamiento - n , viscosidad de Kokini, resistencia máxima inicial - A y velocidad de ruptura estructural del coágulo - B) con las variables tecnológicas investigadas, principalmente con el agregado de las proteínas de suero recuperadas. Casi todos estos parámetros, menos n , se relacionaron en forma directa con esta variable (WPC), o sea, al aumentar el agregado de WPC aumentaron dichos parámetros, mientras que n disminuye, alejándose del comportamiento newtoniano ($n = 1$).

Las muestras con mayor aceptación tuvieron un comportamiento reológico No newtoniano de tipo tixotrópico (Figura 4).

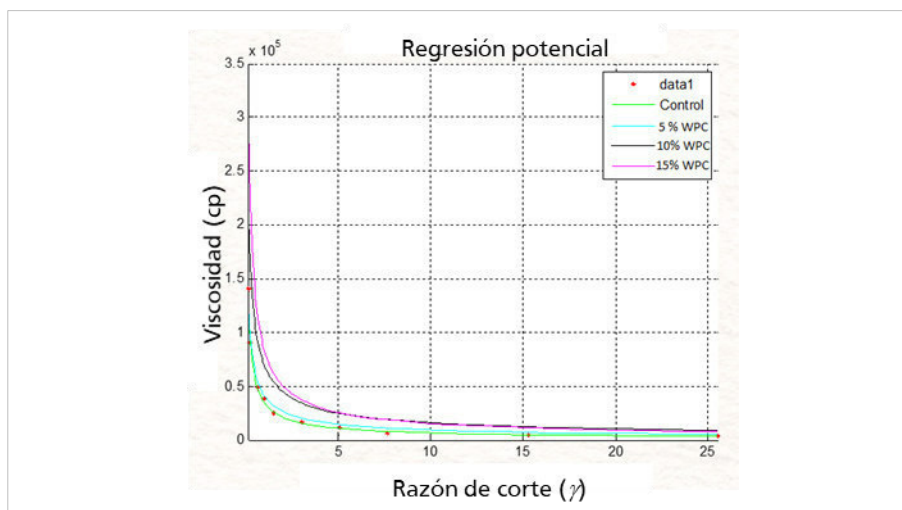


Figura 4. Viscosidad en función de la velocidad de corte, del yogurt aflanado fortificado con WPC

Se concluye que el Concentrado proteico de suero de la leche (WPC), con 70 % de humedad obtenido por desnaturalización térmica y triturado, puede utilizarse como ingrediente para favorecer la formación de la estructura del yogur, como gelificante.

Además, se logró una estructura alimenticia con propiedades fisicoquímicas y reológicas estables, como el yogur aflanado fortificado con WPC al 10 %, que contiene 6,5 % de proteína y aporta un 27 % de los requerimientos diario de los niños (24 g/día) por cada 100 g (acuerdo http://www.foodlabel.org.uk/gda/gda_values.aspx ver Anexo 1), y con proteínas que pueden contribuir activamente al buen estado de salud (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas y proteínas bioactivas).

Referencias

1. Nelson, D. (2017). *Functional Foods: Sources, Health effects and future perspectives*. New York. Nova Publishers.
2. Fuentes-Berrio, L., Acevedo-Correa, D., y Gelvez-Ordoñez, V.M. (2015). Alimentos Funcionales: Impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13 (2), 140-149, DOI:10.18684/BSAA.
3. Denkova, R., Kostov, G., y Denkova, Z. (2017). Functional bread: Development of sourdough starters to improve bread quality. In: Nelson, D. *Functional Foods: Sources, Health effects and future perspectives* (pp. 43-93). New York. Nova Publishers.
4. Ortiz, Y., García-Amézquita, E., Acosta, C., & Sepúlveda, D. (2017). Functional Dairy Products. In: Barbosa-Cánovas, G., Pastore, G., Kandogan, G., Meza, I., Silva, S., Buckle, K. y Yada, R. y Rosenthal, A (Ed.). *Global Food Security and Wellness* (p. 67-104). New York. Springer Nature.
5. Visioli, F., & Strata, A. (2014). Milk, Dairy products, and their functional effects in humans: A narrative review of recent evidence. *American Society for Nutrition. Advances in Nutrition*, 5, 131–143. doi:10.3945/an.113.005025.
6. Santillán-Urquiza, E., Méndez-Rojas, M.A., y Vélez- Ruiz, J.F. (2014). Productos lácteos funcionales, fortificados y sus beneficios en la salud humana. *Temas seleccionados de ingeniería en alimentos*, 8(1), 5-14.
7. Jin, L., Sim, J.S., Song, K.Y., Kim, D.H., Chon, J.W., Kim, H., & Seo, K.H. (2018). Use of Lipid Extracts from Various Oil Grains to Supply Dietary Omega-3 Fatty Acids for Dairy Foods-A Preliminary Study. *Journal of Milk Science and Biotechnology*, 36(1), 32-38.
8. Fernández-Avila, C., Gutiérrez-Merida, C., & Trujillo, A.J. (2017). Physicochemical and sensory characteristics of a UHT milk-based product enriched with conjugated linoleic acid emulsified by Ultra-High Pressure Homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 275-283.
9. Inchingolo, R., Cardenia, V., & Rodriguez-Estrada, M.T. (2014). Analysis of phytosterols and phytosteranols in enriched dairy products by Fast gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 37 (20), 2911–2919. doi:10.1002/jssc.201400322
10. Achanta, K., Aryana, K., & Boeneke, Ch. (2007). Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. *LWT*, 40, 424-429.
11. Ayaz, A., Akyol, A., Inan-Eroglu, E., Kabasakal Cetin, A., Samur, G., & Akbiyik, F. (2017). Chiaseed (*Salvia hispanica* L.) added yogurt reduces short-term food intake and increases satiety: randomised controlled trial. *Nutrition research and practice*, 11 (5), 412-418.
12. Kok, C.R., & Hutkins, R. (2018). Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutrition reviews*, 76 (Supplement, 1), 4-15.
13. Fazilah, N., Ariff, A., Khayat, M., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2018). Influence of probiotics, prebiotics, symbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *Journal of Functional Foods*, 48, 387–399.
14. Gurmeet, S., & Kasiviswanathan, M. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT. Food Science and Technology*, 41, 1145-1152.
15. Ortega M., y Rojas E. (2016). *Estudio de las propiedades sensoriales, fisicoquímicas y reológicas de yogurt afianado enriquecido con concentrado de proteínas del suero lácteo*. Tesis de grado. Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno. Santa Cruz- Bolivia.

Anexo 1

Valores típicos	Información nutricional			Cantidad diaria orientativa		
	Por cada 100g	Por porción (aprox. 5,7 g)	% Residencia en GDA para un adulto	Mujer	Hombre	Niño/a (5-10 años)
calorías	360 kcal	20 kcal	1 %	2000 kcal	2500 kcal	1800 kcal
proteína	12,4 g	0,7 g	2 %	45 g	55 g	24 g
carbohidrato	68,7g	3,9 g	2 %	230 g	300 g	220 g
azúcares	5,0 g	0,3 g	<1 %	90 g	120 g	85 g
grasa	3,9 g	0,2 g	<1 %	70 g	95 g	70 g
saturados	0,5 g	rastros	<1 %	20 g	30 g	20 g
fibra	9,8 g	0,6 g	3 %	24 g	24 g	15 g
sal	0,8 g	0,05 g	1 %	6 g	6 g	4 g

Se podrá ver tablas similares a esta por encima de la parte posterior de la etiqueta del envase de muchos productos alimenticios y bebidas. En el frente se encontrará a menudo la etiqueta de GDA.

Capítulo 5

Desarrollo de biopolímeros innovadores a partir de residuos naturales Aplicaciones nanotecnológicas

Diana María Granda-Restrepo¹, Oscar Alfonso Vega-Castro^{1,2}
María Ximena Quintanilla-Carvajal³, Leidy Ricaurte³

¹Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación BIOALI –Medellín. Colombia.

²Corporación Universitaria Americana, Facultad de Ingeniería. Medellín. Colombia.

³Universidad de La Sabana. Doctorado en Biociencias, Chía. Colombia.

Resumen

Actualmente una de las mayores preocupaciones que se tienen en el mundo, es la del manejo y disposición de los residuos generados en los diferentes eslabones económicos de la industria, dentro de los que se encuentran los asociados a la industria alimenticia y son una preocupación debido a que son una fuente de contaminación de recursos hídricos, suelos, aire entre otros; siendo importante buscar aplicaciones y tecnologías que potencien el uso de los residuos agroindustriales, para generar valor agregado en la industria y disminuir el impacto ambiental que estos producen. Dado lo anterior, el objetivo del presente trabajo es describir algunas aplicaciones que se pueden desarrollar a partir de residuos naturales, a través de la obtención de biopolímeros potenciando sus propiedades por medio del uso de herramientas nanotecnológicas. Como resultado se puede evidenciar que los nanomateriales tienen diferentes clasificaciones, siendo una de las aplicaciones el desarrollo de nanofibras por medio de la técnica del electrospinning; además del desarrollo de envases biopoliméricos. Por otro lado, se señalan los aspectos de seguridad que se deben tener en cuenta con la interacción entre los alimentos, los sistemas poliméricos y las nanopartículas. Se concluye, que es posible obtener productos de valor agregado a partir de los residuos naturales generados por la industria agrícola, integrando los conceptos de seguridad, nanotecnología y electrospinning para la generación de sistemas biopoliméricos con aplicación en la industria de alimentos, farmacia y biomedicina.

1. Introducción

En los últimos años ha sido creciente el número de estudios científicos que aplican la nanociencia o nanotecnología en diferentes campos, este aumento se debe principalmente a su interdisciplinariedad y al mayor acceso que se tiene hoy en día a herramientas que permiten acceder a la nanoescala. Cuando se hace referencia a la nanotecnología, se consideran procesos de caracterización y manipulación de materiales con un tamaño entre 1 a 100 nm de longitud, dimensiones en las cuales se ha identificado que los materiales exhiben propiedades físicas y químicas que son significativamente diferentes comparados con los mismos materiales a una escala mayor (1).

Los nanomateriales pueden ser clasificados en cuatro tipos: 1) partículas; 2) plaquetas; 3) tubos y 4) fibras (2), (3). Debido a las dimensiones nanométricas, estos materiales poseen una relación superficie-volumen muy grande y cuando se agregan a polímeros compatibles, los nanomateriales pueden mejorar propiedades como la resistencia mecánica y estabilidad térmica en los materiales resultantes (2). Las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los compuestos en escala nano, están permitiendo aplicaciones en la industria de alimentos y de materiales, ha sido utilizada para diseñar sistemas de encapsulación y liberación de compuestos bioactivos, para la modificación de la reología y de las propiedades ópticas de los productos y se han empleado para el desarrollo de envases, entre otras aplicaciones (4).

Se ha estimado que los avances en la nanotecnología impactarán la economía global en al menos 3 billones de dólares para el 2020, y en la industria se tendrá una demanda de 6 millones de empleos (1). Específicamente en la industria del envasado de alimentos la aplicación de la nanotecnología muestra una tendencia hacia el alza con una tasa de crecimiento del 12 % anual, permitiendo impulsar el desarrollo de sistemas de envases que cubren las necesidades cada vez más exigentes de los consumidores (2). En general el área del envasado de alimentos sigue evolucionando en respuesta al

avance de la ciencia y tecnología de los materiales, así como a la demanda cambiante de los consumidores, lo cual ha permitido que se convierta en la tercera industria más importante del mundo, representando alrededor del 2 % del producto interno nacional en países desarrollados (2) y la nanotecnología ha permitido seguir avanzado en el desarrollo de materiales con propiedades mejoradas para favorecer las funciones de los envases.

Biopolímeros obtenidos a partir de proteínas y polisacáridos están llamando la atención de los investigadores por las grandes ventajas que representan frente a materiales sintéticos. Las características de biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja inmunogenicidad (5), unido a que pueden ser obtenidos a partir de residuos o material orgánico ampliamente disponible en la naturaleza, los convierten en excelentes alternativas para gran variedad de aplicaciones. La naturaleza provee ejemplos fascinantes de organización a nanoescala que sirven de inspiración para el desarrollo de otros materiales, la pared celular de las plantas es una red tridimensional de compuestos como celulosa, hemicelulosa y lignina, donde la nanoescala juega un rol crucial en las funciones de cada uno de los componentes. Por ejemplo, las propiedades mecánicas de la madera están íntimamente relacionadas con la orientación de las microfibrillas de celulosa a escala nanométrica (6).

Las superficies de los biopolímeros nanoestructurados son funcionales por sí mismas y un mayor control en el tamaño de su superficie, permite potenciar mucho más esa funcionalidad. Considerando que los biopolímeros son moléculas biológicas, con el apoyo de la nanotecnología se pueden potenciar características como el reconocimiento específico, sensibilidad a estímulos o susceptibilidad a las enzimas, e incluso, generar procesos de degradación programados (6).

En el presente capítulo se ilustra el impacto de la nanociencia y la nanotecnología en el desarrollo de biopolímeros a partir de residuos naturales y se presentan algunos ejemplos de la aplicación de éstos en áreas como el envasado de alimentos, la encapsulación de aditivos entre otras.

2. Producción de nanofibras por electrospinning

2.1. Definiciones preliminares

El electrospinning, es un método económico y sencillo para la producción de micro y nanofibras, las cuales pueden tener diferentes composiciones (7). El Electrospinning, se puede definir como una técnica para elaborar hilos o fibras, es una técnica que utiliza fuerzas electrostáticas para producir fibras finas a partir de soluciones de polímeros y las fibras producidas tienen un diámetro más fino (de nanómetro a micrómetro) y un área de superficie mayor que las obtenidas de los procesos de hilatura convencionales (8); así mismo el electrospinning se puede considerar como una tecnología emergente que se puede utilizar para producir micro y nanofibras con una amplia gama de aplicaciones en biomedicina como son: la administración de medicamentos, apósitos para heridas, injertos vasculares y matrices de ingeniería de tejidos. Las matrices obtenidas por electrospinning se pueden obtener de diferentes tipos de materiales tales como: polímeros sintéticos y naturales, cerámica y compuestos de polímero / cerámica (9).

Los inicios del electrospinning datan de 1897 y 1914, siendo patentada en 1934 por Cooley, Morton y Formhals por un trabajo en la producción de hilos textiles a partir de acetato de celulosa (10). La técnica de electrospinning implica un proceso de tipo electro-hidrodinámico, durante el cual se aplica una corriente eléctrica a una gota de líquido (polímero en solución) para generar un chorro, seguido de estiramiento y alargamiento para generar las fibras (11); la técnica se basa en que la fuerza eléctrica aplicada debe superar la fuerza de tensión superficial de la solución de polímero, de esta forma a un voltaje determinado (umbral), finos chorros de solución son expulsados desde un capilar hasta un plato colector (10). Durante el proceso de electrospinning, el líquido se extruye de la aguja para producir una gota colgante como resultado de la tensión superficial, una vez pasada la corriente eléctrica, la repulsión electrostática entre las cargas superficiales que presentan el mismo signo deforma la gota en un cono Taylor, desde el cual se expulsa un chorro cargado y forma las fibras (11). Los campos eléctricos aplicados, oscilan entre los 10 a 35 Kv (12), en general antes de iniciar el proceso la solución polimérica se carga en una jeringa esta se debe conectar a una aguja y aun sistema de bombeo, el cual debe tener una velocidad de flujo constante, y en función del tipo de polímero la distancia entre la aguja el plato colector

puede variar entre 5 a 30 cm, finalmente se pueden obtener fibras entre 50nm y 10 micras, las fibras obtenidas, pueden tener propiedades texturales de color y densidad (7).

2.2. Componentes de un sistema electrospinning

Los componentes principales de un sistema de electrospinning incluyen: una fuente de alimentación de alto voltaje, una bomba con una jeringa, una aguja (generalmente, una aguja hipodérmica con punta roma) y un colector conductor. La fuente de alimentación puede ser corriente continua (CC) o corriente alterna (CA) (11, 13) (ver Figura 1a y Figura 1b). Aunque la configuración de un equipo de electrospinning es sencilla, existen diversos factores que afectan la fabricación de las fibras, algunos se dan en términos de las propiedades de la solución, variables controladas y de los parámetros ambientales. Las propiedades de la solución incluyen la viscosidad, conductividad, tensión superficial, peso molecular del polímero, momento dipolar y constante dieléctrica; en tanto que dentro de las variables controladas se pueden incluir el caudal de alimentación, la intensidad del campo eléctrico, la distancia entre la punta y el colector, el diseño de la punta de la aguja y la geometría del colector, finalmente dentro de los parámetros ambientales se encuentran la temperatura, humedad y velocidad del aire (14, 15).

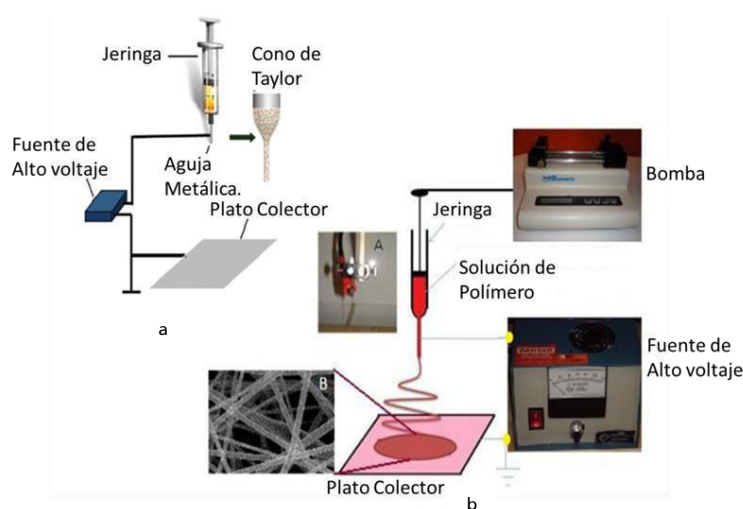


Figura 1. Esquemas básicos de un sistema electrospinning (a) (14); Equipos físicos y nano-fibras formadas (b) (13)

Para el caso de la concentración del polímero, esta influye sobre el tamaño y morfología de las fibras obtenidas, en general la concentración del polímero afecta tanto la viscosidad como la tensión superficial de la disolución. En ese sentido, la viscosidad de una solución de polímero está relacionada con el diámetro final de las fibras obtenidas, en general a mayor viscosidad mayor diámetro de las fibras, aunque a muy altas viscosidades es probable que las fibras no se alcancen a formar, ya que la solución no podría pasar por el capilar de la aguja; sin embargo, si el polímero está muy diluido lo más probable es que las fibras del polímero se rompan en gotas antes de llegar al plato colector debido al efecto de la tensión superficial (10).

Otros parámetros de importancia son el voltaje, ya que a bajos voltajes puede implicar que las gotas queden suspendidas en la aguja, por otro lado, altos voltajes pueden resultar en fibras con mayores diámetros (16), aunque otros autores reportan que a mayor voltaje decrece el diámetro de las fibras obtenidas (17), además estas fibras pueden estar compuestas por unos grumos denominados *beads*, lo cual no es deseable en las fibras (10).

Finalmente, la distancia entre la punta de la aguja y el plato colector, pueden afectar la morfología de las fibras. A mayor distancia, las fibras en formación podrían romperse debido al peso de ellas; por otro lado, a distancias menores, existe una probabilidad que el disolvente se evapore antes de alcanzar el plato colector; para ambos casos se reportan formación de fibras aplanadas en forma de cinta o con

beads (18). Por último, otros factores a tener en cuenta son: el flujo y la conductividad de la solución, el tipo del solvente, la humedad y temperatura ambiente, tipo de polímero entre otros (19).

Dado lo anterior, no es posible hacer una recomendación general en cuanto a viscosidades, concentraciones óptimas etc., ya que los valores ideales de estos parámetros varían considerablemente con el sistema de disolvente de polímero (14). Diversos autores han usado el electrospinning para obtener micro y nano fibras con diferentes tipos de biopolímeros (Tabla 1).

Tabla 1. Reportes de obtención de nanofibras con diferentes solventes y PHAs

Biopolímero	Solvente	Referencia
P(3HB-11.4 % 4HB-3.5 % 3HV) *	CHCl ₃	(20)
CF-PHA*	DMF */ CHCl ₃	(21)
PHAs*	CHCl ₃	(22)
poly(3-hidroxi butirato)/nHA *	CHCl ₃ /DMF	(23)
Proteína de trigo	HFIP *	(24)
Proteína de suero	Solución de ácido	(25)
Proteína de soya	HFIP	(26)

*HB: HidroxiButirato; HV:HidroxiValerato; CF: Fibras de Carbono PHA: Polihidroxialcanoato. PHAs: Polihidroxialcanoatos; nHA: nanopartículas de hidroapatita. HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. DMF: Dimetilformida.

2.3 Aplicaciones

Según, Laurencin, Kumbar, Nukavarapu & Hogan (27), el electrospinning se ha usado para la fabricación de nanomateriales con diversas formas, tales como: tubos, alambres, esferas, las cuales se han usado para armar diferentes tipos de microestructuras como membranas (28), dispositivos biomédicos, cuidado del medio ambiente, diseño de vestuarios, entre otros. Específicamente, en el área biomédica han usado para la estructuración de tejidos, órganos, aplicaciones en odontología, reparaciones de huesos, pero además se han usado estos sistemas para la liberación de fármacos (29), entre otras aplicaciones.

Otras aplicaciones que tienen las nanofibras están, la ingeniería de tejidos (30), biomateriales(31), liberación controlada de fármacos (32), procesos de filtración (33), textiles inteligentes (34), en biomedicina tales como reemplazo de huesos, implantes vasculares, mejoramiento de vasos sanguíneos, prótesis médicas, entre otros. (35-37), entre otras aplicaciones de las nanofibras en diferentes campos de la industria (13). En la tabla 2, se pueden ver algunas de las aplicaciones más importantes:

Tabla 2. Descripción de diferentes aplicaciones de las nanofibras

Aplicación	Polímero	Solvente	Diámetro fibra	Ref.
Liberación de Medicamentos	Poli (D-Láctico-co- ácido glicólico)	DMF	260–250 nm	(38)
	Poli (L-lactida-co-glicolida) and PEG-PLLA	Cloroformo	690–1350 nm	(39)
	Poli (ε-caprolactona)	2,2,2-Trifluoroetanol	200–350 nm	(40)
	Poli (ε-caprolactona-co-etil etileno fosfato)	DCM *	4 μm	(41)
Ingeniería de Tejidos	Poli (ε-caprolactona)	Cloroformoy metanol	2–10 nm	(42)
	Poli (etilenglicol-co-lactida)	DMF y acetona	1–4 mm	(43)
	Colágeno	HFIP *	180–250 nm	(44)
	Gelatina	2,2,2-Trifluoroetanol	0.29–9.10 mm	(45)
Sistemas Vasculares	Policarbonato de propileno	Cloroformo	5 μm	(46)
	Poli (ε-caprolactona)	Cloroformo y DMF	0.2–1 nm	(47)
	Quitina	HFIP *	0.16–8.77 nm	(48)

*HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol.; DCM: Diclorometanol.

3. Aplicaciones de la nanotecnología en el desarrollo de envases biopoliméricos

El uso de biomasa disponible en la naturaleza o generada como residuo por diferentes industrias, se convierte en materia prima óptima para la elaboración de envases activos biopoliméricos, los cuales presentan propiedades mecánicas y de barrera ajustables a las necesidades de protección de los alimentos. Los avances alcanzados en la nanotecnología y en desarrollo de materiales nanoestructurados han permitido generar matrices poliméricas naturales incluso con la incorporación de compuestos "activos" orgánicos y/o inorgánicos con al menos una dimensión en la escala nanométrica, proporcionando ventajas de biocompatibilidad, biodegradabilidad y liberación de compuestos activos en el envasado de alimentos, mejorando además las propiedades mecánicas, propiedades de barrera al vapor de agua y estabilidad térmica de los materiales de envase.

Cómo ejemplos particulares es importante mencionar el uso de los cereales, los cuales hacen parte de la biomasa disponible en la naturaleza, son un componente de nuestra dieta y aquellos que no son consumidos se convierten en materia prima para el desarrollo de biopolímeros económicamente viables y elaborados a partir de una fuente renovable. Los cereales se han empleado también para el desarrollo de micro y nanopartículas con aplicación en la encapsulación de compuestos activos inestables, que requieren ser protegidos durante el proceso o el almacenamiento de los alimentos o durante el paso por el tracto gastrointestinal para ejercer su acción en el organismo. Este tipo de protecciones con nanopartículas ha permitido avanzar en la formulación de alimentos funcionales con liberación controlada de los compuestos de interés, siendo los almidones de trigo, sorgo y arroz lo más estudiados (49).

En las últimas dos décadas se ha avanzado también en el desarrollo de bionanomateriales a partir de celulosa, los cuales han sido denominados nanofibras de celulosa o (CNFs) por sus siglas en inglés. Las CNFs tienen la particularidad de ser un polímero con estructura flexible con gran cantidad de grupos hidroxilos en su superficie, lo que le permite tener nanoporos cuando se encuentra en estado seco. Entre las aplicaciones de las CNFs se puede encontrar que están siendo usadas también para reforzar mecánicamente otros materiales, y como soportes para incorporar compuestos activos y generar sistemas de liberación controlada (50).

La versatilidad que ofrecen los biopolímeros obtenidos a partir de biomasa es una característica muy conveniente en la actualidad, donde los consumidores están demandando materiales para el envasado de alimentos más amigables con el ambiente, pero sin dejar de lado la función protectora. Cuando se habla de envasado de alimentos, se debe considerar que todos los envases tienen la función principal de contener y proteger, sin embargo, en muchos casos se presentan interacciones entre el producto y el material que favorece el proceso de protección, estos son los denominados envases activos. Las interacciones se pueden presentar a través del espacio de cabeza y el producto. Además, el material de envase, o un componente de este (como un sello o cierre) puede interactuar con el producto o permitir la transferencia o liberación controlada de ciertos compuestos dentro o fuera del envase. Algunos de los sistemas de envasado activos más importantes aplicados en alimentos son: envases *activos antimicrobianos* y *antioxidantes*. Existe otra categoría para los envases y son los denominados los Smart Packaging o envases inteligentes, los cuales buscan principalmente comunicarse con los consumidores y brindarles información sobre el estado o calidad de los productos (51).

Para el caso de los envases inteligentes la nanotecnología ha permitido desarrollar sensores no invasivos basados en el empleo de biopolímeros y enzimas o compuestos orgánicos, que permiten identificar con velocidad y precisión cambios en las condiciones de los alimentos envasados. Los sensores se pueden incrustar fácilmente en el material de envase o en una etiqueta o recubrimiento, para añadir la función inteligente al envasado y proporcionar a los usuarios información apropiada y a tiempo sobre la calidad y la seguridad de los alimentos, ya sea indirectamente mediante el monitoreo de las condiciones de almacenamiento como el historial de tiempo-temperatura, o directamente mediante el seguimiento de la presencia de marcadores de degradación de los alimentos. Estos indicadores indirectos o directos de calidad y seguridad alimentaria son capaces de integrar múltiples gases y sensores volátiles utilizables en substratos flexibles tales como materiales de envase (52).

Aunque los biopolímeros son ecológicos y ya se ha confirmado su potencial para mejorar la protección de los alimentos mientras se mantiene la seguridad y calidad, estos materiales presenta una gran

deficiencia en sus propiedades de barrera a la humedad y/o al oxígeno en la mayoría de los casos, situación que los pone en desventaja frente a los materiales de envase derivados del petróleo. Por lo tanto, se hace necesario apoyar los biopolímeros con desarrollos nanotecnológicos, buscando alcanzar condiciones de barrera iguales e incluso superiores a los materiales sintéticos. Lo anterior se ha logrado con la generación de biopolímeros compuestos, los cuales contienen dos o más fases, en la que una fase es definida como continua y la otra como dispersa. Normalmente la fase continua es un biopolímero o mezcla de ellos y la fase dispersa es el material relleno o refuerzo, donde se ha reportado la incorporación de nanopartículas como el SiO₂, nanocristales de celulosa, nanopartículas de plata entre otros. La Figura 2 esquematiza las diferentes formas para incorporar las nanoestructuras en los polímeros, las cuales no solo afectan las propiedades de barrera del material, sino que afecta propiedades mecánicas, razón por la cual éstas siempre deben ser caracterizadas, al igual que la biodegradabilidad del material, por lo que se prefiere el uso de rellenos derivados de proteínas o polisacáridos, buscando mantener las propiedades ecológicas del polímero (2).

La incorporación de los nanomateriales en los polímeros ha permitido evaluar las interacciones que se presentan en el sistema y la capacidad del material de relleno para mantener propiedades antimicrobianas o antioxidantes una vez incorporado en el material. Aunque no son muchos los estudios que profundizan en los mecanismos de difusión y liberación de nanocompuestos desde el polímero, Damm, Münstedt, & Rösch (53) realizaron un estudio donde evaluaron el mecanismo de liberación de iones de plata desde polímeros de poliamida 6, combinando las pruebas con evaluación de la eficacia antimicrobiana contra *E. coli* y buscando descubrir si hay una correlación directa. El estudio encontró que, al incorporar nanopartículas de plata en el polímero, se generan los iones de plata, los cuales seguían un proceso de liberación de orden cero. Se encontró también correlación entre la eficacia antimicrobiana y la velocidad de liberación de los iones de plata desde el polímero, encontrando que una concentración de $9.5 \times 10^{-4} \text{ mg l}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ day}^{-1}$ fue suficiente para eliminar completamente la carga de *E. coli* en 24 horas. Considerando que al incorporar las nanoestructuras en los polímeros se pueden presentar múltiples interacciones, es necesario realizar evaluaciones que permitan identificar los procesos de difusión del compuesto en la matriz polimérica y confirmar la efectividad del sistema.

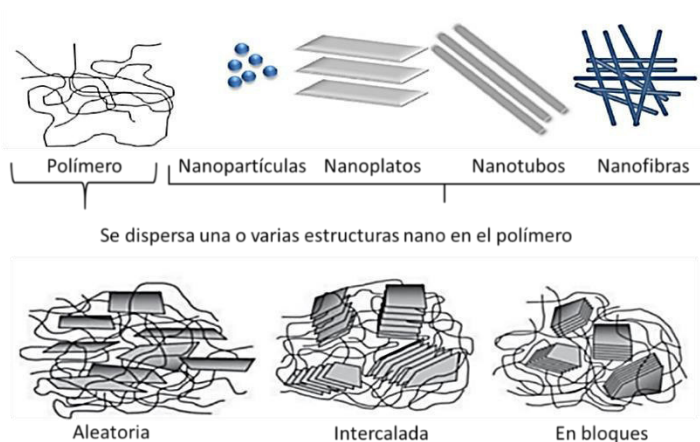


Figura 2. Esquema que ilustra la preparación de nanomateriales y las posibles organizaciones en el polímero Tomado de (2) y modificada

En cuanto al desarrollo de biopolímero con acción antioxidante, se han adelantado estudios (54) para evaluar la encapsulación de compuestos activos como α -Tocoferol, cinamaldehído y aceite de ajo encapsulados en nanoemulsiones de aceite en agua (O/W), para luego incorporarlas en un biopolímero de gelatina-quitosan. La película con nanoemulsión y α -Tocoferol-cinamaldehído encapsulados, presentó una alta actividad antioxidante medida por ABTS \cdot^+ y ensayos de captación de radicales DPPH, mostrando que son capaces de actuar como donantes más fuertes de átomos de hidrógeno o electrones, hasta la reducción del radical estable de DPPH o ABTS \cdot^+ . El estudio confirmó que la reducción del tamaño de la molécula de α -Tocoferol, aceite de ajo y cinamaldehído a la escala nanométrica y encapsulada en biopolímeros, no afectó su actividad antioxidante, y se atribuyó

principalmente a los ácidos fenólicos y terpenoides presentes en los tres compuestos, que son capaces de apagar los radicales libres formando radicales fenoxilo estabilizados por resonancia (54).

Actualmente la industria está buscando estrategias para generar productos más saludables, amigables con el ambiente, de calidad y con buena aceptación por parte de los consumidores. Es así que, la nanotecnología y los biopolímeros están siendo estudiados por su capacidad de proteger, de permitir la entrega de ingredientes bioactivos, y/o diseñar productos con nuevos atributos fisicoquímicos o sensoriales. Un área importante para la investigación es la identificación de nuevas fuentes de biopolímeros, así como el estudio de partículas en escala nano con atributos funcionales novedosos o mejorados, sin perder de vista la aplicación de procesos económicamente factibles para la producción a gran escala y seguros para los consumidores (4).

4. Aspectos de seguridad de las nanopartículas para el contacto directo con alimentos

Las nanopartículas (NP) han sido definidas como partículas producidas en un intervalo de diámetro entre 1 a 100 nm, las cuales poseen propiedades particulares que no son presentadas en otras escalas (aunque las partículas se produzcan con la misma composición química) (55). Estas se han empleado en diferentes campos incluyendo farmacéutico, biomédico, químico (como catalizador) e incluso en de los alimentos (56–59); es en este último campo donde las NP han sido ampliamente estudiadas como un activo que puede conferir varios tipos de actividades a un empaque de alimentos convencional tales como antimicrobiana, antioxidante o absorción de gases (oxígeno, dióxido de carbono, humedad, entre otros) (60). Sin embargo, el contacto de las NP con los alimentos podría asociar algunos riesgos sobre la salud humana; la *nanotoxicidad* es un término entonces, que ha emergido para referirse al estudio de la toxicidad en compuestos a nanoescala. La *nanotoxicidad* involucra los efectos biológicos adversos de las NP a nivel de células, tejidos, órganos y organismos, los cuales han sido asociados a la composición química altamente dinámica y a las propiedades físicas (tamaño, forma, capacidad de aglomeración/agregación, cristalinidad, entre otras) (61).

Con el propósito de establecer la *nanotoxicidad* de las NP, algunos autores han usado diferentes metodologías de acuerdo al objetivo del estudio; (i) genotoxicidad, (ii) estrés oxidativo, y (iii) muerte celular (61). Estos ensayos han sido útiles para establecer tanto la toxicidad como el mecanismo asociado a este; NP de plata fueron inmovilizadas en laponita para disminuir su liberación desde películas de quitosán, encontrando que la inmovilización redujo de 29 % (NP de plata sin inmovilización) a 5 % la liberación de estas NP. Así mismo, una baja citotoxicidad en células L02 (línea de hepatocitos humanos normales) por ensayo MTT (por sus siglas en inglés, bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) y alta actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *A. niger* y *P. citrinum* fue reportada (62). Así mismo, las NP de plata han demostrado una gran versatilidad en cuanto a sus propiedades; Kumar, Shukla, Baul, Mitra, & Halder (63) desarrollaron películas nanocompuestas de gelatina, quitosán y NP de plata encontrando que una película híbrida extendió la vida útil de uvas rojas hasta dos semanas más.

Para diversos tipos de NP se ha reportado una baja citotoxicidad en diversas líneas celulares como hepatocitos (63) y queratocitos (64), incluso en ratas expuestas *vía* oral con NP; ratas Sprague-Dawley fueron alimentadas con micro y NP de sílice por Liang *et al.*, (65) a dosis bajas, medias y altas, observando que no se presentaron cambios significativos en la mortalidad, signos clínicos, peso corporal, consumo de alimento o peso de los órganos. Sin embargo, diferencias entre el control y los grupos tratados con partículas de sílice en cuanto a valores bioquímicos hematológicos y clínicos fueron encontrados. En conclusión, efectos no tóxicos de micro y NP de sílice fue reportado.

Aunque estos resultados positivos han sido observados, otras NP como las de óxido de hierro (usadas en la industria alimenticia para inmovilización de enzimas (66), óxido de titanio (se emplea como aditivo en la industria alimenticia por su actividad antimicrobiana (67), incluso las de plata han mostrado toxicidad en diferentes células y órganos (68, 69). Es en este sentido que debe establecerse el comportamiento biológico de forma individual para cada tipo de NP y en general, de cada material nanoestructurado cuyo propósito sea el contacto con alimentos y/o consumo humano. Adicionalmente, algunas otras preocupaciones existen en cuanto a en qué proporción pasan a través de la barrera gastrointestinal, su acumulación en ciertos órganos y biopersistencia, y finalmente sus efectos a largo plazo (70).

Debido a esto es de gran relevancia y pertinencia el estudio de la *nanotoxicidad* de las NP, particularmente cuando estas pueden estar en contacto con algún alimento debido a que el criterio de GRAS (por sus siglas en inglés, Generally Recognized As Safe) de estos compuestos no implica que sean seguros a nanoescala (71). Además, las características de cada matriz a nanoescala son diferentes, haciendo necesario estudios caso por caso. En este mismo sentido, la FDA sugiere que cada productor debería estudiar el perfil toxicológico para cada contenedor de NP (71). Por lo tanto, las investigaciones deben dirigirse a estudiar rigurosamente el comportamiento de las NP y nanomateriales tanto en sus características fisicoquímicas como en la seguridad alimentaria para contribuir a la legislación y regulación de productos en la industria alimentaria.

La FDA (Food and Drug Administration) ha declarado que hace falta más evidencia científica sobre el comportamiento y posibles riesgos asociados de los nanomateriales en la salud humana (72); es justamente ramas como la nanotoxicología la que podría proveer esta información (6). Actualmente, EFSA, FDA, Health Canada, Fsanz entre otros, convergen en la afirmación anterior como reportaron (12). Así mismo, la ausencia de regulación en muchos países sobre NP para su uso en alimentos (como empaque o como aditivo) ha empezado a ser más evidente ((73). Actualmente, se ha presumido que estos nanomateriales están bajo la legislación vigente y en consecuencia, y como cualquier otro compuesto en contacto con los alimentos, además, los nanomateriales deben cumplir con las disposiciones del Reglamento Marco Europeo (CE) 1935/2004(74] que define los requisitos generales para garantizar que las sustancias incorporadas en el envase no ponen en peligro la salud humana ni deterioran en forma inaceptables las características organolépticas de los alimentos (6).

Finalmente, lo anterior se convierte en un gran desafío ya que a diario surgen operaciones de procesamiento rentables que involucran el uso de la nanotecnología, pero con el aumento en las diversas aplicaciones, aumentan también las preocupaciones con respecto al desarrollo de nanoestructuras biocompatibles, seguras y no tóxicas (75). Por esto, el compromiso científico debe estar desde el diseño y producción hasta la evaluación de riesgos y disposición final, no sólo NP sino de cualquier material nanoestructurado.

5. Futuro de la nanotecnología

Las aplicaciones y desarrollo de los nanomateriales están creciendo masivamente en sectores como la agricultura, medicina, ropa, cosméticos, alimentos, y la salud pública, esto debido a la capacidad única que presentan estos materiales para solubilizarse en diversos sistemas y proteger los componentes bioactivos mientras se procesan y almacenan los productos (76). Así mismo, varios informes confirman que estos nanomateriales pueden mejorar la seguridad alimentaria mediante la mejora de la eficacia del envasado de alimentos con los envases activos e inteligentes, así como la extensión de la vida útil, manteniendo la alta calidad nutricional de los alimentos y convirtiéndose en el marco perfecto para desarrollar productos innovadores. Sin embargo la nanotecnología se enfrenta a un gran desafío, donde debe crear sistemas nano que sean biocompatibles, seguros, comestibles y no tóxicos, que permitan desarrollar formulaciones efectivas y que sean seguras para el consumo humano (76).

Durante el desarrollo de la historia se ha demostrado que los consumidores son reacios a aceptar las nuevas tecnologías, situación que hace necesario que se avance en la dirección de la educación de los consumidores. El reto para la industria alimentaria es la educación del público con respecto a la efectos asociados a la salud, seguridad y medio ambiente de nanotecnología y los beneficios que ésta puede representar para el sector agrícola y la seguridad alimentaria en general (6).

6. Conclusiones

Los residuos agroindustriales son materia prima relevante para la obtención de biomateriales novedosos con potencial aplicación en la industria alimenticia y amplia fuente de estudio; los envases son, por tanto, una de las áreas donde más se han aplicado biopolímeros producidos desde residuos. Sin embargo, ha sido la nanotecnología una gran potenciadora de dichos biopolímeros al conferir diversas propiedades a los envases tales como antimicrobiana, antioxidante, antibacteriana, entre otros, haciéndolos funcionales. Así mismo, nuevas tecnologías se han desarrollado para reunir tanto los biomateriales como la nanoescala cuyo fin el desarrollo de envases inteligentes. Finalmente, el uso y las implicaciones de los materiales a nanoescala

aún no se encuentra regulado claramente, debido a la falta de bases científicas que prueben los posibles efectos sobre la salud humana. Por lo tanto, desarrollar e investigar desde el diseño hasta la aplicación, los envases de uso alimenticio es imperativo para garantizar la seguridad de estos.

Referencias

1. Duncan, T.V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of colloid and interface science*, 363(1), 1–24.
2. Mihindukulasuriya, S.D.F., & Lim L-T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends Food Science Technology*, 40, 149–67.
3. Schmidt, D., Shah, D., & Giannelis, E. (2002). New advances in polymer/layered silicate nanocomposites. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 6, 205-212.
4. Joye, I.J., & Mccllements, D.J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19, 417-427.
5. Jacob, J., Haponiuk, J.T., Thomas, S., & Gopi, S. (2018). Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Materialstoday Chemistry*, 9, 43–55.
6. Dufey, W., Villares, A., Peyron, S., Moreau, C., Ropers, M., Gontard, N., & Cathala, B. (2017). Nanoscience and nanotechnologies for biobased materials, packaging and food applications: New opportunities and concerns. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 46, 107-121.
7. Olvera-Gracia, M., Aguilar-Hernández, J., & Kryshtab, T. (2013) Procesamiento de micro y nanofibras de polipirrol/óxido de polietileno/nylon-6 por la técnica de electrohilado. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 14, 575-581.
8. Blanco, E.E., Escobar-Mora, N., Hoyos-Palacio, L., & Sarmiento-Gaviria, M.F. (2019). Synthesis and mechanical characterization of a non-woven nanofiber by the electrospinning technique. *Dyna*, 86, 64-72.
9. Trinca, R.B., Abraham, G.A., & Felisberti, M.I. (2015). Electrospun nanofibrous scaffolds of segmented polyurethanes based on PEG, PLLA and PTMC blocks: Physico-chemical properties and morphology. *Materials Science and Engineering*, 56, 511–517. doi:10.1016/j.msec.2015.07.018
10. Calzón Gutiérrez, A. (2016). *Desarrollo de un equipo de electrospinning para obtención de nanofibras alineadas de recombinámeros tipo elastina*. Universidad de Valladolid.
11. Xue, J., Wu, T., Dai, Y., & Xia, Y. (2019). Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews*, 119(8), 5298–5415. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00593
12. Ricaurte, L., & Quintanilla-Carvajal, M.X. (2019). Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations. *Trends in Food Science Technology*, 85, 92–106.
13. Khan N. (2012). Applications of electrospun nanofibers in the biomedical field. *SURG: Studies by Undergraduated Researchers at Guelph*, 5, 63–73.
14. Zhang, C-L., & Yu, S-H. (2014) Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects. *Chemical Society Review*, 43, 4423–48.
15. Pham, Q.P., Sharma, U., & Mikos, A.G. (2006). Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering*, 12(5), 1197–1211. doi:10.1089/ten.2006.12.1197
16. Huang, Z., Zhang, Y., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63, 2223-2253.
17. Sencadas, V., Correia, D., Areias, A.C., Botelho, G., Fonseca, A.M., Neves, I.C., Ribelles, J.L., & Méndez, S.L. (2012). Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1295-1301.
18. Ki, C., Baek, D.H., Gang, K.D., Lee, K., Um, I., & Park, Y.H. (2005). Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer*, 46, 5094-5102.
19. Haider, A., Haider, S., & Kang, I. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 11, 1165-1188.
20. Canadas, R.F., Cavalheiro, J., Guerreiro, J.D., Almeida, M.C., Pollet, E., Silva, C.D., Fonseca, M.M., & Ferreira, F. (2014). Polyhydroxyalkanoates: waste glycerol upgrade into electrospun fibrous scaffolds for stem cells culture. *International journal of biological macromolecules*, 71, 131-140.

21. Jin, X., Fan, S., Xue, Y., Wu, L., Lu, Y., Chen, J., Wang, X., Dong, D., Fan-Bin, M., Lu, Y., Wood, J.T., & Tang, C. (2014). Electrospun CF-PHA Nanocomposites: Effect of surface modifications of carbon fibers. *International Journal of Polymeric Materials*, 63(5), 63:262–7.
22. Volova, T., Goncharov, D., Sukovaty, A., Shabanov, A., Nikolaeva, E., & Shishatskaya, E. (2014). Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: effects on electrospinning parameters on structure and properties. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 25(4), 370–393.
23. Ramier, J., Boudierlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Langlois, V., Renard, E., Albanese, P., & Grande, D. (2014). Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrospayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 38, 161–169.
24. Woerdeman, D. L., Ye, P., Shenoy, S., Parnas, R. S., Wnek, G. E., & Trifimova, O. (2005). Electrospun fibers from wheat protein: investigation of the interplay between molecular structure and the fluid dynamics of the electrospinning process. *Biomacromolecules*, 6(2), 707–712.
25. Sullivan, S.T., Tang, C., Kennedy, A., Talwar, S., & Khan, S. (2014). Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 35, 36-50.
26. Har-el, Y., Gerstenhaber, J., Brodsky, R., Huneke, R., & Lelkes, P. (2014). Electrospun soy protein scaffolds as wound dressings: Enhanced reepithelialization in a porcine model of wound healing. *Wound Medicine*, 5, 9-15.
27. Laurencin, C., Kumbar, S., Nukavarapu, S., James, R., & Hogan, M. (2008). Recent Patents on Electrospun Biomedical Nanostructures: An Overview. *Recent Patents on Biomedical Engineering*, 1(1), 68–78
28. Gupta, K.C., Haider, A., Choi, Y., & Kang, I. (2014). Nanofibrous scaffolds in biomedical applications. *Biomaterials Research*, 18, 5
29. Metreveli, G., Wågberg, L., Emmoth, E., Belák, S., Strømme, M., & Mihranyan, A. (2014). A size-exclusion nanocellulose filter paper for virus removal. *Advanced healthcare materials*, 3(10), 1546–1524.
30. Wang, Y., Cui, W., Chou, J., Wen, S., Sun, Y. & Zhang, H. (2018). Electrospun nanosilicates-based organic / inorganic nanofibers for potential bone tissue engineering. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 172, 90–97.
31. Zhang, Q., Tu, Q., Hickey, M. E., Xiao, J., Gao, B., Tian, C., Heng, P., Jiao, Y., Peng, T., & Wang, J. (2018). Preparation and study of the antibacterial ability of graphene oxide-catechol hybrid polylactic acid nanofiber mats. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 172, 496–505.
32. Li, W., Li, X., Wang, Q., Pan, Y., Wang, T., Wang, H., Song, R., & Deng, H. (2014). Antibacterial activity of nanofibrous mats coated with lysozyme-layered silicate composites via electrospinning. *Carbohydrate polymers*, 99, 218-225.
33. Almasian, A., Giah, M., Fard, G.C., Dehdast, S., & Maleknia, L. (2018). Removal of heavy metal ions by modified PAN/PANI-nylon core-shell nanofibers membrane: Filtration performance, antifouling and regeneration behavior. *Chemical Engineering Journal*, 351, 1166-1178.
34. Lu, Y., Xiao, X., Fu, J., Huan, C., Qi, S., Yongjun, Z., Zhu, Y., & Xu, G. (2019). Novel smart textile with phase change materials encapsulated core-sheath structure fabricated by coaxial electrospinning. *Chemical Engineering Journal*, 355, 532-539.
35. Buchko, C.J., Chen, L.C., Shen, Y., & Martin, D. (1999). Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40, 7397-7407.
36. Stenoien, M.D., Drasler, W.J., Scott, R.J., & Jenson, M.L. (1999) Silicone composite vascular graft. *US5866217A* United States of America.
37. Hohman, M.M., Shin, M., Rutledge, G., & Brenner, M.P. (2001). Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physic of Fluids*. 13, 2221–2236.
38. Xie, J., & Wang, C. H. (2006). Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharmaceutical research*, 23(8), 1817–1826.
39. Xu, X., Chen, X., Xu, X., Lu, T., Wang, X., Yang, L., & Jing, X. (2006). BCNU-loaded PEG-PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against Glioma C6 cells. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 114(3), 307–316.
40. Zhang, J., Qi, H., Wang, H., Hu, P., Ou, L., Guo, S., Li, J., Che, Y., Yu, Y., & Kong, D. (2006). Engineering of vascular grafts with genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells on poly (propylene carbonate) graft. *Artificial organs*, 30(12), 898–905.

41. Chew, S.Y., Wen, J., Yim, E.K.F., & Leong, K.W. (2005). Sustained Release of Proteins from Electrospun Biodegradable Fibers. *Biomacromolecules*, 6, 2017–2024.
42. Pham, Q.P., Shama, U., & Mikos, A.G. (2006). Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber / microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*, 7, 2796–805.
43. Yang, D.J., Zhang, L.F., Xu, L., Xiong, C.D., Ding, J., & Wang, Y.Z. (2007). Fabrication and characterization of hydrophilic electrospun membranes made from the block copolymer of poly(ethylene glycol-co-lactide). *Journal of biomedical materials research. Part A*, 82(3), 680–688.
44. Kenawy, E., Layman, J.M., Watkins, J.R., Bowlin, G.L., Matthews, J.A., Simpson, D.G., & Wnek, G.E. (2003). Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*, 24(6), 907–913
45. Song, J.H., Kim, H.E., & Kim, H.W. (2008). Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 19(1), 95–102.
46. Zhang, D., & Wang, Y. (2006). Synthesis and applications of one-dimensional nano-structured polyaniline: An overview. *Materials Science and Engineering B-advanced Functional Solid-state Materials*, 134, 9-19.
47. Ma, Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2006). Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: a novel affinity membrane. *Journal of Membrane Science*, 272, 179-187.
48. McManus, M., Boland, E., Simpson, D., Barnes, C., & Bowlin, G. (2007). Electrospun fibrinogen: feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 81 2, 299-309.
49. Joye, I.J. (2019). Cereal biopolymers for nano- and microtechnology: A myriad of opportunities for novel (functional) food applications. *Trends in Food Science Technology*, 83, 1–11.
50. Lavoine, N., Guillard, V., Desloges, I., Gontard, N., & Bras, J. (2016). Active bio-based food-packaging: Diffusion and release of active substances through and from cellulose nanofiber coating toward food-packaging design. *Carbohydrate polymers*, 149, 40-50.
51. Robertson, G.L. (2012). *Food Packaging: Principles and Practice*. 3th ed. Taylor & Francis.
52. Gontard, N., Peyron, S., Lagaron, J.M., Echegoyen, Y., & Guillaume, C. (2017). Nanotechnologies for active and intelligent food packaging: opportunities and risks. In: Axelos, M.A., Van de Voorde, M.H. (eds.) *Nanotechnology Agriculture and Food Science* (p. 177-196). John Wiley
53. Damm, C., Muenstedt, H., & Rösch, A. (2008). The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and micro-composites. *Materials Chemistry and Physics*, 108, 61-66.
54. Pérez-Córdoba, L.J., Norton, I., Batchelor, H., Gkatzionis, K., Spyropoulos, F., & Sobral, P. (2017). Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. *Food Hydrocolloids*, 79, 544-559.
55. Auffan, M., Rose, J., Bottero, J., Lowry, G., Jolivet, J., & Wiesner, M. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4, 634-641.
56. Padash Hooshyar, S., Mehrabian, R., Panahi, H.A., Jouybari, M.H., & Jalilian, H. (2018). Synthesis and characterization of PEGylated dendrimers based on magnetic nanoparticles for letrozole extraction and determination in body fluids and pharmaceutical samples. *Microchemical Journal*, 143, 190-197.
57. Mousavi Khaneghah, A., Hashemi, S.M., & Limbo, S. (2018). Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioprocess Processing*, 111, 1-19.
58. Sruthi, S., Ashtami, J., & Mohanan, P.V. (2018). Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles. *Materials Today Chemistry*, 10, 175-186.
59. Kombaiah, K., Vijaya, J.J., Kennedy, L.J., & Kaviyarasu, K. (2019). Catalytic studies of NiFe₂O₄ nanoparticles prepared by conventional and microwave combustion method. *Materials Chemistry and Physics*, 221, 11-28.
60. Alhendi, A.S., & Choudhary, R. (2013). Current practices in bread packaging and possibility of improving bread shelf life by nanotechnology. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 3(4), 55-60
61. Caballero-Diaz, E., & Valcarcel, M. (2016). Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 84, Part A, 160-171
62. Wu, Z., Huang, X., Li, Y. C., Xiao, H., & Wang, X. (2018). Novel chitosan films with laponite immobilized Ag nanoparticles for active food packaging. *Carbohydrate polymers*, 199, 210–218.

63. Kumar, S., Shukla, A., Baul, P.P., Mitra, A., & Halder, D. (2018). Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 178-184.
64. Rolim, W.R., Pelegrino, M.T., Lima, B.A., Ferraz, L.S., Costa, F., Bernardes, J.S., Rodrigues, T., Brocchi, M., & Seabra, A.B. (2019). Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*, 463, 66-74.
65. Liang, C.L., Xiang, Q., Cui, W.M., Fang, J., Sun, N., Zhang, X., Li, Y., Yang, H., Yu, Z., & Jia, X. (2018). Subchronic Oral Toxicity of Silica Nanoparticles and Silica Microparticles in Rats. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 31, 197-207 .
66. Cao, M., Li, Z., Wang, J., Ge, W., Yue, T., Li, R., Colvin, V.L., & Yu, W. (2012). Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 27, 47-56.
67. Othman, S., Raudhah Salam, N., Zainal, N., Basha, R.K., & Talib, R.A. (2014). Antimicrobial activity of TiO₂ nanoparticle - coated film for potential food packaging applications. *International Journal of Photoenergy*, 2014, 1-6.
68. Jiang, Z., Shan, K., Song, J., Liu, J., Rajendran, S., Pugazhendhi, A., Jacob, J.A., & Chen, B. (2019). Toxic effects of magnetic nanoparticles on normal cells and organs. *Life Sciences*, 220, 156-161.
69. Shahare, B., Yashpal, M., & Gajendra, S. (2013). Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(3), 161 - 167.
70. Gaillet, S., & Rouanet, J. (2015). Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms—a review. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 77, 58-63.
71. FDA. (2014) Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that Are Color Addi.
72. FDA. (2014). Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology.
73. Carbone, M., Donia, D., Sabbatella, G., & Antiochia, R. (2016). Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *Journal of King Saud University - Science*, 28, 273-279.
74. European Commission (2004). Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal Eur Union*. 47, 4-17.
75. Adabi, M., Naghibzadeh, M., Zarrinfard, M.A., Esnaashari, S.S., Seifalian, A., Faridi-Majidi, R., Aiyelabegan, H.T., & Ghanbari, H. (2017). Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45, 833 - 842.
76. Bajpai, V., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D., Chandra, P., Hwang, S.K., Kumar, P., Huh, Y.S., & Han, Y. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of food and drug analysis*, 26, 1201-1214.

Capítulo 6

Un proyecto de extensión para beneficiar la cadena hortofrutícola de pequeños parceleros en la Región de Azúcar Buena-Valledupar. Colombia

César Augusto Cortés García

Universidad Popular del Cesar. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Grupo BIAT
Centro Desarrollo Empresarial, Valledupar (Cesar). Colombia.
cesarcortescortés@gmail.com, cesarcortés@unicesar.edu.co

Resumen

En este trabajo se presentan resultados preliminares de un proyecto que se está realizando en el Departamento del Cesar al norte de Colombia en el Municipio de Valledupar, con el fin de evitar las pérdidas y el desperdicio de alimentos y favorecer el comercio justo, impulsando el desarrollo económico de pequeños parceleros.

La región en que se desarrolla el trabajo constituye una de las regiones hortofrutícolas de país que fue más afectada por el conflicto armado, donde sus pobladores se vieron obligados a abandonar sus tierras y hoy, en esta etapa del posconflicto, están regresando a recuperar lo que era suyo, pero en un limbo jurídico y unas condiciones de supervivencia de extrema pobreza. Hay muchas regiones como estas en Colombia, que son las despensas alimentarias de su área de influencia, pero bajo un modelo de producción de pequeños agricultores que van desde 0,5 a 10 hectáreas de tamaño. Se encuentran dispersos y con volúmenes pequeños de producciones que estimulan la presencia de intermediarios e incrementan los precios de los productos que son entregados al consumidor.

Se presentan algunos detalles sobre la organización del proyecto y resultados de la etapa inicial de la investigación que es desarrollar un modelo de negocio logístico aplicando las TIC, para la distribución y comercialización de frutas y verduras para los mercados institucionales y para el consumidor final, impactando a toda la cadena de abastecimiento de los pequeños parceleros de la región de Azúcar Buena.

Palabras clave: Cadena de valor, Valledupar, parceleros, cadena de abastecimiento, logística, las TIC, Apps

1. Caracterización de la producción agrícola en la región

Los estudios se realizan en el Departamento del Cesar al norte de Colombia en el Municipio de Valledupar, en el corregimiento de Azúcar Buena donde hay 12 veredas, en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta (Figura 1). Esta región se caracteriza por una alta amplitud térmica, pudiendo pasar de 40 °C a 20 °C en media hora. Las despensas hortofrutícolas analizadas están alejadas de los centros urbanos, con ineficiente o casi nula infraestructura logística, incomunicados de las vías primarias y una población de campesinos con una economía de subsistencia y partícipes de una cadena de intermediarios inequitativa que los hace cada día más vulnerables a las condiciones del mercado, y desestimula una mayor área sembrada. Los productos sembrados por estas poblaciones son en su gran mayoría variedades autóctonas de pancoger¹ que le permite la subsistencia de su núcleo familiar, con semillas propias de sus cultivos manteniendo la tradición de estos productos y los excedentes de su producción los tratan de comercializar buscando obtener algunos ingresos adicionales.

¹Pancoger: Se denominan así aquellos cultivos que satisfacen parte de las necesidades alimenticias de una población determinada. En la zona cafetera son cultivos de pancoger: el maíz, el frijol, la yuca y el plátano

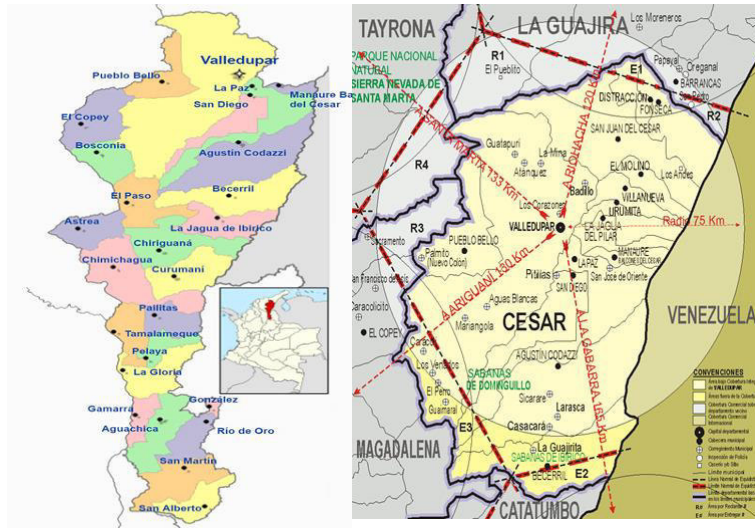


Figura 1. Mapa de ubicación de la zona estudiada

En lo referente a la producción de hortalizas en Colombia, se caracteriza por presentar cultivos dispersos de tamaño pequeño (1.5–10 hectáreas), con la característica de uso intensivo de mano de obra y de los recursos, altos costos de producción, carencia de tecnología apropiada, manejo deficiente de la poscosecha, entre otros aspectos; en igual condición están los fruticultores que en promedio tienen 0.65 hectáreas, encontrándose igualmente con una distribución dispersa y con volúmenes pequeños de producción.

Este modelo la producción se realiza en unidades pequeñas y heterogéneas a nivel de recursos y factores de producción disponibles, que pueden estar distantes o cercanos a los centros de consumo y que generalmente son dispersos.

Al final de la cadena de comercialización se encuentran los consumidores que operan en un modelo la intermediación que incide en forma significativa en el “proceso de formación de precios, ya que generalmente se hace en cadenas largas en las cuales intervienen numerosos agentes, desde el productor hasta los distribuidores minoristas, que llegan a los consumidores, pasando por los acopiadores locales, regionales y los mayoristas”. Aquí los intermediarios se quedan con la utilidad del pequeño parcelero. Según Juan José Perfetti, investigador asociado a Fedesarrollo, las centrales de abasto se han convertido en oligopsonio (Perfetti *et al.*, 2019). Esto significa que constituyen una estructura de mercado de competencia imperfecta, caracterizado por la existencia de un número pequeño de grandes compradores (que determinan los niveles de precios porque manejan grandes volúmenes de compra) y muchos vendedores.

Otra condición que afecta a esta población de pequeños parceleros en toda la cadena de abastecimiento son las pérdidas y el desperdicio de alimentos y que impactan en la pobreza y el hambre, así como en el cambio climático y en la utilización de recursos naturales.

Los alimentos se pierden o desperdician a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción agrícola inicial hasta el consumo final en los hogares. En los países en desarrollo como los nuestros, los alimentos se pierden principalmente durante las primeras etapas y las etapas intermedias de la cadena de suministro de alimentos y se desperdician muchos menos alimentos en el consumo. En general, en el mundo industrializado se desperdician muchos más alimentos per cápita que en los países en desarrollo. Se calcula que el desperdicio per cápita de alimentos por consumidor en Europa y América del Norte es de 95 a 115 kg/año, mientras que en el África subsahariana y en Asia meridional y sudoriental esta cifra representa solo de 6 a 11 kg/año.

Las causas de las pérdidas y el desperdicio de alimentos en los países de ingresos bajos están principalmente relacionadas con las limitaciones económicas, técnicas y de gestión de las técnicas de aprovechamiento, las instalaciones para el almacenamiento y la refrigeración en condiciones climáticas difíciles, la infraestructura, el envasado y los sistemas de comercialización. Si tenemos en cuenta que muchos pequeños agricultores de los países en desarrollo viven en el límite de la inseguridad alimentaria,

una reducción en las pérdidas de alimentos podría tener un impacto inmediato y significativo en sus medios de vida.

Puede plantearse, a partir de las anteriores caracterizaciones de la producción agrícola, que no hay posibilidad de ahorro porque las formas de trabajo campesino no están operando en términos de ganancia/inversión. Esto responde a otros factores objetivos, como el hecho de no existir los medios para un mercado que estimule la producción para la comercialización. Por tanto, la producción es solo de autoabastecimiento y no genera excedentes económicos. Además, la falta de ahorro para invertir en nuevas herramientas disminuye la productividad del trabajo necesitando más fuerza de trabajo para desarrollar el mismo.

El desafío del posconflicto en Colombia es integrar territorios marginales al desarrollo económico y social del país. En este aspecto, es crucial el papel del sector privado, la academia y las comunidades organizadas para generar riqueza y oportunidades en el campo. Se requiere una verdadera transformación donde puedan convivir y producir los pequeños campesinos y los grandes agroindustriales. Hay que crear las condiciones para una estrategia de desarrollo productivo y modernizante que permita sacar a estas comunidades a estos parceleros de su atraso y cerrar la brecha con los centros urbanos. Y para esto resulta esencial el motor del empresariado, grandes, pequeños y medianos inversionistas y emprendedores que quieran darle una vocación productiva a la tierra, ofrecer oportunidades de empleo formal a los campesinos y, ojalá, hacer más competitivo el campo colombiano.

Parte de la solución a esta problemática, cuyo problema es estructural, estaría en implementar estrategias que busquen garantizar la seguridad alimentaria de la población, fortalecer la organización campesina y promover una economía campesina acorde con las necesidades y enfoques de esta población. Además, que se implementen propuestas productivas que sean amigables con el medio ambiente.

Dentro del grupo de investigación BIAT apostamos a trabajar con ideas emprendedoras de proyectos que beneficien a estas poblaciones vulnerables. Desde nuestra perspectiva como parte de la academia, queremos aportar soluciones que sean permanentes, aprovechando el liderazgo que como institución educativa tiene la Universidad Popular del Cesar en la región y con unas fortalezas que bien coordinadas permitirán los resultados esperados.

Dado que muchos procesos iniciados anteriormente fracasaron al corto tiempo, este proyecto se planteó en varias etapas, para ir mostrando resultados manteniendo el interés de todos los que intervienen en el proceso para que no decaiga.

Algunas de las estrategias a desarrollar en forma conjunta al proyecto como crear unas aplicaciones (*apps*) para el proceso de compra y comercialización posterior de los productos, ya fueron aplicadas individualmente en otras regiones del país exitosamente, pero a situaciones particulares por asociaciones y empresas privadas. Es el caso de Comproagro, una plataforma tecnológica que elimina los intermediarios en el proceso de compra y venta de productos agrícolas y un centro de acopio para los agricultores de Boyacá, que reúne a pequeños campesinos para vender productos en masa a grandes superficies. Este proyecto, que nació en la población de Toca, Boyacá, tiene como objetivo general unir al consumidor final con el campesino colombiano. Actualmente, se comercializan más de 50 productos a través de la plataforma.

También existe para Bogotá la página www.elcostal.co donde simplemente se ingresa y se puede comprar frutas, verduras, granos, semillas, frutos secos, entre otros; lo que esta empresa busca es vender una experiencia diferente a la hora de mercar llevándoles a los clientes esa variedad de productos que el campo ofrece.

Para Medellín y Pereira, dos de las principales ciudades de Colombia, existe la aplicación Siembra Viva. Su estímulo para la difusión es: *¿Se imagina que usted pueda comprar directamente a los campesinos y así pagarle justamente por su trabajo? Que usted puede comprar a los agricultores locales y recibir su pedido sin salir de su hogar. Con esta solución de comprar a los campesinos, aparte de ayudar económicamente a estos, recibirá en su casa toda clase de hortalizas, verduras, frutas, granos de la más alta calidad.*

Podríamos decir que este proyecto tiene como base la acumulación de experiencias exitosas, como las mencionadas en los párrafos anteriores) que se están dando en el sector agrario en diferentes regiones del país.

Para desarrollar este proyecto piloto, se escogió la región Corregimental de Azúcar Buena donde se estima hay más de 3000 parceleros en las condiciones descritas anteriormente y donde ya se encuentran muchos asociados a través de juntas de acción comunal o de cooperativas; para ello se escogió la junta de acción comunal La Estrella y La Montaña que reúne en estos momentos unos 80 parceleros de 350 que hay en esa vereda y ya se encuentran desarrollando unos mercados campesinos apoyados por la Cámara de Comercio, La Alcaldía, La Gobernación y otras entidades, donde los asociados sacan sus productos y los venden de acuerdo a la oferta y la demanda, a clientes que llegan atraídos por los precios y ser productos orgánicos (Figura 2).



Figura 2. Difusión de las actividades. Fuente: Evelio López Arias, Pdte. Junta de Acción Comunal La Estrella-La Montaña

Por ello, la etapa inicial de nuestra investigación es desarrollar un modelo de negocio logístico aplicando las TIC, para la distribución y comercialización de frutas y verduras para los mercados institucionales y para el consumidor final, impactando a toda la cadena de abastecimiento de los pequeños parceleros de la región de Azúcar Buena.

Ya que hay cientos de regiones como Azúcar Buena en Colombia, este proyecto piloto podría tener relevancia a nivel nacional.

2. ¿Qué impacto se espera lograr?

- Crear un modelo organizacional donde todos los participantes se sientan representados y asegure su sostenibilidad en el tiempo.
- Crear los medios para un mercado que estimule la producción para la comercialización.
- Incorporar pequeños parceleros en situación de pobreza y vulnerabilidad a cadenas de abastecimiento con valores agregados que les garantice precios justos para ellos y precios justos y estables a la canasta familiar.
- Eliminar la intermediación en toda la cadena llegando directamente al consumidor final (Los hogares)
- Mejorar la competitividad y la productividad de los pequeños parceleros vinculándolos a la cadena de abastecimiento.
- Aportar a la superación de la pobreza y fomentar el desarrollo empresarial y construcción de paz.
- Garantizar precios de mercado y mejoramiento de la calidad en el largo plazo.
- Disminución de las pérdidas en la cadena de abastecimiento.
- Mejorar la calidad de vida de esta población.

3. ¿Dónde está insertado este proyecto?

Dentro de la estrategia de superación de la pobreza y desarrollo sostenible que busca contribuir con el cumplimiento de los objetivos del milenio –ODM- en especial a:

- Erradicar la pobreza extrema y el hambre.
- Garantizar la sostenibilidad del medio ambiente.
- En un mundo con recursos naturales limitados (tierra, agua, energía, fertilizantes, etc.) es necesario encontrar soluciones coste-efectivas para producir suficientes alimentos inocuos y nutritivos para todos.

4. ¿Por qué se justifican estos proyectos?

Estos proyectos productivos, de seguridad alimentaria, de comercialización de productos agrícolas y de fortalecimiento de su capacidad productiva son necesarios para disminuir los índices de desempleo e inseguridad, para generar capacidad de demanda e impulsar el crecimiento de la economía en términos de eficiencia y equidad.

5. Estado actual del proyecto

La Universidad Popular del Cesar en su Facultad Administrativa, contable y económica cuenta con un Centro de Desarrollo Empresarial (CDE) a través del cual se prestan servicios de asesoría y consultoría a las PYMEs y se atiende población vulnerable; el CDE tiene la posibilidad de establecer convenios, hacer alianzas y a través de prácticas y proyectos de grado puedan los estudiantes en ambientes reales poner a prueba los conocimientos adquiridos. Igualmente, el CDE cuenta con un grupo de docentes con diferentes perfiles profesionales y experiencia empresarial.

A través del CDE se estableció un convenio de cooperación con la junta de acción comunal La Estrella y La Montaña del corregimiento de Azúcar Buena donde tendrán acceso a toda la infraestructura con la que cuenta la Universidad y el acompañamiento a través de docentes y estudiantes destinados a ello según las necesidades encontradas. También vienen involucrándose a este proyecto la Cámara de Comercio de Valledupar, La Alcaldía de Valledupar, algunas Fundaciones que ya venían trabajando en defensa del campo colombiano.

Desde el CDE se diseñó y se hizo una propuesta sobre la cual se estableció un plan de trabajo definido entre las partes que en su primera etapa se deben dar los siguientes resultados:

1. Establecer los productos que se dan en la región por unidad productiva y los volúmenes que inicialmente se puedan comercializar.
2. Crear una empresa donde tengan cabida equitativamente todos los actores, organizaciones campesinas, empresa privada, sector público, la academia, fundaciones y grupos de investigación. Será la encargada de gerenciar y hacer sostenible en el tiempo este proyecto.
3. Desarrollar un modelo logístico de comercialización y distribución, “que provea el producto correcto, la cantidad requerida, en condiciones adecuadas, en el lugar preciso y en el tiempo exigido” (Folleto de la IAC, Colombia). Un modelo que pueda captar el valor agregado que se da en la cadena entre la producción primaria y el precio de venta del mayorista.
4. Diseñar dos *Apps*:
 - Una al inicio de la cadena para los proveedores de productos (parceleros) para controlar volúmenes a comprar y fechas de entregas de sus productos a la empresa comercializadora, la cual permitirá organizar la compra y determinar los volúmenes a vender; el propósito de tener una relación más cercana con los campesinos, facilitándoles la vida a las personas y ahorrarles tiempo
 - Y la otra *App* al final de la cadena para que las instituciones y los consumidores finales (hogares) conozcan que productos hay ofertados y hagan sus pedidos.

Una segunda etapa que se puede desarrollar paralela a todo el proceso son los proyectos que desde el grupo de investigación se puedan realizar con los semilleros en la búsqueda de nuevos componentes, nuevos usos, nuevos productos, nuevas aplicaciones, que agreguen valor a sus productos primarios y los haga más competitivos y no sean tan vulnerables.

Y otra etapa posterior relacionada con la presentación de propuestas a nivel nacional e internacional para aplicar a convocatorias donde se puedan jalonar recursos de inversión que permitan agregarle valor a los procesos y productos buscando una mayor productividad y competitividad en toda la cadena de abastecimiento. En esta etapa también se le apostaría a crear los semilleros de productos nativos. Se considera que sería mucho más efectivo impulsar la producción local en los países en desarrollo aprovechando sus recursos nativos, lo que fomentaría la soberanía alimentaria y traería más beneficios económicos y evitaría la dependencia de un tercio para la adquisición de semillas.

Los avances alcanzados en esta primera etapa en cada ítem han sido todos coordinados desde el CDE respaldado por el Decano de la Facultad y en una gestión multidisciplinaria, incluyendo los jefes de los programas de Contaduría Pública, Economía, Administración de Empresas y Comercio Internacional, donde también se han sumado la Facultad de Ingenierías y Tecnológicas con sus programas de Ingeniería Agroindustrial y de Sistemas.

1. En el primer ítem se procedió a recoger información de cada unidad productiva a través de un formato diseñado para ello, apoyado con estudiantes de los diferentes programas en sus prácticas empresariales. Se aplicó una encuesta para determinar los diferentes productos hortofrutícolas que se producen en la región y los volúmenes iniciales que individualmente obtienen cada uno de ellos, lo que nos brinda cifras importantes para ir diseñando estrategias de comercialización. Los mismos se detallan en la Tabla 1.

Esta encuesta nos ha permitido dimensionar el proyecto e ir direccionando los avances una vez que vemos fortalezas en unos productos más que otros; por ejemplo, con el concurso de tres parceleros que tienen una excelente producción de cacao y café ya se está realizando un ejercicio produciendo de forma artesanal un café tostado y molido y un chocolate en polvo con la marca Don Wilson el cual ya se está comercializando (Figura 3); esto les está demostrando a todos que hay otras formas de comercializar y producir agregándole mayor valor a sus productos primarios.

2. Al frente de este proceso consistente en crear la empresa y organizarnos, el CDE colocó a un docente experto para que, en conjunto con todos los actores, haga la propuesta del tipo de organización y su composición. Esto nos ha permitido llevar a funcionarios del Banco Agrario (de gestión pública) y comenzar a gestionar pequeños préstamos de libre inversión, lo que les permitirá volver activar su vida crediticia. Esta etapa está en proceso de ejecución.
3. A través del programa de Ingeniería Agroindustrial se está coordinando un proyecto de grado con dos estudiantes para crear un modelo logístico de comercialización y distribución para esta cadena de abastecimiento. Está en proceso de ejecución, ya se tienen los estudiantes y se está en el anteproyecto que debe ser aprobado por el comité de proyectos.
4. A través del programa de Ingeniería de Sistemas se está planificando dos actividades un trabajo de aula y un proyecto de grado para diseñar la página web de la empresa a crear y las dos aplicaciones (*Apps*); ya está montada en la página del programa la propuesta para ubicar dos estudiantes que realicen este proyecto.

El tipo de proyecto planteado, avanzado ya en algunas etapas, es de una gran sensibilidad y de muchos enemigos, se debe procesar en finos utensilios y con ingredientes autóctonos de la mejor calidad, dándole la cocción indicada en el tiempo.

Con la creación de este modelo de negocio que puede ser aplicado en cualquier región del país y Latinoamérica, se busca la inclusión económica de una población campesina en situación de pobreza y vulnerabilidad, a la cadena de abastecimiento hortofrutícola a través de un modelo logístico ágil y flexible que implementando las TIC en sus procesos, comunidades vulnerables de pequeños parceleros lleguen directamente al consumidor final recibiendo un precio justo y entregando productos de calidad, frescos, nutritivos, inocuos y orgánicos; mejorando con ello su competitividad.

Tabla 1. Producción agrícola veredas La Estrella- La Montaña

Producto	Unidad de Medida	Cantidades	Variable
Café	kilos	85.000	Cosecha año
Cacao	kilos	35.00	Cosecha
Maíz	kilos	10.00	Cosecha
Frijol	kilos	2.000	Cosecha
Malanga	kilos	10.000	Año
Yuca	Unida	4.000	Año
Aguacate	Unidad	60.000	Cosecha
Naranja	Unidad	75.000	Cosecha
Zapote Criollo	Kilos	1.000	Cosecha
Zapote Cachaco	Unidad	10.000	Cosecha
Mandarina	Unidad	25.000	Cosecha
Limón Mandarina	Unidad	30.000	Cosecha
Lulo	Kilos	3.000	Cosecha
Tomate de árbol	Kilos	2.000	Año
Tomate de cocina	Caja x 12	20.000	Cosecha
Guineo verde	Unidad	120.000	Semanal
Guineo maduro	Unidad	100.000	Semanal
Guineo Manzano	Unidad	200.000	Mensual
Guineo Filo	Unidad	10.000	Mensual
Guineo Filipino	Unidad	6.000	Mensual
Plátano	Unidad	3.000	Mensual
Ahuyama	Kilos	2.000	Cosecha

Fuente: Evelio López Arias, Presidente Junta de Acción Comunal La Estrella- La montaña.



Figura 3. Ejemplo de producto comercializado. Fuente: Evelio López Arias, Presidente Junta de acción comunal La Estrella-La Montaña

Referencias

1. Perfetti, J.J., Delgado, M., Blanco, J., Paredes, G., García, A., Naranjo, J., Pantoja, J., González, L., Bravo-Ureta, B., Jara-Rojas, R., & Moraga, C. (2019). *Adecuación de tierras y el desarrollo de la agricultura colombiana: políticas e instituciones*. Bogotá. Fedesarrollo. <http://hdl.handle.net/11445/3820>

Parte 2

Valorización de recursos regionales

Capítulo 7

Flores comestibles de la región como fuente de compuestos bioactivos

Paz Robert¹, Cristina Vergara², Cristian Arellano¹, Begoña Gimenez³

¹Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Dpto. Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Santiago. Chile.
proberts@uchile.cl

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Santiago. Chile.
Cristina.vergara@inia.cl

³Universidad de Santiago de Chile, Facultad Tecnológica. Dpto. Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Santiago. Chile.
begogimenez@usach.cl

Resumen

El tagete, cempasúchil o copete (*Tagete erecta*) es una planta originaria de América Latina que posee un alto contenido de luteína. La luteína es un pigmento carotenoide que pertenece al grupo de las xantófilas, la cual debido a su estructura química tiene la propiedad de ser un buen antioxidante y presentar beneficios para la salud humana, encontrándose presente en dos tejidos oculares que desempeñan un papel fundamental en la visión: la macula y el lente.

Desafortunadamente la luteína presenta una alta inestabilidad en presencia de oxígeno, luz y altas temperaturas, lo que dificulta su incorporación a matrices alimentarias. Una de las metodologías para otorgarle protección es la microencapsulación mediante secado por atomización, la cual permite la incorporación de sustancias activas en una matriz polimérica con el objeto de proteger a los compuestos activos desde el medio ambiente.

1. Tagetes

a. Características generales

El Tagete (*Tagete patula* L. y *Tagete erecta*) es una planta herbácea anual, originaria de América Latina, de grandes ramificaciones con flores de color amarillo a anaranjado (Figura 1), las cuales crecen en un clima cálido y de baja humedad (1). Las flores de Tagete (*Tagete erecta*) son las fuentes más importantes de luteína, pudiendo encontrarse además en algunas variedades, α y β caroteno (2).



Figura 1. Tagete (*Tagete patula* L. y *Tagete erecta*) de color rojo, amarillo y naranja

b. Luteína como compuesto bioactivo

La luteína (Figura 2) pertenece al grupo de las xantófilas de fórmula general $C_{40}H_{56}O_2$ y nombre sistemático β , ϵ -carotene-3,3'-diol (3). La luteína es uno de los principales componentes en vegetales verdes, frutas de color naranja y yema de huevo, en la que existe libre, es decir no esterificada. Sin embargo, la fuente más importante de luteína son los pétalos de flores de tagete (*Tagete erecta*), donde la luteína se encuentra esterificada (2).

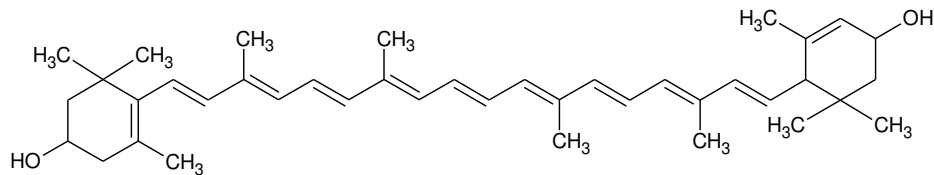


Figura 2. Estructura química de la luteína

La luteína es un antioxidante biológico que inactiva a los radicales libres. Esta propiedad se atribuye al amplio sistema de dobles enlaces conjugados. El mecanismo antioxidante puede ser físico o químico. El mecanismo físico involucra la desactivación de sensibilizadores y/o el atrapamiento de oxígeno singlete y el mecanismo químico el atrapamiento de radicales libres peroxil formando un aducto que se estabiliza por resonancia (4).

La luteína, además de ser un potente antioxidante, presenta beneficios para la salud humana, siendo conocida como el "el nutriente protector del ojo". Este efecto se ha confirmado a partir de varios estudios que muestran una relación inversa entre la luteína y enfermedades oculares (5,6). La luteína está presente en dos tejidos oculares que desempeñan un papel fundamental en la visión: la macula y el lente. La mácula lútea (o "mancha amarilla", por su característico color amarillo) se encuentra en la parte central de la retina y posee la más alta concentración de fotorreceptores que son responsables de la visión central y la agudeza visual de alta resolución. Los daños inducidos por la luz en la retina dependen en gran medida de la longitud de onda y tiempo de exposición. La luteína es capaz de absorber la luz en un amplio espectro de longitud de onda entre 440 nm y 590 nm, alcanzando su pick de absorción en 446 nm del espectro visible, lo cual indicaría que cumple una función como agente fotoprotector, descartando la luz dañina del sol. Debido a esto la luteína ofrece una protección a las células de la mácula, actuando como un antioxidante y con esto preservando la salud macular (5,6).

2. Extracción de luteína

Los métodos tradicionales para la extracción de componentes bioactivos desde plantas, incluyen: la destilación por vapor y la extracción con solventes orgánicos (maceración o técnicas Soxhlet). Específicamente los pigmentos carotenoides son compuestos liposolubles, que normalmente se extraen con solventes orgánicos tales como: acetona, éter de petróleo, benceno, hexano, éter dietílico, cloroformo, etanol y metanol (7). Sin embargo, presentan algunas desventajas como la degradación y pérdida de los componentes bioactivos, los grandes volúmenes de solventes que se utilizan, el tiempo de los procesos y el alto costo de los insumos y mano de obra (8), además de obtener extractos con residuos de solvente.

Como la luteína está químicamente ligada a varios tipos de ácidos grasos como el ácido láurico, mirístico y palmítico, en las flores de tagete, es necesario saponificar el extracto de tagete para obtener luteína libre (2). En este sentido, en la literatura se describen dos métodos de extracción de luteína desde flores de tagete, los cuales consideran saponificación: 1.- Extracción de luteína y posterior saponificación (3) y 2.- Extracción de luteína con saponificación simultánea utilizando hexano (2).

En la Figura 3 (a, b, c) se presentan los cromatogramas obtenidos por HPLC para la extracción y saponificación simultánea de las flores de tagete naranjas molidas a los 4 min, 6 y 24 h, respectivamente. En estas figuras se observa que a medida que transcurre el tiempo, los ésteres de luteína van desapareciendo y el pick de luteína libre aparece, lográndose a las 24 h la total saponificación de los ésteres de luteína.

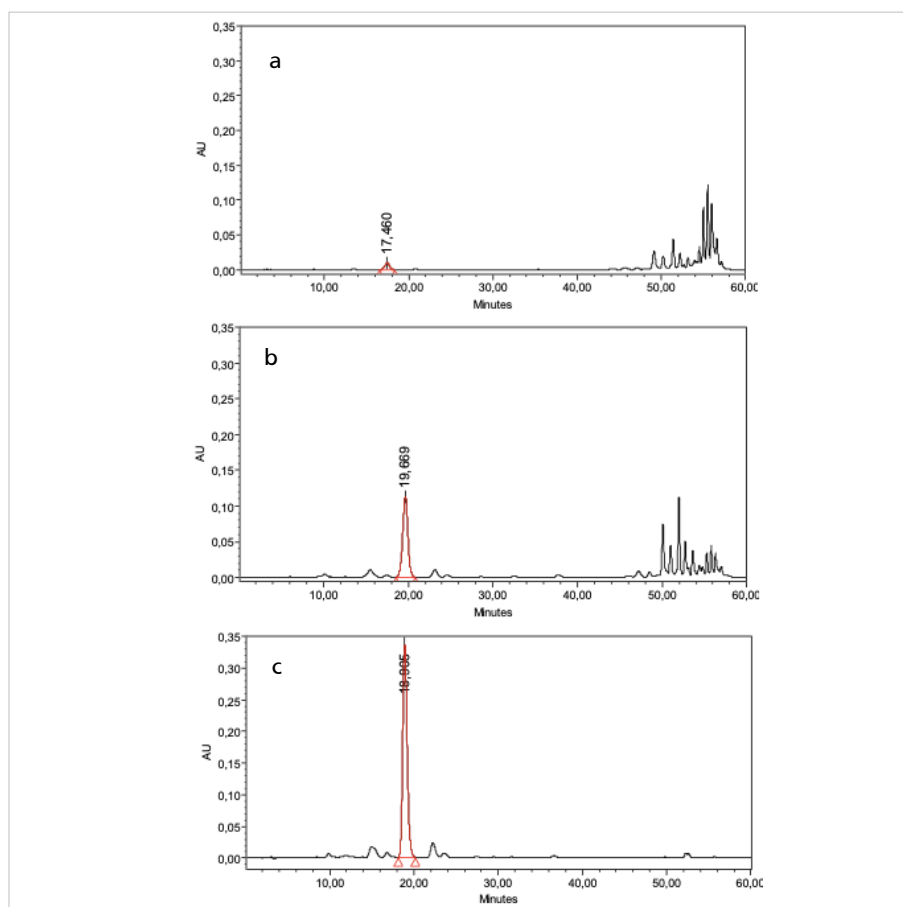


Figura 3. Cromatograma por HPLC para la extracción-saponificación de tagetes naranjas molidas: 4 minutos (a); 360 minutos (b); 24 horas (c). Pico en color rojo corresponde a luteína

El método de extracción con acetona y posterior saponificación es el más utilizado ya que requiere menor cantidad de solvente y permite obtener mayor extracción de carotenoides. Además, el método de extracción con hexano y saponificación simultánea no asegura una completa saponificación durante la extracción, obteniendo valores menores de contenido de luteína (Tabla 1). Además, la molienda de los pétalos de tagete favorece la extracción de luteína. Estudios realizados han demostrado que la luz, el oxígeno y la alta temperatura promueven la degradación e isomerización de la luteína (9).

En este contexto, los principales parámetros para la selección de una tecnología de extracción son: las características bioquímicas de las moléculas extraídas, la rapidez, la limitación del uso de solventes, reproducibilidad, rendimiento de la extracción, la selectividad, la protección de las moléculas extraídas para que no sufran transformación química y costo (10). Durante la extracción es importante considerar que estudios realizados han demostrado que la luz, el oxígeno y la alta temperatura promueven la degradación e isomerización de la luteína (9).

Tabla 1. Comparación entre el método de extracción de luteína con acetona-posterior saponificación (Método A) y con hexano-saponificación simultánea (Método B)

	Método A Pétalo seco y molido	Método B Pétalo seco y molido	Método B Pétalo seco sin moler
Contenido Luteína (mg/g pétalo b.s.)	9,98 ± 0,02 ^a	4,01 ± 0,15 ^a	3,15 ± 1,47 ^a

Método A: Extracción de luteína y posterior saponificación; Método B: Extracción de luteína con saponificación simultánea utilizando hexano.

Por otro lado, el color de la flor de Tagete también influye en el contenido de luteína (Tabla 2). En este sentido, la flor naranja presenta un mayor contenido de luteína, similar a los resultados reportados por Deineka, con un contenido de luteína de $11,0 \pm 0,47$ mg/g (11). El interés en alternativas a la extracción con solventes convencionales, tales como el dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) es cada vez mayor, ya que el CO₂ no es inflamable y no ocasiona daño al medio ambiente (12).

Tabla 2. Contenido de luteína de los pétalos de flor de tagete (*Tagete erecta*) naranja, amarilla y roja

ª	Flor naranja	Flor amarilla	Flor roja
Contenido Luteína (mg/g pétalo b.s.)	$9,98 \pm 0,02^a$	$0,78 \pm 0,03^b$	$7,65 \pm 0,23^c$

b.s: base seca, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3. Estabilización de luteína

3.1. Oleoresinas

Para estabilizar la luteína, generalmente los extractos conteniendo luteína (desde diferentes fuentes) se incorporan en aceites vegetales, dando una oleoresina (mezcla de extracto y aceite vegetal). Además, estas oleoresinas se pueden encapsular en matrices protectoras.

En un estudio de Arellano (13) la extracción de luteína desde pétalos de flor de tagete (*Tagete erecta*), presentó una co-extracción de tocoferoles. Así, la adición del extracto de luteína a aceite de girasol (AG) y aceite de girasol alto oleico (AGAO), modificó el perfil de tocoferoles de los aceites vegetales (Tabla 3). Este comportamiento se ha observado previamente en extractos hexanólicos y supercríticos de hojas de olivo (14, 15).

Tabla 3. Contenido de tocoferoles del aceite de girasol (AG) y aceite de girasol alto oleico (AGAO) con y sin la adición de luteína (LUT)

	LUT	AG	AGAO	AG+LUT	AGAO+LUT
	X ± DE (mg T/kg aceite)				
α-tocoferol	278 ± 23	681 ± 37	597 ± 13	889 ± 1	902 ± 15
β-tocoferol	40 ± 9	nd	nd	48 ± 11	54 ± 1
γ-tocoferol	168 ± 13	nd	nd	110 ± 11	148 ± 5
δ-tocoferol	34 ± 4	nd	nd	30 ± 1	34 ± 4

X: promedio; DE: desviación estándar; AG: aceite de girasol; AGAO: aceite de girasol alto oleico; LUT: extracto de luteína desde flores de tagete; nd: no detectado.

3.2. Encapsulación

La microencapsulación es definida como la tecnología que incorpora cantidades microscópicas de materiales sólidos, líquidos o gaseosos sellados en capsulas, que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo condiciones específicas (16). Dicha tecnología se ha utilizado por la industria de los alimentos por más de 60 años. La selección del proceso de microencapsulación esta dado por las propiedades (físicas y químicas) del material del núcleo y el recubrimiento. Diferentes técnicas se utilizan para la encapsulación, tales como: secado por atomización (spray-drying), enfriamiento por atomización (spray cooling/chilling), recubrimiento por lecho fluidizado (fluidized-bedcoating), extrusión, extrusión centrífuga (centrifugal extrusión), liofilización, coacervación, separación por centrifuga (centrifugal suspension separation), cocristalización, liposomas, complejación por inclusión (16).

En general, los estudios de encapsulación de carotenoides se han enfocado en la protección del carotenoide desde las condiciones del medio ambiente (luz, oxígeno y temperatura), evitando su oxidación y aumentando la vida útil. Actualmente, los estudios de encapsulación de compuestos bioactivos están enfocados en el diseño de micropartículas para liberación en un lugar específico y/o velocidad específica del tracto gastrointestinal para definir su bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

3.2.1. Secado por atomización

El secado por atomización es una operación unitaria en la cual una formulación líquida (solución, emulsión o dispersión) se atomiza en pequeñas gotas dentro de una cámara de secado, con el fin de crear la máxima superficie de contacto entre el líquido y una corriente de gas de secado (generalmente aire) a alta temperatura. De esta manera aumenta la transferencia de calor y de masa (evaporación del agua), obteniendo así un polvo de micropartículas (17).

Inicialmente, la temperatura de las gotas atomizadas aumenta hasta un valor de equilibrio con la temperatura del aire de secado, lo cual da paso a la evaporación constante del agua. En este periodo, la velocidad de difusión del agua desde el centro de la gota permite tener la superficie de ésta saturada de agua, a una temperatura y presión de vapor constante, mientras el tamaño de gota disminuye. Cuando la velocidad de difusión del agua no es lo suficiente alta para mantener la superficie hidratada, se forma la costra, sobre la superficie de la gota. En este punto, la velocidad de secado decrece y la temperatura interna comienza a ascender (18, 19). Posteriormente, las partículas deshidratadas son transportadas a un separador ciclónico para su recuperación. Todo este proceso de secado es instantáneo, lo que es beneficioso para encapsular materiales sensibles al calor debido a sus cortos tiempos de secado (5-30 s) (16,20, 21).

El secado por atomización es la técnica más empleada para encapsular moléculas bioactivas, por tratarse de un método simple, económico, reproducible y de fácil escalamiento. Además, en la industria alimentaria, el equipo de secado por atomización se utiliza, generalmente, para disminuir la actividad de agua (a_w), lo que permite reducir los costos de almacenamiento y transporte, y aumentar la estabilidad microbiológica de los productos en polvo (19, 20). El proceso de secado involucra principalmente, soluciones acuosas, lo cual limita el uso de agentes encapsulantes y compuestos activos a aquellos compuestos solubles en agua (19,20). En el caso de encapsulación de compuestos hidrofóbicos, como luteína, se requiere la elaboración previa de una emulsión aceite en agua (o/w).

Para obtener micropartículas, con características deseables, mediante secado por atomización, es necesario optimizar las variables de formulación de la solución de alimentación y de proceso, aunque en la mayoría de los casos, las condiciones se determinan a través de estudios de ensayos y error (19). Menos estudios se han reportado donde se aplique un Diseño experimental estadístico para optimizar la encapsulación de luteína (22). Los efectos de ambos tipos de variables influyen sobre distintas propiedades de las micropartículas, como contenido del activo, contenido del activo superficial, eficiencia de encapsulación (EE), recuperación del activo, rendimiento, contenido de humedad, actividad de agua, higroscopicidad, color, tamaño de partícula, morfología de las micropartículas, densidad verdadera, densidad aparente, solubilidad y temperatura de transición vítrea (T_g), entre otras (23). Sin embargo, hay pocos estudios donde se han realizado diseños experimentales para optimizar la microencapsulación de compuestos bioactivos.

3.2.1.1 Variables de proceso en el secado por atomización

Variables de proceso como temperatura de la formulación de alimentación, temperaturas de entrada y salida del secador y la relación entre ellas, flujo de aire de secado (aspiración), flujo de aire de atomización, flujo de la solución de alimentación (bomba peristáltica) y el tipo de atomizador afectan a la calidad del producto. La temperatura del aire de entrada al secador es una variable importante en el secado por atomización de compuestos termosensibles como los carotenoides, dado que, al aumentar la temperatura del aire de entrada, aumentan las reacciones de oxidación y por lo tanto pueden encontrarse pérdidas en el proceso de secado. En la encapsulación de una emulsión de extracto de luteína desde flores de tegete con inulina ((AG+LUT)-INU y (AGAO+LUT)-INU), se encontró una recuperación de luteína después del proceso de secado por atomización, de alrededor de un 40 %, mostrando, la susceptibilidad de la luteína a reacciones de oxidación (13), como se muestra en la Figura 4. Estos valores indican que hubo una pérdida cercana al 60 % de luteína en las micropartículas durante el proceso de secado. La recuperación de pigmentos carotenoides es variable, dependiente del tipo de carotenoide (24), tipo de agente encapsulante (25, 26) y tipo de extracto a encapsular.

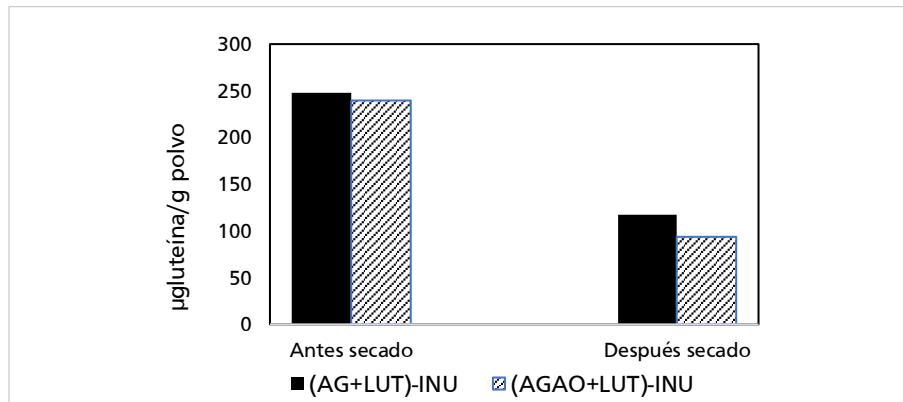


Figura 4. Pérdida de luteína después del proceso de secado por atomización en las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas después del secado por atomización

3.2.1.2. Variables de formulación

Diversos factores de las soluciones de alimentación al secado por atomización, como viscosidad, concentración del activo, contenido de agente encapsulante, relación entre contenido de activo/contenido de agente encapsulante, se han estudiado como variables que afectan las propiedades de las micropartículas, como la EE, tamaño de partícula, morfología, densidad, contenido de humedad, higroscopicidad y densidad aparente, entre otros.

La técnica de secado por atomización es considerada más bien como una tecnología de inmovilización de activos que como una tecnología de encapsulación verdadera, debido a que parte de los compuestos activos quedan expuestos en la superficie de las micropartículas (27). El activo superficial (no encapsulado) es altamente susceptible a las reacciones oxidativas, así como también a desarrollar sabores y olores desagradables. En este contexto la eficiencia de encapsulación (EE) es una variable de respuesta muy importante que representa el activo realmente encapsulado dentro de la micropartícula.

Arellano reportó valores de EE de luteína en ((AG+LUT)-INU) y ((AGAO+LUT)-INU) de 74,2 % y de 73,6 %, respectivamente. La eficiencia de encapsulación aumenta a mayores contenidos de inulina, porque aumenta el contenido de sólidos solubles, aumenta la velocidad de formación de la costra en la superficie de la gota que permite la difusión de agua, pero retienen la emulsión de luteína (18).

En la Figura 5 (A,B,C y D) se muestran las microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas para los sistemas (AG+LUT)-INU (Figura 10 A, C) y (AGAO+LUT)-INU (Figura 10 B, D). En ambos sistemas se observan micropartículas de forma y superficie irregular, con tendencia a la aglomeración. Ronkart (28), señaló que el estado físico (amorfo o semi-cristalino) de la inulina por secado por atomización dependería de la temperatura de la solución de alimentación. Además, no se encontraron diferencias en la morfología de las micropartículas entre los sistemas estudiados.

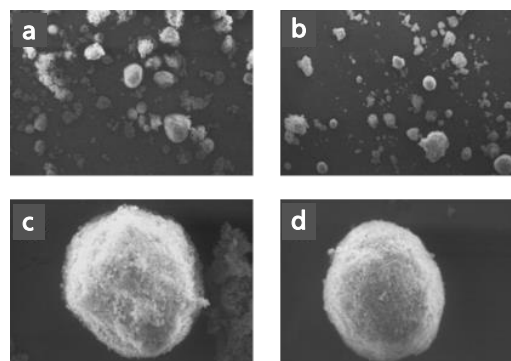


Figura 5. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas obtenidas bajo condiciones óptimas: (A y C) (AG+LUT)-INU y (B y D) (AGAO+LUT)-INU

Referencias

1. Piccaglia, R., Marotti, M., & Grandi, S. (1998). Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Industrial Crops and Products*, 8, 45-51.
2. Hojnik, M., Škerget, M., & Knez, Z. (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *Lwt - Food Science and Technology*, 41, 2008-2016.
3. Rodriguez-Amaya, D. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: ILSI Press.
4. Nachtigall, A.M. (2007). *Extractions, saponification and antioxidant properties of lutein obtained from Tagetes patula L. and Calendula officinalis L. flowers*. Universidade Federal de Viçosa
5. Alves-Rodrigues, A., Shao, A. (2004) The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 150, 57–83.
6. Zaheer K. (2017) Hen egg carotenoids (lutein and zeaxanthin) and nutritional impacts on human health: a review. *CyTA-Journal of Food*, 15, 474-487.
7. Park, P., Kim, E.Y., & Chu, K. (2007). Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, 53, 148-152.
8. Sovová, H., Sajfrtová, M., Bártlová, L. (2004). Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 30, 213-224.
9. Calvo M. (2005). Lutein: A valuable ingredient of fruit and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 671-696.
10. Pasquet, V., Chérouvrier, J., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J., Bérard, J., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J., & Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46, 59-67.
11. Deineka, V., Sorokopudov, V., Deineka, L.A., & Tretyakov, M.Y. (2008). Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41, 540-542.
12. Gao, Y., Nagy, B., Liu, X., Simandi, B., & Wang, Q. (2009). Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49, 345-350.
13. Arellano C. (2011). *Extracción de luteína a partir de flores de tagete (Tagete erecta) y estabilización por microencapsulación*. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile.
14. Guinda, A., Lanzón, A., Ríos, J., y Albi, T. (2002). Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja de olivo: extracto de hexano. *Grasas y Aceites*, 53, 419-422.
15. Jimenez, P., Masson, L., Barriga, A., Chávez, J., & Robert, P. (2011). Oxidative stability of oils containing olive leaf extracts obtained by pressure, supercritical and solvent-extraction. *European Journal of Lipid Science Technology*, 113, 497-505.
16. Desai, K., & Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1294.
17. Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J.J., Jiménez-Aparicio, A.R., & Gutiérrez-López, G.F. (2005). Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67, 179 -184.
18. Anandharamkrishnan, C. & Ishwarya, P. (2015). *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*. (p. 13-15). Oxford, John Wiley and Sons,
19. Gharsallaoui, A., Rouaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 10, 1107-1121.
20. Gouin, S. (2004). Microencapsulation industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
21. Gibbs, F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C.N. (1999) Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 213-224.
22. Nalawade, P., & Gajjar, A. (2016). Microencapsulation of lutein extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 33,75-87.
23. Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F., & Robert, P. (2016). Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. *Trends in Food Science and Technology*, 56, 46-60.

24. Robert, P., Carlsson, R.M., Romero, N., & Masson, L. (1980). Stability of spray-Dried encapsulated carotenoid pigments from rosamosqueta (*Rosa rubiginosa*) Oleoresin. *Journal of the American Oil Chemists`s Society*. 2003. 80, 1115-1120.
25. Wang, Y., Ye, H., Zhou, C., Lv, F., Bie, X., & Lu, Z. (2012). Study on the spray-drying encapsulation of lutein in the porous starch and gelatin mixture. *European Food Research Technology*, 234, 157-163.
26. Lokuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928-935
27. de Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292-302.
28. Ronkart, S., Deroanne, C., Paquot, M., Fougnyes, C., Lambrechts, J.C., & Blecker, C.S. (2007). Characterization of the physical state of spray-dried inulin. *Food Biophysics*, 2, 83-92.

Capítulo 8

Biomoléculas provenientes de la semilla de chía: características y potencial aplicación en alimentos

Débora López¹, Valeria Boeris¹, Darío Spelzini¹, Cecilia Abirached², Ignacio Vieitez³, Luis Alberto Panizzolo², Alejandra Medrano², Silvia Pereyra-Castro⁴, Liliana Alamilla-Beltrán⁵

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad Nacional de Rosario. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Área Físicoquímica. Universidad Católica Argentina. Facultad de Química e Ingeniería del Rosario. Argentina. lopezdn@live.com.ar; valeriboeris@hotmail.com; darucci@yahoo.com.

²Universidad de la República, Facultad de Química, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Área Química de Alimentos. Uruguay. cecilia.abirached@gmail.com; apanizzo@fq.edu.uy;

³Universidad de la República, Facultad de Química, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Área Tecnología de Alimentos. Uruguay.

⁴Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Campus Zacatenco. Departamento de Ingeniería Bioquímica. México. spereyra_c@gmail.com; liliana.alamilla@gmail.com

Resumen

La *Salvia hispánica* L. es una planta herbácea que pertenece a la familia de las *Lamiaceae*, originaria del sur de México y del norte de Guatemala y se la denomina habitualmente con el nombre de chía. A la chía se la incluye en el grupo de los pseudocereales y su semilla tuvo un lugar importante en la dieta de los mesoamericanos por su aporte importante de nutrimentos de alta calidad. Si bien luego de la conquista española su cultivo colapsó y cayó en desuso quedando confinado en comunidades aisladas, en grave peligro de extinción, su cultivo y consumo se ha revalorizado por su alto potencial nutricional y terapéutico. La importancia de las semillas de chía se debe a su elevado aporte de proteínas -que contienen los nueve aminoácidos esenciales, en especial el ácido glutámico, el aspártico y la arginina-, ácidos grasos poliinsaturados -nutricionalmente indispensables- y fibra en la forma de mucílago. Además, posee un interesante aporte de vitaminas y minerales y una reconocida contribución de antioxidantes. Es así que el cultivo de chía tiene cada vez mayor importancia comercial a nivel internacional. Por ello, muchos trabajos de investigación se han orientado hacia el desarrollo de procesos y estrategias de extracción y aislamiento de sus proteínas; de procesos de extracción y estrategias de estabilización de su aceite -en particular la encapsulación representa una alternativa tecnológica para conservar sus propiedades, tanto durante su procesamiento como durante su almacenamiento- y la obtención de compuestos bioactivos. Por otra parte, las proteínas de chía tienen propiedades funcionales apropiadas en la industria alimentaria.

1. Introducción

La *Salvia hispánica* L. es una planta herbácea que pertenece a la familia de las *Lamiaceae*, originaria del sur de México y del norte de Guatemala (1). Se la denomina habitualmente con el nombre de chía por la traducción al castellano de la palabra *chian*, término proveniente del idioma de la civilización azteca, cuyo significado es oleoso (2). Prolifera naturalmente en zonas de bosques de encino o pino-encino y está distribuida en ecosistemas semicálidos y templados del Eje Neovolcánico Transversal de las Sierras Madre Occidental y del sur de Chiapas, en altitudes que varían entre 1.400 y 2.200 m donde está ubicado el centro de diversidad genética y fenotípica, tanto de la chía silvestre y como de la domesticada (3-4).

Históricamente, esta especie ha sido cultivada tanto en ecosistemas tropicales como subtropicales y en regiones en las que las heladas son habituales, como también en las que están libres de ellas (5), especialmente en las zonas montañosas de la vertiente del océano pacífico (6). Las salvias presentan un crecimiento herbáceo anual y perenne, en forma arbustiva y muy ocasionalmente arbustivo trepador. El género *Salvia* es de los que exhiben mayor diversidad, con alrededor de 1.000 especies que se hallan distribuidas en todo el planeta, siendo México el sitio que presenta la mayor diversidad con aproximadamente unas 500 especies (4, 7).

A la chía se la incluye en el grupo de los pseudocereales formado por plantas, con semillas, aquenios o granos, pertenecientes las familias Amaranthaceae (amarantos), Polygoniaceae (alfarfón), Chenopodiaceae (cañihua) y Labiatae (*Salvia hispanica* L.) (8).

1.1. Aspectos históricos

La chía (*S. hispanica* L.) es una semilla con un significado especial en América, principalmente porque ha sido consumida desde la antigüedad por la población mesoamericana, responsable de adjudicarle el nombre con el que hoy la conocemos. La semilla de chía jugó un papel importante en la dieta de los mesoamericanos y tuvo un rol innegable como fuente de nutrimentos de alta calidad. Además, su uso medicinal fue fundamental en la época precolombina (4, 9).

La chía representó para Mayas y Aztecas una gran importancia pues fue utilizada no solo como alimento, sino además en la elaboración de pinturas, en la preparación de medicinas y también en el uso ceremonial como ofrenda (1, 3). Los variados y abundantes usos culinarios, medicinales, religiosos y artísticos tornaron al grano y su harina en uno de los productos más utilizados en el período de la conquista española, formando parte de los cuatro granos más consumidos en la dieta mesoamericana junto al maíz (*Zea mays*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) (10).

Luego de la conquista española, la producción de cultivos precolombinos, que eran ajenos para los conquistadores, colapsó, por lo que la mayoría de ellos pasaron a estar en desuso. También ocurrió un cambio en las preferencias alimentarias, adaptándose éstas a las costumbres europeas. Es así que la chía y otras especies habituales en el México precolombino fueron sustituidas por cereales introducidos por los conquistadores; el cultivo de las especies nativas decreció y en particular la chía quedó confinada en comunidades aisladas y con un grave peligro de extinción (4, 11). En México durante el período colonial el consumo de semillas de chía disminuyó significativamente y su uso quedó limitado a la elaboración de una bebida refrescante denominada "chía fresca", la cual se continúa consumiendo en la actualidad (2, 12).

1.2. Descripción morfológica

La chía es una planta herbácea anual, con una altura de 1 a 1,5 m, que presenta tallos ramificados de sección cuadrangular y huecos, con pubescencias cortas y blancas; hojas opuestas con bordes aserrados con una longitud de 80 a 100 mm y una latitud de 40 a 60 mm, con distintos grados de pubescencia, Figura 1 (izquierda). Las flores son hermafroditas, de color azul o blanco, Figura 1 (centro); y los frutos son indehiscentes (5) dispuestos en grupos de cuatro clusas monospermas ovales con una longitud de 1,5 a 2 mm y un diámetro de 1 a 1,2 mm, en su mayoría son de color pardo grisáceo con manchas irregulares de color castaño oscuro y en menor proporción blanquecinas, Figura 1 (derecha) (13). La domesticación y la selección humana de *S. hispanica* provocaron cambios en la morfología de la semilla de chía y la diversidad genética entre sus variedades se ha documentado ampliamente (14).



Figura 1. Izquierda, planta de chía (Fuente: Wikipedia commons); centro, inflorescencia de chía (Fuente: Wikipedia commons); derecha, semillas de chía (Fuente: propia)

1.3. Aspectos agronómicos

La chíá es definida como una planta autógena, la chíá silvestre presenta niveles de polinización cruzada más bajos que la cultivada; los responsables de la polinización cruzada son los insectos, cuando hay una presencia importante de abejas en el área de cultivo se obtienen rendimientos mayores (10). En particular, la propagación más utilizada en la chíá es mediante semillas (11).

En la latitud sur la siembra de chíá se realiza a fines del otoño (desde mayo hasta mediados de junio), para evitar las heladas. Un factor limitante en el establecimiento del cultivo es la profundidad a la que debe realizarse la siembra debido a la cantidad baja existente de reservas de semillas (15). A causa de su pequeño tamaño, se requiere poca profundidad de sembrado para que la plántula emerja exitosamente, siendo 10 mm suficientes para cubrirlas (16). La semilla necesita de humedad para poder germinar, pero una vez germinada y ya establecida, las plantas se desarrollan bien con cantidades de agua limitadas por ser una planta que requiere poca agua y que está adaptada a climas áridos y semiáridos (11). La chíá crece apropiadamente en suelos arenosos de textura media y con drenado adecuado; aunque no soportan los suelos anegados (17).

El período de crecimiento de la chíá está influido por la latitud a la que sea cultivada, por lo que el ciclo de cultivo ocurre entre 90 a 150 días (11). Se trata de una planta de día corto y sensible al fotoperíodo, presentando buena respuesta a floración en días cortos (18). El lugar del cultivo influye en la composición química de las semillas debido a factores ambientales como período de luz, temperatura, tipo de suelo y nutrimentos disponibles. El pH adecuado para el cultivo está entre 6,5 y 7,5 (11). La siembra es realizada en surcos con separación entre 0,7 a 0,8 m y una densidad de siembra de 6 kg de semillas por hectárea (19). El método de siembra utilizado y la densidad de siembra afectan el desarrollo y el rendimiento de la chíá. Cuanto mayor sea la densidad de siembra mayor será la biomasa y por ello el rendimiento del cultivo aumentará, siendo el valor de la densidad de siembra más adecuado mayor a 40.000 plantas por hectárea (20).

Las semillas de chíá presentan una tolerancia moderada al estrés salino; aunque al ser sometidas a una salinidad alta decrecen el porcentaje de germinación, la longitud de la raíz y el tamaño de las plantas, por lo que se aconseja evitar la utilización de fertilizantes clorados (21).

Aunque las hojas de las plantas de chíá tienen un interés comercial potencial debido a su composición, las semillas son la parte atractiva, fundamentalmente por los contenidos de proteína, fibra, antioxidantes y aceite (22). Normalmente, las semillas son muy estables a las condiciones de almacenamiento, ya que no son altamente higroscópicas (23).

Recientemente, Sandoval-Oliveros y Paredes-López (24) han reportado que la chíá podría ser considerada tanto como oleaginosa, debido a su elevado contenido de aceite, o como pseudocereal, considerando que las semillas se asemejan en función y composición a los cereales, pero a diferencia de éstos, se trata de una planta dicotiledónea libre de gluten. Pese a ser cultivos destinados a la producción de aceite, las oleaginosas poseen a su vez una importante fuente natural de proteínas con elevado valor nutricional (25).

1.4. Potencial nutricional y funcional de la chíá

Entre las especies de la familia Labiatae, la chíá se distingue por su alto potencial nutricional y terapéutico (4). La importancia de las semillas de chíá se debe a su elevado contenido de aceite (aproximadamente el 40 % del peso seco de la semilla), fibra (cerca del 30 % del peso seco de la semilla) y proteínas (entre 19 y 23 % del peso seco de la semilla) (26). A su vez, poseen un reconocido aporte de antioxidantes (22). Respecto al contenido de vitaminas, se demostró un elevado contenido de niacina, superior al aportado por las semillas de soja, maíz, cártamo y arroz mientras que el contenido de tiamina y riboflavina de las semillas de chíá es similar al aportado por otras oleaginosas. Respecto al contenido de minerales, los niveles de calcio, potasio, magnesio y fósforo se encuentran dentro de lo esperado para productos de origen vegetal. Las semillas de chíá contienen, además, trazas de boro, molibdeno, zinc y manganeso (26).

Actualmente, la chíá es considerada un alimento funcional debido a que no sólo contribuye a la nutrición, sino que además posee demostrada acción contra enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, desordenes nerviosos y diabetes (2). Según Martínez-Cruz y Paredes-López (27), podría incorporarse a la dieta humana como una fuente novedosa de isoflavonas, debido a su alta capacidad antioxidante.

1.5. Producción y mercado internacional

La comercialización de la chía comenzó internacionalmente a partir de la década de los noventa. Se ha estado cultivando en Argentina, México, Bolivia, Paraguay, Australia y recientemente se han incorporado como productores Nicaragua y países del sudeste de Asia (18). En 2011-2012 la producción en Argentina representó el 35 % de la producción mundial, mientras que Australia, Bolivia, Paraguay y México participaron con 15 % y 3.000 hectáreas cada uno (19).

En los últimos tiempos se ha incrementado su importancia comercial en México, Bolivia, Argentina, Ecuador y Guatemala. Ixtaina y col. reportaron que la semilla de chía era escasamente conocida por la población europea (1). Sin embargo, un año después fue reconocida por el Parlamento Europeo y Consejo Europeo como "novel food". Bajo esta denominación se incluye a aquellos alimentos que no se consumieron en cantidades significativas en la Unión Europea antes de mayo de 1997 (cuando entró en vigencia la primera normativa sobre nuevos alimentos); puede consistir en un producto innovador que acaba de desarrollarse o referirse a un alimento producido con tecnologías y procedimientos innovadores, así como un alimento que se consume tradicionalmente fuera de la Unión Europea (28).

El cultivo de chía tiene un potencial e importante mercado a nivel internacional. En Estados Unidos la elaboración de alimentos con chía está creciendo, en 2011 se incorporaron 21 productos nuevos a base de chía (por ejemplo jugos de fruta) y en 2012 esa cantidad aumentó a 100 productos (19). En los países de la Unión Europea ahora está aumentando el consumo de chía debido a la reciente autorización de su incorporación en alimentos elaborados y se supone que en un futuro cercano los países asiáticos también se incorporen a esa demanda, lo que la duplicaría a 40.000 toneladas por año (19).

Los canales de distribución en EE.UU participan tres grupos en las cadenas de comercialización, los importadores mayoristas, las empresas elaboradoras de alimentos y los distribuidores minoristas, para que finalmente llegue a los consumidores (19).

2. Aceite de chía

El principal interés por redescubrir las propiedades benéficas de la semilla de chía se centró, fundamentalmente, en su elevado contenido de aceite, el cual es una rica fuente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por su sigla en inglés) (29). Las semillas de chía contienen entre 32 a 38 % de un aceite altamente insaturado (30). Al igual que la mayor parte de los aceites vegetales, el aceite de chía se encuentra principalmente compuesto de triglicéridos y en una proporción muy baja por fosfolípidos, tocoferoles, esteroides y ceras (sustancias comúnmente agrupadas bajo el nombre de fracción insaponificable). El aceite de chía se caracteriza por su alta concentración de ácido linolénico (18:3, precursor de los ácidos grasos de la familia ω -3) y, en segundo lugar, de ácido linoleico (18:2, precursor de los ácidos grasos de la familia ω -6). La chía es la fuente vegetal que posee el mayor contenido de ácido α -linolénico reportado.

Los ácidos grasos saturados (principalmente ácido palmítico y ácido esteárico) no suelen sobrepasar el 12 %. En la Tabla 1 se muestran los rangos de variación del aceite de chía, para los ácidos grasos mayoritarios (30-31).

Tabla 1. Rangos de variación del aceite de chía, en función de los ácidos grasos mayoritarios expresados como porcentaje

Ácido Graso	Gunstone (2007)(30)	AOCS (2006)(31)
16:0	9-11	7-8
18:0	—	0-3
18:1	7-8	4-7
18:2	20-21	24-26
18:3	52-63	54-59

De acuerdo con la composición indicada en la Tabla 1, el contenido en ácidos grasos saturados del aceite de chía es inferior al porcentaje máximo reportados para los aceites de soja (20 %), maíz (22 %), maní (28 %) y girasol (16 %) y más similar a los contenidos máximos en los aceites de cártamo (12 %) y canola (12 %). Los ácidos grasos ω -3 y ω -6, son ácidos grasos esenciales para el ser humano debido a que no pueden ser biosintetizados en nuestro organismo por lo que tienen que ser obtenidos a través de la dieta (32). Debe existir una correcta relación entre la ingesta de ácidos grasos ω -3 y ω -6 (siendo la relación ω -6/ ω -3 ideal de 5:1 o

máximo 10:1), dado que compiten por las mismas enzimas en el metabolismo (33). Sin embargo, este valor de relación ideal está lejos en la dieta promedio debido al consumo excesivo de ácidos grasos ω -6 y ácidos grasos saturados. El ácido α -linolénico se puede transformar en el ácido eicosapentaenoico (20:5) vía desaturasas y elongasas y posteriormente en el ácido docosahexaenoico (22:6). A su vez, el ácido linoleico se puede transformar en uno de sus derivados más importantes, el ácido araquidónico (20:4). Estos ácidos grasos (20:4 ω 6, 20:5 ω 3 y 22:6 ω 3) son importantes componentes estructurales de los fosfolípidos de las membranas y son el sustrato para la formación de una serie de derivados lipídicos llamados eicosanoides (33). Por lo tanto, la utilización de semillas con aceites de alto contenido de ácido linolénico o del aceite mismo en alimentación es una herramienta interesante para aumentar el aporte de ácidos grasos ω -3 a la dieta. Como se observa en la Tabla 2, el aceite de chía presenta la menor relación ω -6/ ω -3 en comparación con otros aceites vegetales comunes. Por lo tanto, las semillas de chía constituyen una fuente prometedora de ácido α -linolénico.

Tabla 2. Relación ω -6/ ω -3 en el aceite de chía y otros aceites vegetales (30)

Aceite	ω -3	ω -6	ω -6/ ω -3
Chía	57	21	0,4
Canola	10	21	2,1
Soja	7	52	7,4
Girasol	0,5	58	116,0

Existe suficiente evidencia científica para afirmar que un incremento en el consumo de lípidos ricos en ácidos grasos ω -3 juega un rol importante en la reducción de las enfermedades coronarias (11). En relación a esto, un número creciente de investigaciones demuestran la importancia del consumo de aceite de chía en la salud y nutrición humana (11, 34-35). Gylling y Miettinen (36) reportaron que la ingesta de ácidos ω -3 redujo el colesterol total en un 5 % e incrementó el colesterol de alta densidad un 10 % en pacientes con enfermedades coronarias. Hu y col. (37) determinaron que los ω -3 pueden reducir las enfermedades cardíacas en pacientes diabéticos mediante la reducción de la frecuencia de arritmias y de los niveles de triacilglicéridos en la sangre. Asimismo, reportaron mejoras en el desorden bipolar neurológico. Otro beneficio registrado por la ingesta de ω -3 es que juegan un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central del neonato al brindar flexibilidad a las membranas celulares, lo que es esencial para que las proteínas de la membrana tengan la movilidad que requieren para llevar a cabo sus funciones específicas (38).

2.1. Diferentes posibilidades de extracción del aceite de chía

La definición de lípidos no se basa en una característica estructural, grupo funcional o estructura química identificable, sino en una propiedad química. En relación a esto, se define como lípido toda aquella sustancia que sea soluble en un solvente no-polar, con lo cual, existe una diversidad de compuestos que caen dentro de este grupo. Desarrollar un método de extracción cuantitativa de lípidos teniendo en cuenta su definición no nos resuelve el problema: si utilizamos un solvente apolar para extraer los lípidos de una matriz, los resultados que se obtienen pueden estar lejos de ser cuantitativos. Por ejemplo, se debe tener en cuenta la necesidad de incorporar un solvente polar que interrumpa las interacciones entre los lípidos de las membranas para poder, en una segunda instancia, disolverlos en el solvente no-polar. También, es necesaria la destrucción completa de la matriz, de manera de permitir el acceso de los solventes para poder efectuar la extracción de forma eficiente (39).

Por un lado, podemos encontrar métodos convencionales para la extracción del aceite de semillas, como el método de Soxhlet o el método de Folch (con sus variantes) o directamente el prensado de las semillas (con el cual se obtienen menores rendimientos). A nivel industrial la extracción se realiza con prensas de tornillo, para luego realizar en un segundo paso la extracción con solventes o directamente como proceso en sí. Hasta la década del 90 la extracción directa por prensado era muy poco utilizada a causa de su bajo rendimiento, en la actualidad, este proceso está adquiriendo nuevamente interés por razones medioambientales (40-41).

Actualmente, las prensas abiertas son usadas generalmente para la extracción del aceite de oliva; en cambio para las semillas oleaginosas, se utilizan principalmente las prensas de tornillo sinfín. En este

tipo de prensa se pueden conseguir presiones de hasta 3.000 bar produciendo temperaturas de hasta 170 °C. Existen varios parámetros que determinan el proceso de extracción por prensado como por ejemplo el contenido de humedad de la semilla, la capacidad de la prensa y la potencia aplicada. El aceite así obtenido por prensado debe ser purificado mediante el uso de separadores, filtros y decantadores, mientras que por otro lado, la torta o *expeller* debe ser disgregada mediante trituradores para el ulterior uso de la harina, tanto si se realiza un proceso de extracción con solventes o para procesarla como tal (40-41). Una variación del proceso de prensado convencional es el prensado en frío, en el cual la materia prima no es sometida a un calentamiento previo o durante la extracción, lo cual evita la degradación de una menor cantidad de compuestos fitoquímicos de interés, como por ejemplo algunos antioxidantes naturales, que son termolábiles. En este caso, la prensa usada generalmente es la de tornillo helicoidal, suministrando una presión de molienda a las semillas. Otra posibilidad de prensado es aplicar presión directamente sobre las semillas ubicadas en una cuba con orificios a los costados que permite que el aceite escurra (40, 42). Ambos métodos de prensado tienen bajo rendimiento de extracción. Sin embargo, en el prensado en frío los aceites conservan más compuestos antioxidantes en comparación con la extracción con solventes (43).

La extracción de aceite a partir de semillas oleaginosas con solventes, generalmente conocida como extracción sólido-líquido, es el método más utilizado a nivel industrial; en este procedimiento las semillas son previamente tratadas para lo cual son limpiadas, molidas y se realiza un tratamiento térmico para coagular proteínas e inactivar enzimas lipolíticas. Se realiza en un extractor y luego se somete a un proceso de desolventización (40). La extracción de aceite se realiza por lo general con hexano. Los extractores disponibles comercialmente funcionan por medio de dos métodos básicos: (1) el método de inmersión, donde el solvente es bombeado a través de las semillas pre-tratadas, de manera de asegurar que éstas queden totalmente sumergidas en el mismo y (2) el método de percolación, donde el solvente se dispersa desde la parte superior del lecho de semillas, a una velocidad limitada por la resistencia del lecho al flujo por gravedad del solvente.

Posteriormente, la obtención del aceite (logrando la eliminación del solvente) debería ser realizada a bajas temperaturas con el fin de proteger al mismo y maximizar el ahorro energético. Además, la calidad final del aceite obtenido puede estar influenciada por un excesivo tiempo de contacto en los intercambiadores de calor. Así que, es necesario alcanzar una solución de compromiso entre el tiempo de contacto y la temperatura, que son las variables a controlar en este proceso (40-41).

Si bien se obtienen buenos rendimientos con los métodos de extracción con solvente, éstos provocan pérdidas ligeras de antioxidantes, pero además se debe tener en cuenta la toxicidad e inflamabilidad que presenta el hexano (44) y los daños al medio ambiente que éste produce.

En la extracción realizada por el método de Soxhlet en semillas de chía se pueden observar diferencias en los resultados obtenidos. En el trabajo de Jiménez y col. (32) se obtuvo un contenido de aceite de 27,9 % cuando se realizó la extracción por Soxhlet, y se identificó como mayoritario al ácido linolénico (51,8 %). En cambio, en el trabajo de Segura-Campos y col. (45), a partir de semillas de chía de Yucatán (México), se obtuvo un contenido de lípidos de 35,1 % por Soxhlet, y se identificó como mayoritario al ácido linolénico con un valor de 68,5 %. La extracción por Soxhlet de semillas de chía en dos regiones diferentes de Brasil (Mato Grosso y Rio Grande do Sul), mostraron un contenido de lípidos de 30,2 % y 32,2 % respectivamente (46).

Si se compara la extracción por Soxhlet con la extracción por prensado, se puede observar en la Tabla 3 (40) que los valores de rendimiento varían en un rango de 24,3 a 33,6 %, siendo la extracción con solvente la que presenta un mayor porcentaje de recuperación. Sin embargo, la composición en ácidos grasos obtenida por ambas metodologías no presenta diferencias significativas. También, en el trabajo realizado por Ixtaina y col. (47), cuando compararon los compuestos fenólicos que se determinaron en los aceites obtenidos por prensado y por extracción por Soxhlet, en ambos aceites se encontraron en mayor cantidad son los ácidos clorogénicos y cafeico, seguidos de miricetina, quercetina y kaempferol. Sin embargo, el ácido clorogénico y los compuestos polifenólicos totales se encontraron en mayor cantidad en el aceite obtenido por prensado que en el extraído con solventes (47).

Tabla 3. Rangos de variación del aceite de chía en función del proceso de extracción(40)

	Soxhlet	Prensado
Rendimiento (%)	33,6	24,8
Ácido Graso		
16:0	6,2	6,6
18:0	3,0	3,1
18:1	5,3	5,4
18:2	19,7	20,3
18:3	65,6	64,5

La extracción con solventes orgánicos tradicionales es uno de los procesos más utilizados en la obtención de compuestos naturales de origen vegetal. Sin embargo, el interés cada vez más creciente de obtener productos más naturales, impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción menos contaminante y con el máximo rendimiento, ejecutables en un corto período de tiempo y con bajo costo. Además, es necesario obtener productos seguros para los consumidores, libres de sustancias o efectos transgresores que puedan poner el riesgo su salud o bienestar. En la actualidad, existen una serie de técnicas basadas en el uso de fluidos comprimidos que tienen en común una mayor eficiencia en comparación con los procesos convencionales realizados a presión atmosférica. Además, en ciertas condiciones, estas técnicas cumplen con los principios de la Química Verde (48). La extracción con líquidos presurizados y la extracción con fluidos supercríticos son dos técnicas alternativas cada vez con más empleo basadas en el uso de fluidos comprimidos, para obtener compuestos bioactivos de fuentes naturales.

El empleo de fluidos supercríticos para la extracción de compuestos bioactivos implica el uso de un fluido a presión y temperatura por encima de sus valores críticos. Una vez se sobrepasa el punto crítico, el fluido adquiere propiedades significativamente diferentes como solvente, las cuales son alteradas de forma importante al modificar su presión y temperatura. Esto permite tener una selectividad que puede ser ajustada hacia los compuestos de interés (49). Por tanto, los fluidos supercríticos presentan ciertas características útiles para ser usados como solventes de extracción. Se caracterizan por tener una viscosidad relativa baja y un coeficiente de difusión alto si se los compara con los solventes orgánicos convencionales, lo que favorece su desempeño como solvente para extracción. A su vez, la densidad y difusividad de estos fluidos se puede ajustar mediante variaciones de temperatura y de presión. Este hecho permite ajustar sus propiedades de selectividad frente a varios compuestos. En forma adicional, dado que el solvente supercrítico opera a altas presiones, la separación entre soluto y solvente se realiza en forma muy simple y eficiente por la simple descompresión del sistema (50).

En particular, el dióxido de carbono (CO₂) constituye un solvente muy adecuado para el procesamiento de productos naturales debido a las siguientes características:

- Temperatura crítica cercana a la ambiente (31,1 °C) que permite operar a temperaturas relativamente bajas, preservando así compuestos termolábiles y contribuyendo a la eficiencia energética de los procesos.
- Presión crítica relativamente baja en comparación con otros fluidos (7,39 MPa).
- Alta densidad crítica (486 kg/m³) que le otorga un buen poder solvente en condiciones leves de presión y temperatura.
- Es un gas en condiciones ambientales, permitiendo su completa evaporación y eliminación del producto final por simple despresurización.
- No es tóxico, reactivo ni inflamable, permitiendo condiciones de operación más seguras.
- Es compatible para su uso con productos alimenticios o farmacéuticos.
- Es un compuesto de bajo costo y amplia disponibilidad.
- Permite la reutilización del CO₂ generado en otros procesos industriales, cumpliendo así con algunos de los principios de la Química Verde.

Por estos motivos el CO₂ es el solvente más comúnmente usado en el área alimentaria y farmacéutica cuando se aplica tecnología supercrítica (51).

Por ejemplo, en el trabajo realizado por Uribe y col (52) se realizó la extracción con CO₂ supercrítico (SC-CO₂) de semillas de chía mexicanas a presiones de 136, 272 y 408 bar, y temperaturas de 40, 60 y 80 °C. Los resultados permiten concluir que, al aumentar la temperatura a presión constante, el rendimiento tiende a aumentar y este efecto es más pronunciado a las presiones más altas. De la misma manera, al aumentar la presión de extracción a temperatura constante, el rendimiento también aumenta. Este comportamiento se debe al incremento simultáneo de la densidad supercrítica de CO₂ y al incremento de la solubilidad del aceite con el aumento de la presión y la temperatura. También, se observa que el efecto de la presión sobre el aumento del rendimiento es mayor que el efecto de la temperatura. Respecto a la composición en ácidos grasos obtenida en las diferentes condiciones supercríticas no se observan diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Composición en ácidos grasos del aceite de chía obtenido en diferentes condiciones de extracción supercríticas (52)

Ácido Graso	40 °C 544 bar	60 °C 408 bar	60 °C 482 bar	60 °C 544 bar	80 °C 408 bar	80 °C 544 bar
16:0	7,12	7,96	7,32	7,52	8,03	7,16
18:0	3,09	3,62	3,81	3,24	4,09	4,06
18:1	6,28	6,87	7,28	6,70	7,06	6,97
18:2	17,51	17,67	18,15	18,07	17,59	17,7
18:3	66,00	63,88	63,45	64,47	62,23	64,44

La extracción con líquidos presurizados (PLE, por sus siglas en inglés) es una técnica que combina alta temperatura y presión con solventes líquidos para lograr una extracción rápida y eficiente. La alta temperatura aumenta la solubilidad de los compuestos extraíbles, interrumpiendo las interacciones matriz-solvente y promoviendo una alta tasa de difusión, mientras que la presión mantiene el solvente por debajo de su punto de ebullición y mantiene una alta densidad del fluido, contribuyendo así a la fuerza de elución. La viscosidad y la tensión superficial del solvente se reducen bajo las condiciones de presión y temperatura aplicadas, facilitando su penetración en la matriz favoreciendo la eliminación de los compuestos ubicados en los poros, reduciendo significativamente la cantidad de solvente requerido en el proceso. La calidad de los aceites extraídos por PLE en relación con la composición de los ácidos grasos, la actividad antioxidante y el contenido de compuestos bioactivos (como carotenoides, flavonoides y tocoferoles) fue similar o superior a la obtenida con la metodología de extracción Soxhlet. La PLE se ha estudiado aplicando solventes alternativos que se consideran menos agresivos para el medioambiente en comparación con los solventes tradicionales, y que resultaron ser eficientes en la extracción de la fracción lipídica y otros compuestos de interés (53).

En el trabajo reportado por Villanueva-Bermejo y col. (54) se realizó la extracción de aceite de semillas de chía por dos técnicas amigables con el medio ambiente, la extracción con fluidos supercríticos (SFE, por sus siglas en inglés) y con PLE. A 60 °C, utilizando etanol presurizado (de calidad alimentaria), se logró una recuperación cercana al 100 % en un corto tiempo de extracción (10 minutos). Al utilizar SFE, el mayor rendimiento de extracción de aceite (> 95%) se alcanzó en las condiciones de presión y temperatura más altas (45 MPa y 60 °C) después de 240 min. No se encontraron diferencias entre el perfil de ácidos grasos de los aceites extraídos tanto por PLE como por SFE. Las concentraciones de ácido linolénico y ácido linoleico oscilaron entre 65-68 % y 17-23 % respectivamente.

Finalmente, en el trabajo realizado por Knez Hrnčič y col. (55) se compararon diferentes tecnologías de extracción: extracción con fluidos subcríticos con n-propano y extracciones clásicas como Soxhlet y aplicando ultrasonidos (40 kHz), ambas con n-hexano. El uso de diferentes condiciones de extracción dio lugar a diferentes rendimientos de extracción, pero no afectó significativamente la composición de los extractos obtenidos en cada caso. En las extracciones subcríticas, cuando se trabajó con la mayor presión operativa (300 bar), y la mayor temperatura (60 °C), se obtuvo un mayor rendimiento de extracción, de 20,0 %. En la extracción por Soxhlet se alcanzó un rendimiento de 18,4 % y en la extracción asistida por ultrasonido se obtuvo un rendimiento de 16,7 %. Los resultados sugieren que la extracción subcrítica con n-propano, al igual que las extracciones con CO₂ supercrítico, son métodos potenciales para obtener un aceite de alta calidad a partir de las semillas de chía, dado que proporcionan un producto libre de residuos de solventes, y por lo tanto, adecuado para su uso posterior en alimentos, productos farmacéuticos, o industrias cosméticas.

La aplicación de ondas de ultrasonido en diversos alimentos y procesos tecnológicos es relativamente novedosa y está en desarrollo. Estas ondas son ondas mecánicas con una frecuencia más alta (más de 20 kHz) y se mueven en la superficie o en la solución con una velocidad determinada por las propiedades de la onda y del material a través del cual viajan. La extracción asistida por ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés) es una de las aplicaciones más prácticas y económicas de ultrasonido para procesos de extracción en la industria alimentaria. Las ondas de sonido que viajan en la materia van produciendo ciclos de expansión y compresión. La expansión separa las moléculas, mientras que la compresión las junta. Si el ultrasonido es lo suficientemente fuerte, el ciclo de expansión puede crear burbujas o cavidades en el líquido. El proceso por el cual las burbujas de vapor se forman, crecen y sufren un colapso implosivo se conoce como "cavitación". El impacto de líquido producido por cavitación en la superficie sólida es muy fuerte. Esto puede provocar daños en las zonas de impacto y así exponer una superficie altamente reactiva. El ultrasonido puede facilitar el hinchamiento y la hidratación del sólido, causando un agrandamiento en los poros de la pared celular. Esto mejorará el proceso de difusión y, por lo tanto, mejorará la transferencia de masa. En caso de componentes térmicamente inestables se debe controlar la temperatura. Por lo tanto, el ultrasonido puede reducir la dependencia de un solvente y permitir el uso de solventes alternativos, lo que puede proporcionar beneficios económicos, ambientales, de salud y seguridad (56).

Rosas-Mendoza y col. (56) evaluaron el efecto de la UAE en el rendimiento de aceite, así como en las características físico-químicas y químicas del aceite de semillas de chía. Utilizaron un baño ultrasónico a 40 kHz durante un proceso de extracción de 90 minutos. La UEA dio como resultado una intensificación de la extracción, con un rendimiento de aceite de 79,3 %, mientras que para la extracción por agitación en éter de petróleo fue 69,2 %, pero sin cambiar la composición de aceite obtenido.

2.2. Estabilidad del aceite de chía

Como se detalló anteriormente, el nivel de ácido linolénico (18:3) del aceite de chía es muy alto, lo cual le confiere una baja estabilidad oxidativa. La oxidación de los lípidos es una de las principales reacciones relacionadas con estos compuestos, y constituye a su vez la principal causa del deterioro de las grasas y los aceites. El mecanismo por el cual se produce la oxidación de los lípidos se conoce como "autooxidación", debido a su carácter autocatalítico. Este término incluye la adición de oxígeno molecular a los ácidos grasos poliinsaturados a través de un mecanismo de radicales libres. El proceso de autooxidación se inicia en los carbonos alílicos ("vecinos" a un doble enlace), siendo por lo tanto las posiciones bis-alílicas ("vecinas" a dos dobles enlaces) las más susceptibles de sufrir autooxidación. En los aceites vegetales tales posiciones están presentes en los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico (dobles enlaces en $\Delta 9$ y $\Delta 12$, y un carbono bis-alílico en la posición C-11) y el ácido linolénico (con dobles enlaces en $\Delta 9$, $\Delta 12$ y $\Delta 15$, y por lo tanto con dos carbonos bis-alílicos: C-11 y C-14). Se han establecido las velocidades relativas de oxidación de los tres ácidos grasos insaturados de 18 carbonos más comunes: 18:1, 18:2 y 18:3 que ilustran este fenómeno. Dichos estudios consideran como referencia al ácido oleico, al que se le asigna un factor igual a 1, correspondiendo factores de 10 y 21 para el ácido linoleico y el ácido linolénico respectivamente a 37 °C (30, 39, 41). Es por esto que el aceite de chía, dada su composición en ácidos grasos, es un aceite altamente susceptible a los procesos de oxidación.

Debido a que el aceite de chía es altamente susceptible a la oxidación, la encapsulación representa una alternativa tecnológica para conservar sus propiedades, tanto durante su procesamiento como durante su almacenamiento.

La encapsulación se define como el proceso en el cual pequeñas gotas del agente activo son rodeadas por el material pared, formando así una barrera contra factores ambientales, entre ellos humedad, luz y oxígeno, reduciendo así la posibilidad de deterioro (57). En la actualidad, el uso de la encapsulación no sólo se enfoca en la conservación de las propiedades funcionales del agente activo a encapsular (en este caso del aceite de chía), sino también en la búsqueda por mejorar su manejo al convertirlo en forma de polvo seco, el cual puede ser incorporado con mayor facilidad en otros productos. Además, la encapsulación ayuda al control de la digestión y adsorción de los PUFAs liberándolos en sitios específicos como el intestino delgado, donde posteriormente son adsorbidos y transportados a través del torrente sanguíneo (58).

En el afán por diseñar alimentos con características específicas deben considerarse las propiedades fisicoquímicas del agente activo y material pared a emplearse, la técnica de encapsulación a utilizarse, las condiciones de operación en las que se producirán los encapsulados; aunado a esto se ha encontrado que la estructura de los encapsulados juega un papel importante en el cumplimiento de los parámetros establecidos (59). Si bien la encapsulación incrementa la vida de anaquel de los PUFAs a través de agentes encapsulantes como proteínas de suero de leche, celulosas, gelatina, gomas provenientes de plantas, almidones modificados, entre otros (60); la selección adecuada del material de pared dependerá de su capacidad para estabilizar y proteger el aceite de su degradación durante su procesamiento y almacenamiento (61). Es importante mencionar que una de las técnicas más utilizadas en la encapsulación de agentes activos es el secado por aspersión, seguido por la coacervación (62). En las siguientes secciones se abordarán las características de las dos técnicas de encapsulación más empleadas hoy en día.

2.3. Encapsulación de aceite de chía por secado por aspersión

El secado por aspersión es el método de encapsulación más utilizado en la industria alimenticia. Este proceso consiste en cinco etapas básicas: preparación de la mezcla de materiales pared, elaboración de la pre-emulsión, formación de la emulsión (homogeneización), atomización de la alimentación dentro de la cámara de secado y deshidratación de la gota asperjada (63). Para llevar a cabo la optimización de este proceso, deben considerarse al menos cuatro criterios: propiedades de los materiales pared, características del agente activo, propiedades de la alimentación y condiciones de operación del secador, tales como velocidad del flujo de aire, humedad del aire de entrada al secador, temperatura de entrada y salida del secador, velocidad de alimentación, entre otras (64).

Para la encapsulación de ácidos grasos los materiales pared a utilizarse deben poseer propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, como las que presentan los almidones modificados, gomas, proteínas de suero de leche y de soja. Sin embargo, pueden emplearse combinaciones de materiales como la mezcla entre carbohidratos y proteínas. Carneiro y col. (65) evaluaron diferentes combinaciones de maltodextrina con diferentes materiales de pared (almidón, proteína de suero de leche y goma arábiga) para la encapsulación de aceite de linaza mediante secado por aspersión encontrando que la mezcla de maltodextrina con almidones modificados resultó en la mayor eficiencia de encapsulación en comparación con lo obtenido al utilizar goma arábiga y proteína de suero de leche. Por otra parte, la mayor protección contra las reacciones de oxidación se obtuvo al aplicar la mezcla maltodextrina - proteína de suero de leche.

Un factor que influye sobre la eficiencia de encapsulación es el tipo de homogeneización aplicado durante la formación de la emulsión. Las gotas de aceite más pequeñas logran quedar atrapadas de manera más eficiente que las gotas más grandes, lo que resulta en mayor eficiencia de encapsulación. Jafari y col. (66) reportaron que la microfluidización genera emulsiones con tamaño de gotas de aceite más pequeño (0,21 μm), resultando en eficiencias de encapsulación altas, producto del bajo contenido de aceite superficial en los encapsulados, comparado con otros métodos de encapsulación como: ultrasonificación y rotor-estator (2,2 y 4,6 μm , respectivamente). Algunos estudios realizados sobre la encapsulación de aceite de chía a través del secado por aspersión se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Encapsulación del aceite de chía mediante secado por aspersión

Materiales pared	Condiciones de operación	Resultados	Ref.
Mezcla de APS y MD (30 % de sólidos). Relación aceite:material de pared 1:4	Homogeneización por rotor-estator 15500 rpm, por 5 min. Microfluidización 104 MPa por dos ciclos. Secador por aspersión escala planta piloto, presión de atomización 60, 100 y 140 kPa. Te 180°C y Ts 80 °C	El tipo de homogeneización y presión de atomización influye en el desarrollo estructural y propiedades funcionales de los microencapsulados. La microfluidización generó partículas rugosas (Rq ~ 15 nm) y porosas, con bajo contenido de aceite superficial y mayor capacidad de adsorción de agua en comparación con la homogeneización rotor-estator (Rq ~ 34 nm). Las partículas microfluidizadas presentan menor capacidad de disolución y propiedades de flujo limitadas.	(59)

Tabla 5. Encapsulación del aceite de chía mediante secado por aspersión (cont.)

Materiales pared	Condiciones de operación	Resultados	Ref.
Mezcla de CPS y GM (30 % de sólidos). Relación aceite:material pared (1:3)	Homogeneización a 6400 rpm (Ultra-Turrax T50) durante 10 min. Secado por aspersión escala planta piloto. Te 135°C y Ts 80 °C	La encapsulación brindó protección contra reacciones de oxidación del aceite, al presentar menor índice de peróxidos que el aceite de chía crudo almacenado bajo las mismas condiciones. Los encapsulados fueron más estables a 0,614 y 0,654 de a_w , punto correspondiente a la mínima entropía integral.	(67)
Mezcla CPS-PEC con MD o AM	Secador a escala lab. Ts 88 °C	MD formar emulsiones estables sin separación de fases con la mezcla CPS-PEC. El AM estabilizó las emulsiones con el CPS, contrario a la emulsión con la mezcla de CPS-PEC donde se presentó separación de fases. Las mezclas CPS-AM y CPS-PEC-MD originaron eficiencias de encapsulación altas >99 %.	(68)
Mezcla de CS (10g/100g de emulsión) y LAC (10g/100g de emulsión). Aceite de chía (10g/100g de emulsión)	Homogeneización alta presión 400 y 600 bar. Secador por aspersión a escala lab. Te/Ts 135/70 °C y 170/90 °C.	Eficiencias de encapsulación > 90 %. A 400 bar, índice de peróxidos < 10 meq/kg de aceite después de 100 días de almacenamiento a 20 ± 2 °C y HR 33 %. A 600 bar, índice de peróxidos > 10 meq/kg de aceite después de 100 días de almacenamiento.	(69)
Mezcla de MD (6 %) e HMC (3 %). Relación material pared: aceite 2:1	Homogeneización con dispersor (Ultraturax) T18, por 10 min. Secador por aspersión escala lab. Te 163 °C	Índice de peróxidos del aceite de chía > micro-encapsulados de aceite de chía 14,2 y 214 meq O ₂ /kg de aceite, respectivamente, después de 90 días de almacenamiento. La mezcla de materiales pared no fue efectiva para proteger al aceite.	(70)
Mezcla de CPS-GM y CPS-GA. Aceite: Material de pared 1:2 y 1:3	Sólidos totales 30 y 40 % w/w. Agitación a 6400 rpm (Ultraturax) por 10 min. Secador por aspersión escala planta piloto. Te 135 °C, Ts 80 °C	Presentó mayor eficiencia de encapsulación a mayor contenido de sólidos totales (40 %) y menor relación aceite-material de pared (1:3). Ambos tipos de mezcla poliméricas formaron emulsiones estables sin coalescencia de las gotas.	(35)

Abreviaturas: APS: Aislado de proteína de soja, MD: Maltodextrina, CS: Caseinato de sodio, LAC: lactosa, HMC: hidroximetilcelulosa, CPS: concentrado de proteína de suero, GM: Goma de mezquite, GA: goma Arábiga, PEC: pectina, AM: almidón modificado, Ts: Temperatura de salida del aire de secado, Te: Temperatura de entrada del aire de secado.

2.4. Encapsulación de aceite de chía por coacervación

El término coacervación hace referencia a la separación de fases inducida a través de cambios en el pH, fuerza iónica, temperatura o solubilidad del medio. La coacervación puede ser aplicada para encapsular compuestos hidrofóbicos o hidrofílicos. Esta técnica se clasifica en simple o compleja. En el caso de la coacervación simple, únicamente se utiliza un polímero, mientras que la coacervación compleja involucra la interacción de dos coloides con cargas opuestas (71). Los polímeros usualmente empleados en la coacervación simple son gelatina, quitosano, alginato, glucano y derivados de celulosas; mientras que en la coacervación compleja la mezclas empleadas son gelatina-goma arábiga, gelatina-carboximetilcelulosa, alginato-quitosano, albúmina-goma arábiga y glucanos-derivados de celulosa, en este caso la formación de la coraza de cápsula se da principalmente por cambios en el pH (72).

La encapsulación con alginato-calcio es el sistema de coacervación simple comúnmente aplicado, donde la capacidad gelificante del alginato se activa con la presencia de cationes bivalentes, como el calcio. En el caso de la coacervación compleja, el agente activo (por ejemplo, un aceite) es homogeneizado con una solución acuosa que contiene uno de los polímeros a emplearse. Posteriormente, se elabora una solución con el segundo biopolímero, esta nueva solución es depositada a la emulsión formada previamente y se ajusta el pH hasta el punto isoeléctrico de cualquiera de los polímeros empleados, permitiendo que los polímeros ahora cargados con cargas opuestas interactúen y se depositen alrededor del agente activo (73).

La morfología de las cápsulas obtenidas mediante este método puede ser mononuclear (una sola gota del agente activo rodeada por una capa de material pared) o polinuclear (varias gotas de agente activo embebidas dentro del material pared). En cuanto a la forma y tamaño de las cápsulas, éstas dependerán de las características del polímero utilizado como: peso molecular, densidad de carga, concentración empleada, así como de parámetros de proceso como: método para producir la dispersión/grado de homogeneización, pH, temperatura y fuerza iónica (74).

Kralovec y col. (75) mencionan que la coacervación genera altas eficiencias de encapsulación ya que posee la capacidad de sellar de manera eficaz al agente activo dentro de la cápsula provocando un bajo contenido de agente activo en la superficie de las partículas. Las desventajas de técnica de encapsulación es que es un proceso tipo lote y se requiere de tiempo adicional para que la formación de la red polimérica que componen la coraza cubra la superficie de la partícula completamente (76). Algunos estudios realizados sobre la encapsulación por coacervación empleando productos derivados de la semilla de chía se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Encapsulación del aceite de chía por coacervación

Material pared	Condiciones de operación	Resultados	Ref.
APC y GC	pH 2,1 – 2,9. Diferentes concentraciones de APC y GC	El pH óptimo encontrado fue a 2,7 con una relación proteína – goma 6:1. Los encapsulados presentaron superficies lisas, estables térmicamente y brindan protección contra el paso del oxígeno, por lo que se pueden aplicar en la industria de los alimentos o farmacéutica.	(77)
APC y GC	Relación agente activo-material pared 2:1, 1:1 y 1:2. pH 2,7	La mezcla de materiales pared produjo alta eficiencia de encapsulación (93,9 %), al presentar bajo contenido de aceite en la superficie de las partículas, comparado con los resultados obtenidos al utilizar los materiales de manera individual. La mezcla de polímeros brindó estabilidad oxidativa al aceite de chía, con índice de peróxidos de <10 meq O ₂ /kg de aceite, después de 30 días de almacenamiento.	(78)
HPMC/CHPMC/C MC-Na (0,7/0,3)	Diferentes concentraciones de DSS (0, 0,35 y 1 %)	La emulsión formada por HPMC/CMC-Na fue más estable utilizando una concentración de DSS de 0,35 %. Las propiedades de la pared de las cápsulas variaron respecto a la concentración de DSS aplicada.	(79)

Abreviaciones: APC: Aislado de proteína de semilla de chía, GC: goma de semilla de chía, HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa, CMC-Na: Carboximetilcelulosa de sodio, DSS: Dodecilsulfato de sodio.

3. Mucílago de chía

La fibra alimentaria se define como aquellas partes de plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, con fermentación parcial o total en el intestino grueso. Se las clasifica en dos categorías, de acuerdo a su solubilidad en agua: la fibra alimentaria insoluble, que incluye a la celulosa, parte de la hemicelulosa y lignina; y la fibra alimentaria soluble, dentro de la que se encuentran a los pentosanos, pectina, gomas y mucílagos (80). La fibra alimentaria soluble de la semilla de chía se remueve parcialmente cuando ésta se encuentra en contacto con el agua, resultando en un mucílago gelatinoso que permanece unido a la capa externa del grano.

El primer intento de reconocer las posibles aplicaciones del mucílago de chía en la industria alimentaria puede atribuirse al trabajo publicado por Whistler (81). Posteriormente, en 1996, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura lo describió como una potencial fuente de goma, de acuerdo a sus apropiadas propiedades mucilaginosas, incluso en baja concentración en soluciones acuosas (82). Se trata de un heteropolisacárido aniónico, particularmente, un xiloglucano de elevado peso molecular (entre 800 y 2.000 kDa), con relación xilosa/glucosa de 2:1 (83). Una estructura tentativa fue publicada por Lin y col. (84) y consiste en la repetición ordenada de un tetrasacárido compuesto por una cadena principal de unidades (1→4)-β-xilopiranos-(1→4)-glucopiranos-(1→4)β-xilopiranos, ramificada en la posición O-2 de algunos residuos de β-D-xilopiranos con residuos de 4-O-metil-α-D-glucoronopiranos. Los monosacáridos α-D-xilosa, α-D-glucosa y ácido 4-O-glucurónico fueron obtenidos por hidrólisis ácida en proporción 2:1:1, respectivamente.

Actualmente, un número creciente de investigaciones evidencian su importancia en la industria alimentaria, debido fundamentalmente a su elevada solubilidad en agua (50 g/L) y a sus propiedades espesantes (82, 85-87).

4. Proteínas de chía

Las proteínas mayoritarias de las semillas vegetales son las proteínas de reserva y abarcan entre el 60 y el 80 % del contenido proteico total (88). Se las denomina así debido a que son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla con el objetivo de emplearse posteriormente durante la germinación como fuente de nitrógeno necesario para la biosíntesis (89-90).

Las proteínas de las semillas han sido clasificadas por Osborne (91) según su diferente solubilidad en solventes acuosos o no acuosos. De acuerdo a esta clasificación, las albúminas son aquellas proteínas solubles en agua. Las globulinas son solubles en soluciones salinas diluidas. Se ha reportado que las semillas comestibles contienen, principalmente, dos grupos de globulinas que difieren en su tamaño. El primer grupo incluye aquellas cuyo coeficiente de sedimentación es cercano a 11S; y son denominadas como proteínas "tipo leguminas" o 11S globulinas". Por otro lado, se encuentran las que poseen coeficiente de sedimentación cercano a 7S, y son clasificadas como proteínas "tipo vicilinas" o 7S globulinas". Por otra parte, las prolaminas son solubles en alcohol y las glutelinas son las más difíciles de solubilizar, empleándose para ello soluciones levemente ácidas, básicas o incluso detergentes (92).

Basados en esta clasificación, Sandoval-Oliveros & Paredes-López (24), han aislado y caracterizado recientemente las fracciones proteicas de la semilla de chía, obteniendo globulinas como fracción mayoritaria (52,0 ± 1,0 %P/P), siendo lo habitual para las plantas dicotiledóneas (93). Por otro lado, Olivos-Lugo y col. (94) han reportado que las fracciones mayoritarias de las proteínas de chía son las prolaminas y glutelinas (53,8 %P/P y 23 %P/P, respectivamente). Esta diferencia podría atribuirse, en parte, a las distintas metodologías aplicadas para la obtención de la harina desgrasada de partida. No sólo la proporción de cada fracción resultó diferente, sino que reportaron un 12,3 %P/P de proteína insoluble, significativamente superior al hallado por Sandoval-Oliveros & Paredes-López (24).

Las semillas de chía poseen un elevado contenido proteico (entre 19 y 23 %); mayor al aportado por las semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), amaranto (*Amaranthus cruentus*) y quinoa (*Chenopodium quinoa*) (1-2). La Tabla 1 muestra el contenido proteico de las semillas de chía, en relación a otras fuentes vegetales.

Este pseudocereal posee, sin embargo, menor contenido proteico que ciertas leguminosas, como la soja (*Glycine max*), el poroto (*Phaseolus vulgaris*) y la lenteja (*Lens culinaris*) (36,1; 23,6 y 26,1 % de proteína, respectivamente) (95-96).

Tabla 7. Comparación del contenido proteico de diferentes fuentes vegetales

Grano	Clasificación	Contenido proteico (%)	Ref.
Chía	Pseudocereal	19-23	(24)
Trigo	Cereal	13,5-14,5	
Cebada	Cereal	10-14,9	(97)
Maíz	Cereal	10,6-13,6	
Quinoa	Pseudocereal	12,1-14,5	
Amaranto	Pseudocereal	13,4-16,5	(95)
Trigo sarraceno	Pseudocereal	12,0-18,9	

Las proteínas de las semillas de chía poseen los nueve aminoácidos esenciales, con elevado contenido de los aminoácidos glutámico, aspártico y arginina. El elevado contenido de glutámico de esta fuente alimentaria resulta interesante debido a que este aminoácido contribuye al sistema inmunológico e incrementa el rendimiento deportivo. A su vez, fuentes proteicas ricas en arginina resultan adecuadas para la prevención de enfermedades cardíacas. Sin embargo, su perfil de aminoácidos presenta deficiencias con respecto a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud para niños de edad pre-escolar, con lo cual, en este caso, no puede considerarse apropiada como única fuente proteica

debido al escaso contenido del aminoácido lisina (94). La Figura 2 muestra la composición de aminoácidos de la harina desgrasada de chía.

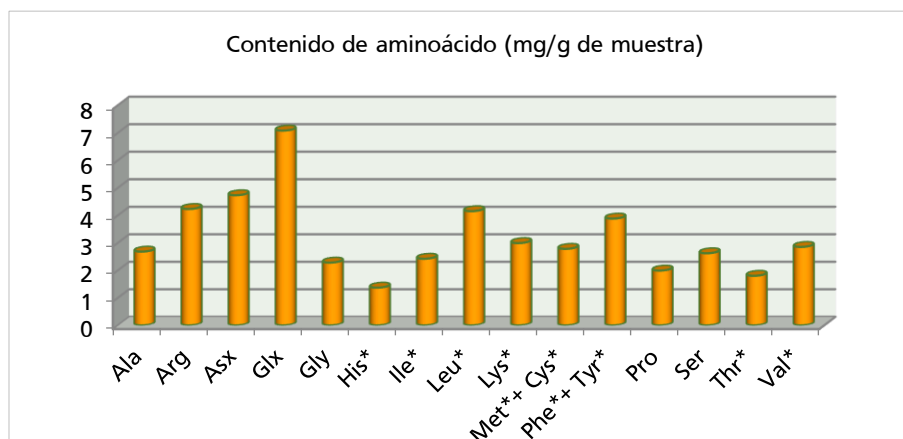


Figura 2. Composición de aminoácidos en la harina desgrasada de chía. Los aminoácidos esenciales se identifican con un asterisco. Datos extraídos de referencia (24)

La precipitación isoelectrica es el método más comúnmente empleado para extraer proteínas de fuentes vegetales. El procedimiento consiste, principalmente, en la solubilización de las proteínas en pH levemente alcalino (generalmente entre pH 8 y 11) seguido de su precipitación isoelectrica en una solución de ácido diluido (pH cercano a 4,5). Esta metodología fue aplicada recientemente para la obtención de aislados de chía (24, 78). En ambos casos, se ajustó el pH de solubilización en 12, y la precipitación fue realizada a pH 3.

Por otro lado, Vázquez-Ovando y col. (98) realizaron el fraccionamiento en seco de la harina desgrasada de chía, obteniendo dos fracciones, una constituida mayoritariamente por fibra y la otra, rica en proteínas.

En nuestro grupo de trabajo evaluamos el rendimiento del proceso ensayando tres pH de extracción alcalina (pH 8, 10 y 12) y dos pH de precipitación (3,0 y 4,5) y se encontró que cuando la extracción se realizaba a pH 8 o la precipitación a pH 3 el rendimiento era demasiado bajo. Por lo tanto, se seleccionaron dos condiciones de aislamiento de las proteínas de chía, dependiendo del pH extracción (pH 10 o pH 12) y en ambos casos la precipitación se realizó a pH 4,5 (99-100). El rendimiento del proceso de aislamiento resultó mayor cuando la extracción se realizó a pH 12 (17 %) que cuando se realizó a pH 10 (13 %), sin embargo, la muestra obtenida a pH 10 (denominada APC10) presentó un contenido proteico levemente mayor que la muestra obtenida a pH 12 (denominada APC12), siendo en ambos casos la pureza cercana al 78 %. Si bien tanto el perfil proteico obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes como el potencial electrocinético (-54mV) de suspensiones acuosas de ambas muestras resultó similar, se encontraron diferencias en cuanto a las propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de ambas muestras proteicas (99-100). Las muestras liofilizadas presentaron diferencias significativas en cuanto al color, siendo APC12 más oscuro (menor L*) y más amarillento (mayor b*). Mediante calorimetría diferencial de barrido se determinó que APC10 es más estable térmicamente que APC12 lo cual puede relacionarse con el mayor contenido de estructura secundaria ordenada (hélices alfa y láminas beta) que poseen las proteínas en APC10, determinado por espectroscopía infrarroja y de dicroísmo circular. Las dispersiones acuosas de ambas muestras presentaron distribuciones de tamaños unimodales y el diámetro promedio en superficie de las partículas resultó mayor para APC12 lo que indica un mayor grado de agregación proteica debido a una mayor exposición de grupos hidrofóbicos. Las diferencias estructurales en las proteínas se vieron reflejadas en sus propiedades funcionales: la capacidad de absorción de agua de APC12 resultó mayor que para APC10, mientras que ocurrió lo contrario con la capacidad de absorción de aceite; ambas muestras presentaron capacidad de formar geles térmicos, aunque muy laxos y APC10 resultó más apropiada para estabilizar emulsiones. Si bien resulta necesario profundizar el estudio de las propiedades funcionales de las proteínas de chía, los resultados obtenidos hasta el momento parecen

indicar que las mismas podrían ser muy apropiadas en la industria alimentaria, particularmente como aditivo en productos cárnicos.

4.1. Hidrolizados de proteínas de chía

El consumo de las semillas de chía provee numerosos beneficios para la salud y constituye una fuente potencial de péptidos bioactivos. La hidrólisis enzimática es un proceso natural y seguro para la producción de péptidos bioactivos de numerosas fuentes proteicas (101). Recientemente, Segura-Campos y col. (102) han obtenido hidrolizados proteicos de chía empleando un complejo de endo y exopeptidasas comerciales (Alcalase y Flavourzyme), ensayando su incorporación en productos alimentarios. Este trabajo evidencia que los hidrolizados de proteínas de chía con actividad biológica incrementada podrían constituir un ingrediente funcional efectivo en una gran variedad de alimentos (102).

Por otra parte, se ha reportado la producción de péptidos de chía con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (103), la cual juega un rol fundamental en la regulación de la presión arterial. Si bien los péptidos obtenidos a partir de proteínas alimentarias no serían tan potentes como las drogas sintéticas, podrían reducir los efectos tóxicos que éstas ocasionan.

5. Conclusiones

El aceite proveniente de las semillas de chía es una excelente alternativa como fuente de ácidos grasos poli-insaturados ω -3 y ω -6, ya que está compuesto principalmente por ácido linoleico y linolénico. Estos componentes son a su vez promotores de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga como el ácido eicosapentanoico (C20-5 ω -3), ácido docosahexanoico (C22-6 ω -3) y ácido araquidónico (C20-4 ω -6) generadores de leucotrienos, prostanglandinas y tromboxanos, los cuales intervienen en diversas funciones del cuerpo humano. El único inconveniente que presenta este aceite es que es altamente susceptible a reacciones de oxidación generando compuestos tóxicos y sabores indeseables que afectan su aceptación por parte del consumidor. El secado por aspersión y coacervación son buenas técnicas de encapsulación que brindan protección al aceite de chía, ya que como se ha comprobado ambas técnicas incrementan su estabilidad durante almacenamiento, además de generar altas eficiencias de encapsulación, lo que significa que el aceite se encuentra atrapado en el interior de las cápsulas. De acuerdo con los estudios encontrados, es necesario realizar investigaciones sobre las aplicaciones del aceite encapsulado para la generación de productos enriquecidos con ω -3 y ω -6, asimismo, es necesario evaluar la liberación de estos componentes dentro del organismo, para tener el máximo aprovechamiento de estos componentes esenciales y entender su mecanismo de liberación.

Las proteínas de las semillas de chía poseen los nueve aminoácidos esenciales, con elevado contenido de los aminoácidos glutámico, aspártico y arginina. El elevado contenido de glutámico de esta fuente alimentaria resulta interesante debido a que este aminoácido contribuye al sistema inmunológico e incrementa el rendimiento deportivo. A su vez, fuentes proteicas ricas en arginina resultan adecuadas para la prevención de enfermedades cardíacas. Sin embargo, no puede considerarse apropiada como única fuente proteica debido al escaso contenido del aminoácido lisina. Las propiedades funcionales de las proteínas de chía podrían ser muy apropiadas en la industria alimentaria, particularmente como aditivo en productos cárnicos.

El consumo de las semillas de chía provee numerosos beneficios para la salud y constituye una fuente potencial de péptidos bioactivos y los hidrolizados de proteínas de chía con actividad biológica incrementada podrían constituir un ingrediente funcional efectivo en una gran variedad de alimentos.

Un número creciente de investigaciones evidencian la importancia en la industria alimentaria del mucílago de la chía, debido fundamentalmente a su elevada solubilidad en agua y a sus propiedades espesantes.

Referencias

1. Ixtaina, V.Y., Nolasco, S., & Tomás, M. (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 28, 286-293.

2. Muñoz, L., Cobos, A., Díaz, O., & Aguilera, J. (2013). Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. *Food Reviews International*, 29, 394 - 408.
3. Hernández Gómez, J.A., & Miranda Colín, S. (2008). Caracterización morfológica de chíá (*Salvia hispanica*), *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31 (2), 105-113.
4. Xingú López, A., González Huerta, A., Torrez, C., Sangerman-Jarquín, D.M., Orozco de Rosas, G., & Rubí Arriaga M. (2017). Chíá (*Salvia hispanica* L.) situación actual y tendencias futuras. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8, 1619-1631.
5. Capitani, M.I., Nolasco, S.M., & Tomás, M.C. (2013). Effect of mucilage extraction on the functional properties of Chia meals. In: *Food Industry*, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53171>
6. Beltran-Orozco, M., & Romero, M. (2003). La chia, alimento milenario. *Industria alimentaria*, 25 (5), 20-29.
7. Ramamoorthy, T.P. (2001) *Salvia hispanica* L. In Flora fanerogámica del Valle de México. En: Calderón, G. D. R. y R., J. (ed.), *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. (p. 632-644). Pátzcuaro, Michoacán. Instituto de Ecología.
8. FAO/WHO. (2016) Report joint FAO/WHO food standards programme. In: *Codex alimentarius commission*, (p. 80), Italy.
9. Cahill, J.P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L.(Lamiaceae). *Economic Botany*, 57, 604-618.
10. Cahill, J.P. (2004). Genetic diversity among varieties of chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 773-781.
11. Coates, W., & Ayerza, R. (2006). *Chía redescubriendo un olvidado alimento de los Aztecas*. Buenos Aires. Del Nuevo Extremo.
12. Valdivia-López, M.A., & Tecante, A. (2015) Chia (*Salvia hispanica*): a review of native mexican seed and its nutritional and functional properties. In: *Advances in food and nutrition research*, (p. 53-75) Elsevier.
13. Di Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., & Severin, C. (2012). Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L.(Lamiaceae), *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11.
14. Cahill, J., & Ehdai, B. (2005). Variation and heritability of seed mass in chia (*Salvia hispanica* L.), *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 201-207.
15. Migliavacca, R., Benetoli, T., Vasconcelos, A., Filho, W., & Baptistella, J. (2014) O cultivo da chia no brasil: futuro e perspectivas, *Journal of Agronomic Sciences*, 3, 161-179.
16. Villegas Rojas, D.B.E. (2013). *Efecto de la aplicación de herbicidas sobre el rendimiento en Chíá (Salvia hispanica L.) en la región Metropolitana*. Memoria para optar al Título profesional de Ingeniera Agrónoma. Universidad de Chile.
17. Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial crops and products*, 34, 1366-1371.
18. Jamboonsri, W., Phillips, T.D., Geneve, R., Cahill, J., & Hildebrand, D. (2011). Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L.—a new ω 3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 171-178.
19. Busilacchi, H., Qüesta, T., & Zuliani, S. (2015). La chíá como una nueva alternativa productiva para la región pampeana. *Agromensajes de la Facultad*, (41), 37-42.
20. Yeboah, S., Danquah, E.O., Lamptey, J., Mochiah, M., Lamptey, S., Oteng-Darko, P., Adama, I., Appiah-Kubi, Z., & Agyeman, K. (2014). Influence of Planting Methods and Density on Performance of Chia (*Salvia hispanica*) and its Suitability as an Oilseed Plant. *Agricultural Science*, 2, 14-26.
21. Dal'Maso, E.G., Casarin, J., Costa, P., Cavalheiro, D.B., Santos, B., & Guimarães, V.F. (2013). Salinidade na germinação e desenvolvimento inicial de sementes de chia. *Cascavel*, 6, 26-39.
22. Taga, M.S., Miller, E., & Pratt, D.E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 928-931.
23. Moreira, R., Chenlo, F., Prieto, D., & Torres, M.D. (2010). Water Adsorption Isotherms of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1077-1082.
24. Sandoval-Oliveros, M.R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 1, 193-201 .
25. Rodrigues, I.M., Coelho, J., & Carvalho, M. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109, 337-346.

26. Bushway, A.A., Belyea, P.R., & Bushway, R. (1981). Chia Seed as a Source of Oil, Polysaccharide, and Protein. *Journal of Food Science*, *46*, 1349-1350.
27. Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, *1346*, 43-48.
28. Commission E. (2009). Authorizing the placing on the market of chia seed (*Salvia hispanica*) as novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council, *Official Journal of the EU*, 7645.
29. da Silva Marineli, R., Moraes, É., Lenquiste, S.A., Godoy, A.T., Eberlin, M.N., & Maróstica, M. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *Lwt - Food Science and Technology*, *59*, 1304-1310.
30. Gunstone, F., & Harwood, J. (2007). Occurrence and characterization of oils and fats. *The lipid handbook*, *3*, 37-141.
31. Firestone, D. (2013) *Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes*, Vol. 3. Champaign, IL. AOCS press.
32. Jiménez, P., Masson, L., & Quitral, V. (2013) Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista chilena de nutrición*, *40*, 155-160.
33. Valenzuela, B., Tapia, O., & Gonzalez, E. (2011). Omega-3 fatty acids (EPA and DHA) and its application in diverse clinical situations. *Revista Chilena de Nutrición*, *38*, 356-367.
34. Espada, C.E., Berra, M.A., Martinez, M.J., Eynard, A.R., & Pasqualini, M. E. (2007). Effect of Chia oil (*Salvia hispanica*) rich in omega-3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, *77*(1), 21–28.
35. Rodea-González, D.A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M., Vernon-Carter, E.J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, *111*, 102-109.
36. Gylling, H., & Miettinen, T. (2001). A review of clinical trials in dietary interventions to decrease the incidence of coronary artery disease. *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine*, *2*, 123 - 128.
37. Hu, F., Cho, E., Rexrode, K., Albert, C., & Manson, J. (2003). Fish and Long-Chain ω -3 Fatty Acid Intake and Risk of Coronary Heart Disease and Total Mortality in Diabetic Women. *Circulation: Journal of the American Heart Association*, *107*, 1852-1857.
38. Helland, I.B., Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O., & Drevon, C. (2003). Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics*, *111* 1, e39-44 .
39. Bailey, A.E. (2001) *Aceites y grasas industriales*. Barcelona. Reverté,
40. Ixtaina, V.Y. (2010) *Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia hispánica L.) obtenido mediante distintos procesos: aplicación en tecnología de alimentos*. Facultad de Ciencias Exactas.
41. Bockisch, M. (1998) Extraction of vegetable oils. In: *Fats and oils handbook*. Elsevier.
42. Parker, T., Adams, D., Zhou, K., Harris, M., & Yu, L. (2003). Fatty Acid Composition and Oxidative Stability of Cold-pressed Edible Seed Oils. *Journal of Food Science*, *68*, 1240-1243.
43. Mohd Ali, N.M., Yeap, S., Ho, W., Beh, B.K., Tan, S.W., & Tan, S.G. (2012). The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
44. Dabrowski, G., Konopka, I., & Czaplicki, S. (2018). Supercritical CO₂ extraction in chia oils production: impact of process duration and co-solvent addition. *Food Science and Biotechnology*, *27*, 677 - 686.
45. Segura-Campos, M., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2014). Physicochemical characterization of chia (*Salvia hispanica*) seed oil from Yucatán, México. *Agricultural sciences*, *5*, 220-226.
46. da Silva, B.P., Anunciação, P.C., Matyelka, J.C., Lucia, C.M., Martino, H.S., & Pinheiro-Sant'Ana, H.M. (2017). Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food chemistry*, *221*, 1709-1716 .
47. Ixtaina, V.Y., Martínez, M.L., Spotorno, V.G., Mateo, C., Maestri, D., Diehl, B., Nolasco, S., & Tomás, M. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*, 166-174.
48. Ibanez, E. & Cifuentes, A. (2017) *Green extraction techniques: principles, advances and applications*, Vol. 76, Elsevier.
49. Del Valle, J.M., Rogalinski, T., Zetzl, C., & Brunner, G. (2005). Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water. *Food Research International*, *38*, 203-213.

50. del Valle, J.M., Fuente, J.D., & Cardarelli, D. (2005). Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America. *Journal of Food Engineering*, *67*, 35-57.
51. Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J., & Ibáñez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, *43*, 67-83.
52. Uribe, J.A., Perez, J., Kaul, H.C., Rubio, G.R., & Alcocer, C.G. (2011). Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, *56*, 174-178.
53. de Mello, B., Iwassa, I., Cuco, R.P., Garcia, V.S., & Silva, C. (2019). Methyl acetate as solvent in pressurized liquid extraction of crambe seed oil. *Journal of Supercritical Fluids*, *145*, 66-73.
54. Villanueva-Bermejo, D., Calvo, M.V., Castro-Gómez, P., Fornari, T., & Fontecha, J. (2019). Production of omega 3-rich oils from underutilized chia seeds. Comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods. *Food research international*, *115*, 400-407.
55. Hrnčič, M.K., Cör, D., & Knez, Z. (2018). Subcritical extraction of oil from black and white chia seeds with n-propane and comparison with conventional techniques. *Journal of Supercritical Fluids*, *140*, 182-187.
56. Rosas-Mendoza, M.E., Coria-Hernández, J., Meléndez-Pérez, R., & Arjona-Román, J.L. (2018). Characteristics of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Oil Extracted by Ultrasound Assistance. *Revista de la Sociedad Química de México*, *61*, 326-335.
57. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, *40*, 1107-1121.
58. Augustin, M., & Sanguansri, L. (2012) Challenges in developing delivery systems for food additives, nutraceuticals and dietary supplements. In: *Encapsulation technologies & delivery systems for food ingredients and nutraceuticals* (p. 19-48), Elsevier.
59. Pereyra-Castro, S.C., Alamilla-Beltrán, L., Villalobos-Castillejos, F., Porras-Saavedra, J., Pérez-Pérez, V., Gutiérrez-López, G., & Jiménez-Aparicio, A. (2018). Microfluidization and atomization pressure during microencapsulation process: Microstructure, hygroscopicity, dissolution and flow properties. *Lwt - Food Science and Technology*, *96*, 378-385.
60. Ahn, J., Kim, Y., Seo, E., Choi, Y., & Kim, H. (2008). Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering*, *84*, 327-334.
61. Quispe-Condori, S., Saldaña, M.D., & Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *Lwt - Food Science and Technology*, *44*, 1880-1887.
62. Nedovic, V., Kaluševi, A., Manojlovi, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia food science*, *1*, 1806-1815.
63. Shahidi, F., & Han, X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *33*, 501-547.
64. Keshani, S., Daud, W.R., Nourouzi, M., Namvar, F., & Ghasemi, M. (2015). Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *Journal of Food Engineering*, *146*, 152-162.
65. Carneiro, H.C., Tonon, R., Grosso, C., & Hubinger, M. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, *115*, 443-451.
66. Jafari, S., Assadpoor, E., Bhandari, B., & He, Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, *41*, 172-183.
67. Escalona-García, L.A., Pedroza-Islas, R., Natividad, R., Rodríguez-Huezo, M.E., Carrillo-Navas, H., & Pérez-Alonso, C. (2016). Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein concentrate-polysaccharide matrix. *Journal of Food Engineering*, *175*, 93-103.
68. Noello, C., Carvalho, A.G., Silva, V.M., & Hubinger, M. (2016). Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition. *Food research international*, *89 Pt 1*, 549-557
69. Ixtaina, V.Y., Julio, L.M., Wagner, J., Nolasco, S., & Tomás, M. (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Powder Technology*, *271*, 26-34.
70. Martínez, M.L., Curti, M., Rocchia, P., Llabot, J., Penci, M.C., Bodoira, R., & Ribotta, P. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, *270*, 271-277.
71. Wu, K., & Xiao, Q. (2005). Microencapsulation of Fish Oil by Simple Coacervation of Hydroxypropyl Methylcellulose. *Chinese Journal of Chemistry*, *23*, 1569-1572.

72. Livney, Y.D. (2008) Complexes and conjugates of biopolymers for delivery of bioactive ingredients via food, In: *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals* (p. 234-250). Elsevier.
73. Mishra, M. (2015) *Handbook of encapsulation and controlled release*. CRC press.
74. Weinbreck, F., Vries, R.D., Schrooyen, P., & Kruif, C.G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, *4*, 293-303.
75. Kralovec, J., Zhang, S., Zhang, W., & Barrow, C. (2012). A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, *131*, 639-644.
76. Zhang, W., Yan, C., May, J., & Barrow, C. (2009). Whey protein and gum arabic encapsulated Omega-3 lipids. The effect of material properties on coacervation. *Agro Food Industry Hi-tech*, *20*, 20-23.
77. Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Barrow, C.J., & Adhikari, B. (2016). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *International journal of biological macromolecules*, *91*, 347-357.
78. Timilsena, Y.P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, *52*, 554-563.
79. Sovilj, V., Milanovi, J.L., Katona, J., & Petrovi, L. (2010). Preparation of microcapsules containing different contents of different kinds of oils by a segregative coacervation method and their characterization. *Journal of The Serbian Chemical Society*, *75*, 615-627.
80. Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A., Napolitano, A., Vitale, D., & Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International*, *38*, 1167-1173.
81. Whistler, R.L. (2008). Industrial gums from plants: Guar and chia. *Economic Botany*, *36*, 195-202.
82. Muñoz, L., Aguilera, J., Rodríguez-Turiénzo, L., Cobos, A., & Díaz, O. (2012). Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, *111*, 511-518.
83. Muñoz, L., Cobos, A., Díaz, O., & Aguilera, J. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, *108*, 216-224.
84. Lin, K., Daniel, J.R., & Whistler, R. (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polymers*, *23*, 13-18.
85. Capitani, M.I., Corzo-Ríos, L.J., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Nolasco, S., & Tomás, M. (2015). Rheological properties of aqueous dispersions of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage. *Journal of Food Engineering*, *149*, 70-77.
86. Dick, M., Costa, T., Gomaa, A.I., Subirade, M., Rios, A., & Flôres, S.H. (2015). Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate polymers*, *130*, 198-205 .
87. Muñoz Hernández, L. (2012). *Mucilage from chia seeds (Salvia hispanica): microestructure, physico-chemical characterization and applications in food industry*. Tesis (doctoral). Pontificia Universidad Católica de Chile.
88. López, D.N., Galante, M., Robson, M.A., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International journal of biological macromolecules*, *109*, 152-159 .
89. Derbyshire, E., Wright, D., & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, *15*, 3-24.
90. Norton, G. (2013) *Plant Proteins: Easter School in Agricultural Science*. Butterworth-Heinemann.
91. Osborne, T.B. (1916) *The vegetable proteins*. Longmans, Green and Company.
92. Shewry, P.R. (1995) Plant storage proteins. *Biological Reviews*, *70*, 375-426.
93. González-Pérez, S., & Arellano, J.B. (2009) Vegetable protein isolates, In: Phillips, G. O., and Williams, P. A. (eds). *Handbook of Hydrocolloids*. 2nd ed. (p. 383-419). Woodhead Publishing.
94. Olivos-Lugo, B.L., Valdivia-López, M.A., & Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional*, *16* (1), 89–96.
95. Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, A. S., Torres, D., & Castanheira, I. (2016). Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food chemistry*, *193*, 55–61.
96. Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N., & Khan, M.S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, *97*, 331-335.

97. Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Weisz, M., & Trakhtenberg, S. (2002). Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*, 886-891.
98. Vázquez-Ovando, J., Rosado-Rubio, J., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2010) Dry processing of chía (*Salvia hispanica* L.) flour: chemical characterization of fiber and protein, *CyTA-Journal of Food*, *8*, 117-127.
99. López, D.N., Ingrassia, R., Busti, P., Wagner, J., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Effects of extraction pH of chia protein isolates on functional properties. *Lwt - Food Science and Technology*, *97*, 523-529.
100. López, D.N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J., Wagner, J., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Lwt-Food Science and Technology*, *90*, 396-402.
101. López, D.N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food research international*, *116*, 419-429 .
102. Segura-Campos, M., Salazar-Vega, I., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *Lwt - Food Science and Technology*, *50*, 723-731.
103. Segura Campos, M.R., Peralta González, F., Guerrero, L.I., & Ancona, D.A. (2013). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (*Salvia hispanica*) Produced by Enzymatic Hydrolysis. *International journal of food science*, 158482-158482.

Capítulo 9

Revalorización de la quinua y sus aplicaciones en la industria

María Paula López-Fernández^{1,3}, Verónica María Busch^{2,4}, María del Pilar Buera^{2,4}

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Argentina

²Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias. Argentina

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad de Buenos Aires. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental (IBBEA). Argentina

⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad de Buenos Aires. Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Argentina

Resumen

La quinua (*Chenopodium quinua* Willd.) es un pseudocereal de la región andina muy apreciado por su valor nutritivo, y por su capacidad de adaptación a condiciones adversas de clima y suelo. Los gránulos de almidón del germoplasma nativo de quinua del Noroeste Argentino son altamente diversos y aún no se encuentran caracterizados. A partir del perisperma de diferentes genotipos de quinua se aisló almidón a través de un tratamiento alcalino. El almidón de quinua mostró una temperatura de inicio de gelatinización entre 58- 69 °C y una retrogradación a los 7 días entre 25,6 - 24,7 % (evaluados por DSC). El análisis reológico, o curvas de pastificación mostraron que el almidón de quinua posee menor viscosidad de pico que el almidón de maíz, menor temperatura de gelatinización, y menores valores de consistencia (*breakdown*) y de asentamiento (*setback*). Entre ambos genotipos de quinua se observaron diferencias significativas, por ejemplo, los genotipos provenientes de Valles secos mostraron mayor temperatura de gelatinización y mejor estabilidad térmica a diferencia de los genotipos de altiplano. Las particulares características del almidón de quinua: bajo contenido de amilosa, gránulo de almidón pequeño de 0,5 a 2 μm , gran estabilidad térmica y baja tendencia a la retrogradación además de las diferencias especiales entre sus genotipos, lo convierten en un potencial ingrediente o aditivo de propiedades únicas para ser aplicado tanto en la industria alimenticia como en la textil, cosmética, farmacéutica u otras.

Palabras clave: quinoa, almidón, genotipos, gránulo, pasting

1. Introducción

La quinua (*Chenopodium quinua* Willd.) es un pseudocereal de la región andina de Sudamérica, bien adaptado a condiciones ambientales extremas respecto a la altura sobre el nivel del mar, cantidad de precipitaciones anuales, salinidad del suelo y temperaturas bajo 0 °C. Es también un cultivo importante en otras partes del mundo por su alto valor nutritivo (1).

El grano de quinua ha tomado especial relevancia e interés en la industria debido a su alto valor nutricional, carácter microgranular e hipoalergénico y a su gran adaptabilidad en suelos poco fértiles. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo con el fin de aumentar su valor agregado como ingrediente en la formulación de productos alimentarios y no alimentarios (2).

En Argentina la quinua se cultiva en el Noroeste en ambientes contrastantes formando cuatro grupos genéticos: de altiplano, valles secos, valles húmedos y un ambiente de transición entre estos últimos. Si bien estos grupos se relacionan con ambientes climáticamente semejantes en Bolivia, Perú, Chile, Ecuador y Colombia e indicarían una continuidad geográfico-ambiental en la distribución de estos grupos, no se detecta influencia sobre el germoplasma local (3). El germoplasma nativo de quinua del NOA es altamente diverso a nivel fenotípico reflejando la variación en el ambiente de origen. Los genotipos de quinua de la región del NOA presentan amplia variabilidad genética (3, 4). Frente a la posibilidad de que la quinua vuelva a ser un cultivo de importancia para agricultores del NOA, se plantea la necesidad de generar conocimiento para su preservación, utilización y revalorización.

Las áreas de reserva en las semillas de quinua son: un gran perisperma central, un embrión periférico y el endosperma reducido a un cono micropilar que cubre la radícula del embrión y está constituido por 1-2 dos capas de células de espesor (Figura 1). En la semilla madura, el perisperma presenta, células de paredes delgadas, uniformes, y muertas llenas de gránulos de almidón; a su vez el endosperma y el embrión están constituidos por células vivas, las cuales almacenan proteínas, lípidos y minerales (5,6). El perisperma de quinua, es comparable al endosperma amiláceo de las semillas maduras de los cereales (7,8).

En general, existe una amplia variedad entre las diferentes especies en lo que respecta al almidón de reserva de las semillas siendo la estructura, composición, propiedades, características morfológicas del gránulo, presencia de gránulos simples o compuestos, variable en las diferentes especies (9). Asimismo, entre genotipos de una misma especie, como por ejemplo el maíz y también el trigo, se han detectado variaciones significativas en alguna de las características antes mencionadas (10). La variación genética entre especies o genotipos generalmente resulta en diferencias considerables en las propiedades nutricionales y tecnológicas del almidón (11,12).

El almidón es un biopolímero renovable, no tóxico y se usa ampliamente en la industria alimenticia y no alimenticia, debido a su bajo costo y gran disponibilidad, y a su vez también se utiliza para fabricar otros materiales biodegradables. El almidón de reserva muestra una considerable variación botánica respecto de sus características y composición entre los géneros de la familia Poaceae (13, 14, 9). También en cereales como el maíz y arroz, las propiedades específicas del almidón en cada genotipo afectan características como textura, volumen, consistencia, y humedad conduciendo a diferencias en las propiedades nutricionales e industriales del almidón (9,15, 16).

El almidón es el principal compuesto de almacenamiento en el grano de quinua, representando el 65–70 % del peso seco final. En Bolivia se encuentran genotipos adaptados a las condiciones agroecológicas de los valles interandinos, del altiplano, de las yungas y de los salares. La quinua se cultiva principalmente en el Altiplano Sur (salar), donde gran parte de su producción es destinada a la exportación. Un ejemplo es la Quinua Real la cual posee un gran tamaño y es comercialmente muy valiosa (17). En Chile el cultivo de la quinua se realiza en el centro y sur con genotipos adaptados a la costa o de nivel del mar y en el norte del territorio se encuentran los genotipos adaptados a los salares (18).

En la Argentina, aún se trata de un cultivo incipiente y de autoconsumo, cuyo manejo se realiza manualmente y con escasa tecnificación. La caracterización de genotipos de quinua provee una fuente de nuevos almidones naturales y permite la selección de propiedades del almidón para cada proceso o producto.

Por otro lado, la potencial reducción o insuficiencia de alimentos a nivel mundial y la actual demanda de recursos energéticos alternativos, hace que el uso de las plantas como una fuente de bioenergía, y el desarrollo y utilización de los cultivos regionales para satisfacer estas demandas sean prioritarios.

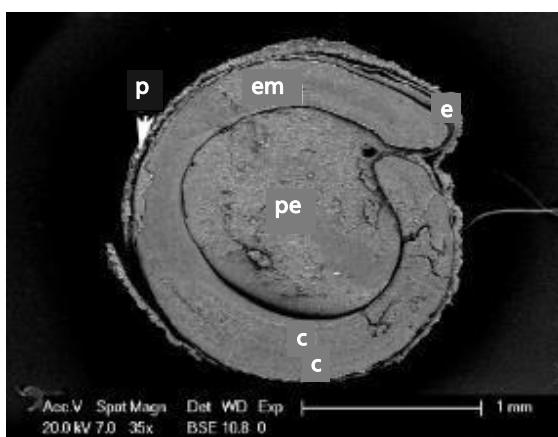


Figura 1. Sección longitudinal medial de la semilla de quinua que muestra el pericarpio (p), el embrión (e), los cotiledones (c), el endosperma (e) (solo en la región micropilar), y perisperma (pe)

2. Aislamiento de almidón

El aislamiento consiste en la separación del almidón de lípidos, proteínas y restos celulares. Durante este proceso es importante evitar el daño mecánico de los gránulos con el fin de no afectar su composición química ni propiedades físicas.

Diversas técnicas de extracción de almidón de quinua han sido analizadas como el tratamiento en agua o en soluciones alcalinas a diferentes concentraciones de NaOH, seguido por molienda y filtrado de los granos (19, 20). El mayor rendimiento (44,5 %) se obtuvo siguiendo el protocolo de Jan *et al.* (2017) (19) con menores modificaciones. Inicialmente se molieron los granos durante 10 min en un molino arrocero, se produjo el perlado del grano y se logró separar la mayor parte del pericarpio y el embrión del perisperma (este último contiene los gránulos de almidón de reserva). La Figura 2 muestra el protocolo de aislamiento de almidón utilizado para los genotipos nativos.

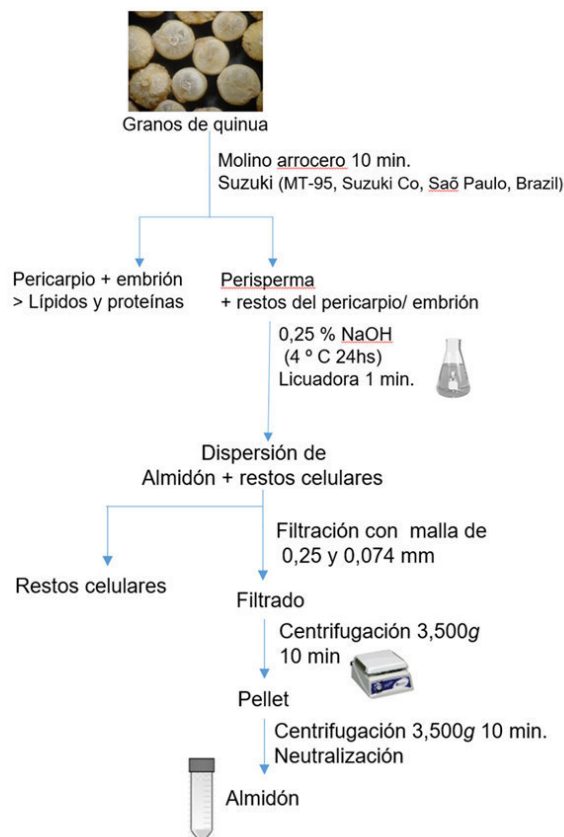


Figura 2. Diagrama de extracción del almidón de quinua

3. Propiedades fisicoquímicas y térmicas del almidón de quinua del NOA

El almidón, se compone de moléculas de glucosa unidas a través de dos enlaces diferentes formando la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de glucosas unidas por enlaces (α 1 \rightarrow 4), a su vez la amilopectina está formada también por enlaces (α 1 \rightarrow 4), pero con ramificaciones formadas mediante un enlace (α 1 \rightarrow 6) cada 24-30 residuos (21).

La proporción amilosa: amilopectina determina la apariencia, estructura y calidad de los productos amiláceos y su procesamiento. El contenido de amilosa influencia/determina la gelificación, firmeza, sinéresis, turbidez y la estabilidad al congelamiento y descongelamiento del almidón (16) mientras que la amilopectina es la principal responsable de la formación de cristales y del espesamiento de la pasta y

está relacionada con el poder de hinchamiento del gránulo (22, 23). El contenido de amilosa varía dependiendo su origen botánico, se ve afectado por condiciones climáticas y del suelo durante el desarrollo del grano (16) y es un factor clave que afecta las propiedades funcionales del almidón y sus productos derivados (24).

El contenido de amilosa obtenido para los grupos de genotipos provenientes del altiplano y valles secos fue del rango de 7,2 a 10,1 %. Según Fuentes *et al.* (2019) (25) la quinua Real, proveniente de Bolivia, presenta mayor contenido de amilosa.

La capacidad de retención de agua obtenida fue de 81- 90.4 % siendo menor que la del almidón de maíz (117%) (26, 27, 28). El patrón de rayos X del almidón de quinua es tipo A similar a lo reportado para los almidones presentes en cereales (29). Los gránulos de quinua poseen un tamaño pequeño entre 0,5 a 2 μm , en comparación con otros cereales comerciales por ejemplo los gránulos de maíz (Figura 3).

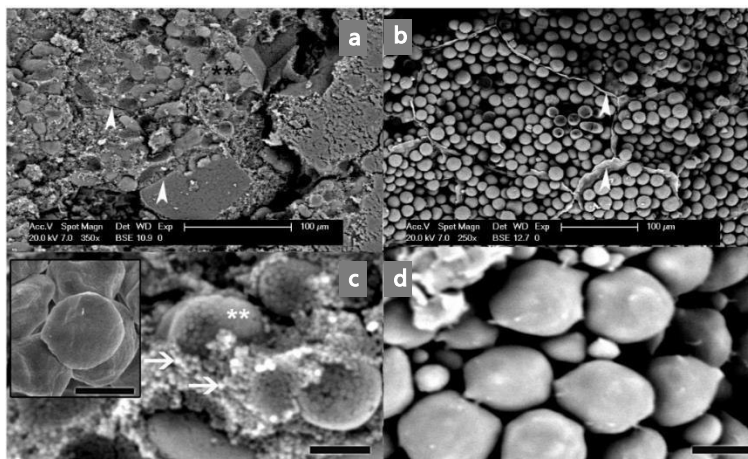


Figura 3. Sección longitudinal del a) perisperma de quinua y b) endosperma de maíz, c) y d) detalle de gránulos de almidón de quinua y maíz respectivamente. C y d escala 10 μm . Inset C escala 1 μm . Punta de flecha señala las paredes celulares, flecha señala los gránulos simples de almidón, ** marca los gránulos de almidón de quinua agrupados

Las propiedades de gelatinización están relacionadas con el tamaño, estructura cristalina y ultraestructura del grano. La variación en las propiedades térmicas de ambos grupos de genotipos se analizó mediante DSC. El rango de las temperaturas de inicio (t_0) y pico (t_p) observado fue de 58- 69 $^{\circ}\text{C}$ y de 64,2- 75,1 $^{\circ}\text{C}$ respectivamente. A su vez la entalpia de gelatinización registrada fue de 9,8 -12,2 J/g. La diversidad del comportamiento de gelatinización puede deberse a las diferencias en el contenido de amilosa, o a la presencia de otros componentes, como lípidos y proteínas en diferentes proporciones.

La retrogradación del almidón ocurre durante el almacenamiento de los alimentos amiláceos y se ha definido como el proceso que ocurre cuando las cadenas moleculares en los almidones gelatinizados comienzan a re asociarse en una estructura ordenada (9). Durante la retrogradación, la amilosa forma asociaciones de doble hélice 40-70 unidades de glucosa (30), mientras que la cristalización de la amilopectina se produce por la re-asociación de las ramas cortas más externas (31, 9).

El porcentaje de retrogradación de los genotipos de quinua obtenido fue de 25,5y 24,7%, para los genotipos de valles secos y altiplano respectivamente siendo más baja que lo reportado para maíz ceroso (11). Aunque tanto la amilosa como la amilopectina son capaces de retrogradar, el componente de la amilopectina parece ser más responsable de los cambios de calidad a largo plazo en los alimentos (31). Li y Zhu (2017b) (32) reportaron que la estructura interna de la amilopectina, en quinua, presenta altas cantidades de cadenas cortas.

El retraso o la inhibición de la retrogradación del almidón son de especial interés y un desafío, para controlar las propiedades funcionales del almidón y de esta manera para controlar el procesamiento de alimentos y sus aplicaciones industriales (33). El almidón de quinua posee una inusual estabilidad de congelamiento y descongelamiento relacionados estos últimos con la estabilidad y baja tendencia a la retrogradación (34).

Tabla 1. Temperaturas de transición térmicas para los diferentes genotipos de quinua y maíz

Genotipos	ΔH_g (J/g)	T_i (°C)	T_p (°C)	DR 7 (%)	Amilosa%
Altiplano NOA	10,6 ± 0.9	62,5	74,3	24,7	8,3 ^a
Valles Secos	10,3 ± 0.2	65,4	72,0	25,5	8,8 ^a
Altiplano sur Bolivia	11,4 ± 0.3	51.9	59.2	ND	12
Maíz Normal*	13,1	61,7	69,1	75	22,4
Maíz ceroso *	12,6	62.3	69,3	39,5	2,8

* Valores reportados en Lindeboom *et al.*, 2005 (11) y Fuentes *et al.*, 2019(25). Los valores son medias ± SD. T_i , Temperatura inicial; T_p , temperatura pico; H, entalpía de gelatinización; DR7 (%), porcentaje de retrogradación a los 7 días de almacenamiento a 4 °C.

4. Propiedades reológicas y de pastificación

Al calentar con agua el almidón se produce el hinchamiento de los gránulos, aumento de tamaño, produciéndose la pérdida de la cristalinidad y la gelatinización del almidón. Al enfriarse las moléculas se pueden reorganizar y alinearse. Estos fenómenos se ven reflejados en la viscosidad del sistema y se pueden evaluar mediante un análisis de las propiedades de pasificación o formación de pasta (*pasting properties*). Este análisis estudia la variación de la viscosidad de un sistema que es sometido a un tratamiento térmico través de tres etapas i) una rampa de calentamiento, ii) una etapa constante donde se mantiene la temperatura a 90 °C y iii) una rampa de enfriamiento. La curva de pastificación permite evaluar: temperatura de gelatinización, viscosidad de pico o máxima, viscosidad en caliente (90 °C) y en frío (50 °C), además de otros parámetros como asentamiento (*setback*) y consistencia (*breakdown*).

La Figura 4 muestra las curvas de pastificación de los dos grupos de genotipos de quinua: provenientes del altiplano y provenientes de los valles secos, y la curva de uno de los ingredientes más utilizados en la industria alimentaria como espesante y modificador textura de maíz comercial.

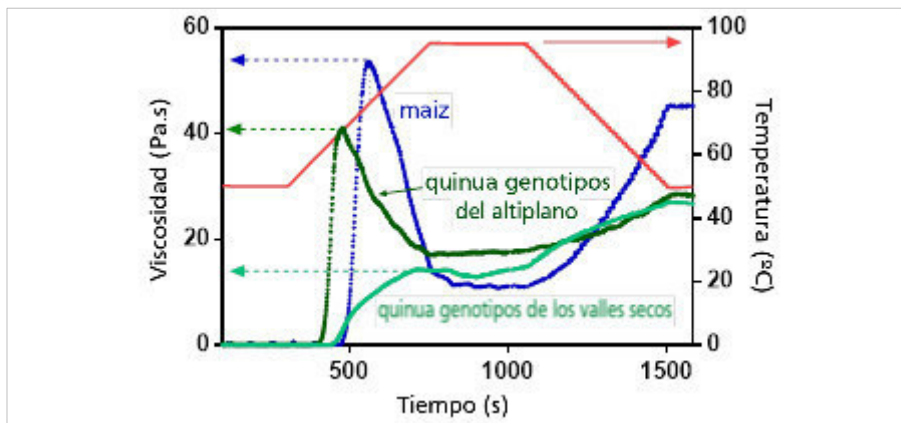


Figura 4. Propiedades de pastificación de almidón de quinua genotipo Valles secos (verde claro, redondo), genotipo Altiplano (verde oscuro, triángulos) y almidón de maíz (azul, rombos). La línea continua roja muestra la rampa de temperatura (eje Y derecho). Las flechas punteadas indican la viscosidad de pico de cada sistema (Pa.s)

Se puede observar que el almidón de maíz comercial posee la máxima viscosidad de pico (53±5 Pa.s, es la máxima viscosidad alcanzada, señalada por la flecha punteada) que ambos genotipos de quinua. Además el genotipo altiplano (40±6 Pa.s) posee mayor viscosidad de pico que los genotipos de valle secos (14±1 Pa.s) estudiados. Algunos autores relacionan este parámetro con la capacidad de ligar agua y de hinchamiento, el contenido de amilosa, y el largo de las cadenas de las ramificaciones en la amilopectina (35, 36). La viscosidad de pico determina y se relaciona con el poder viscosante (el cual también depende de la concentración) y con la aplicación como agente espesante y modificador de textura que tiene un almidón. Es importante destacar que no siempre es deseada una alta viscosidad, ya que puede generar problemas de homogeneización, mezclado y transporte. Una característica que puede desearse es la estabilidad de la viscosidad a través de los cambios de temperatura. En este último caso sería útil un almidón como el de quinua genotipos de Valles secos como se puede observar en la curva de pastificación, la gran estabilidad de la viscosidad (entre 14 y 27 Pa.s) durante todo el

análisis. Por otro lado, el almidón de quinua genotipo altiplano muestra menor temperatura de gelatinización que el extraído del genotipo de valles secos. Una menor temperatura de gelatinización puede ser deseada para un producto con ingredientes termolábiles que se ven degradados o afectados en su calidad por el calentamiento a altas temperaturas.

El almidón de quinua de los genotipos estudiados muestra menor valor de consistencia o *breakdown* comparando con el almidón de maíz. Este parámetro es la diferencia entre la máxima viscosidad (viscosidad de pico) y la viscosidad en caliente (la observada luego del proceso térmico a 90 °C y tiempo de análisis 1050 segundos). Valores bajos de *breakdown* están relacionados con la gran estabilidad térmica y resistencia a la deformación (37).

El almidón de quinua de ambos genotipos tiene menor variación, entre la viscosidad en caliente y en frío (parámetro asentamiento o *setback*) en comparación con el almidón de maíz comercial. Muchos autores relacionan bajos valores de *setback* con una baja tendencia a la retrogradación a corto plazo, integridad del gránulo y al contenido bajo de amilosa (23, 38). Srichuwong y col. (2017) (35) relacionaron la baja tendencia a la retrogradación del almidón de quinua con la presencia de otros componentes como la fibra soluble.

El almidón de quinua además de ser diferente al de otras especies como el maíz, mostró diferencias significativas en las propiedades de pastificación entre las distintas regiones ecogeográficas. Por ejemplo, el genotipo proveniente de valles secos tiene menores valores de *breakdown* (0 ± 2 Pa.s) que el genotipo de altiplano (23 ± 4 Pa.s) indicando una mayor estabilidad. Otros autores también observaron diferencias en las características nutricionales y fisicoquímicas de almidón de quinua de diferentes genotipos de ecorregiones geográficas de Chile (39). Kim and Wiesenborn (1996) (40) relacionaron el bajo valor de *setback* del almidón de un genotipo de papa con su gran calidad para preparar fideos para sopa (tipo comida china).

5. Aplicaciones

La particularidad de las características fisicoquímicas del almidón de quinua puede ser aprovechada en el diseño de productos y para solucionar necesidades particulares de proceso, de calidad y de conservación. En los próximos párrafos citaremos algunos ejemplos de las características fisicoquímicas especiales del almidón de quinua y como se relacionan con sus posibles aplicaciones.

El gránulo de almidón es más pequeño que el de arroz y que el de cebada, pudiendo comparárselo con el de amaranto. Su tamaño pequeño permite que sea utilizado para: producir texturas cremosas que exhiben propiedades similares a las grasas (27), para incorporarse a biofilms (40) o para la industria textil, de papel y cosmética entre otros (27, 42).

Además, el tamaño pequeño de gránulo de almidón de quinua se ha relacionado a sus características reológicas únicas de resistencia a la ruptura y gran estabilidad frente al cizallamiento. Esta particularidad lo hace apropiado para su utilización como espesante en productos donde el procesamiento incluya períodos de gran trabajo mecánico y transporte (36, 43). Por otro lado, a veces el tamaño de gránulo pequeño es deseable para aplicaciones particulares, por ejemplo, en la industria de cosméticos se prefieren los gránulos pequeños (44) por su mejor aceptación sensorial.

Se ha reportado que la amilopectina del almidón de quinua tiene gran número de cadenas cortas y baja cantidad de cadenas largas (45). El bajo contenido de amilosa y la estructura única de amilopectina son influyentes en las propiedades funcionales del almidón de quinua (26). En cuanto a estas características reológicas particulares, el valor bajo de *breakdown* (viscosidad de pico- viscosidad en caliente) lo hace óptimo para aplicaciones en fideos y otros productos cocidos especiales que se consumen calientes (19, 36, 43). Otros autores reportaron que el almidón de quinua posee mayor resistencia a la deformación que otros almidones como mijo, amaranto, maíz y trigo sarraceno (46).

Como se ha comentado anteriormente, durante la retrogradación, el agua se expulsa de la pasta de almidón debido a la reasociación de moléculas de almidón y nuevo ordenamiento. El fenómeno de sinéresis permite evaluar tanto la cantidad de agua separada en el almacenamiento de una pasta de almidón a baja temperatura (4 o 8 °C generalmente) como el agua durante el proceso de congelación

y descongelación. Se ha reportado que i) la concentración de almidón, ii) el tratamiento térmico aplicado y iii) las condiciones de centrifugación podrían impactar significativamente en la sinéresis de la pasta de almidón (47). Se han encontrado diferencias en la estabilidad frente a la congelación-descongelación (0-35 %) en diferentes variedades de quinua (11). Por lo tanto, se puede obtener una buena estabilidad de congelación y descongelación de la pasta de almidón de quinua seleccionando la variedad de quinua adecuada.

La baja tendencia a la retrogradación del almidón de quinua para los genotipos del NOA, es favorable para productos donde se desea mantener la consistencia y evitar la gelificación o dureza al enfriarse, como por ejemplo en los postres cremosos y algunos alimentos lácteos (43).

El almidón de quinua es más susceptible a la hidrólisis enzimática en comparación con otros almidones como el trigo, sorgo, maíz y mijo. A su vez esta susceptibilidad se ha relacionado con la cantidad de cadenas cortas, la gran superficie expuesta y una menor cristalinidad (35, 48).

La quinua es un grano no alergénico y apto para el consumo por personas celíacas ya que es libre de gluten. El almidón y la harina integral de quinua podrían utilizarse para enriquecer nutricionalmente productos farináceos para celíacos (26) y para mejorar sus características sensoriales.

También es posible modificar el almidón de quinua para aplicaciones especiales (49). Marefati y col. (2017) (50) reportaron la estabilización de emulsiones tipo *Pickering* a través de modificaciones del almidón de quinua con anhídrido octenil-succínico. Araujo-Farro *et al.*, (2010) (51) reportaron la elaboración de películas comestibles con características únicas a partir de almidón de quinua con glicerol a diversas condiciones de pH y secado. La película obtenida fue incolora y las propiedades mecánicas y de barrera fueron superiores a las películas obtenidas a partir de almidón de maíz, de ñame y de harina de amaranto (51).

Las películas y recubrimientos a base de almidón han atraído mucho la atención en la industria alimentaria por su gran biodegradabilidad que favorece el cuidado del medio ambiente (52). El almidón de quinua también se utilizó para fabricar recubrimientos activos con nanopartículas de oro (53). Estas biopelículas presentaron buena estabilidad térmica y actividad antimicrobiana con un gran potencial como material de envasado para extender la vida útil de los productos alimenticios (53). Estos estudios sugieren que el almidón de quinua puede utilizarse para recubrimientos y para el envasado de alimentos. Tari *et al.*, (2003) (54) combinaron diferentes almidones (amaranto, arroz o quinua) con hidrocoloides (goma arábica, carboximetilcelulosa y carragenano) para encapsular vainillina en diferentes concentraciones por el método de agregados esféricos que utiliza gránulos de almidón de tamaño pequeño. Se observó una relación inversa entre el poder encapsulante del sistema y el contenido de amilosa del almidón. La capacidad encapsulante se ha relacionado con el peso molecular y la difusividad de los compuestos. Los autores concluyen que la menor encapsulación de la vainillina por parte de los almidones con menor contenido de amilosa estaría relacionada con su peso molecular menor y proponen al almidón de quinua como agente encapsulante de aromas por secado por aspersión (54).

En los últimos años se han reportado diversas aplicaciones del almidón de quinua en la industria de alimentos y no alimentarias como farmacéutica, textil y de cosmética (19, 43, 55) por sus propiedades particulares como espesante, aglutinante y ligante de agua. Resulta esencial caracterizar los genotipos nativos y de esta manera conocer sus propiedades fisicoquímicas particulares para promover su aplicación y desarrollo de nuevos productos que contengan al almidón de quinua nativo como ingrediente o aditivo.

6. Conclusiones

Se encontraron diferencias en las propiedades térmicas y reológicas en los genotipos de quinua provenientes de regiones contrastantes. Esto sugiere un amplio campo de aplicaciones de los almidones. Al presente, las harinas de trigo y el maíz son las materias primas amiláceas más utilizadas en la industria de alimentos, siendo la quinua uno de los granos que están comenzando a surgir. En los comercios existen muchos productos derivados de la quinua, como pastas, copos, hojaldre, granola, barras energéticas, etc. Sin embargo, otros productos más elaborados o que requieren el uso de tecnologías más sofisticadas, están en desarrollo para ser explotados en la industria alimenticia y también en las industrias química, cosmética y farmacéutica.

En este sentido, la información sobre el comportamiento térmico y reológico de los genotipos es clave para elegir el genotipo adecuado según el tratamiento térmico y el procesamiento aplicado, así como según como sean las características reológicas y texturales necesarias en la elaboración, conservación y almacenamiento del nuevo producto. Además, la caracterización y diferenciación de estos recursos autóctonos del NOA promueve la protección y conservación de este germoplasma único, fomentando su utilización y valorización a través del desarrollo de un ingrediente específico con características particulares para la industria.

Referencias

1. Tapia, M. (1999). *Agrobiodiversidad en los Andes*. Lima, Fundación Friedrich Ebert.
2. FAO Reports (2011). *La quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial*. http://www.fao.org/alc/file/media/pubs/2011/cultivo_quinua_en.pdf.
3. Andrade, A.J.; Babot, P., Bertero, D., Costa tartara, S., Curti, R., & Manifiesto, M. (2015). Argentina. In: Bazile, Bertero, Nieto (eds.). *State of Art Report of Quinoa in the world in 2013*. Roma.
4. Curti, R.N., Andrade, A.J., Bramardi, S., Velásquez, B., & Bertero, D. (2012). Ecogeographic structure of phenotypic diversity in cultivated populations of quinoa from Northwest Argentina. *Annals of Applied Biology*, 160, 114–125. doi:10.1111/j.1744-7348.2011.00524.x.
5. López-Fernández, M.P., & Maldonado, S. (2013b). Ricinosomes provide an early indicator of suspensor and endosperm cells destined to die during late seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Annals of Botany*, 112, 1253–62.
6. Prego, I. (1998). Seed Structure and Localization of Reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 82, 481–488. doi:10.1006/anbo.1998.0704.
7. Bewley, J., & Black, M. (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum Press
8. López-Fernández, M.P., & Maldonado, S. (2013a). Programmed cell death during quinoa perisperm development. *Journal of Experimental Botany*, 64, 3313–3325. doi:10.1093/jxb/ert170.
9. Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh Sodhi, N., & Singh Gill, B. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81, 219–231. doi:10.1016/S0308-8146(02)00416-8.
10. Wang, K., Hasjim, J., Wu, A., Henry, R., & Gilbert, R. (2014). Variation in amylose fine structure of starches from different botanical sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 19, 4443–4453. doi:10.1021/jf5011676.
11. Lindeboom, N., Chang, P.R., Tyler, R.T., & Chibbar, R.N. (2005). Granule-Bound Starch Synthase I (GBSSI) in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and Its Relationship to Amylose Content. *Cereal chemistry. J.* 82, 246–250. doi:10.1094/CC-82-0246.
12. Simkova, D., Lachman, J., Hamouz, K., & Vokal, B. (2013). Effect of cultivar, location and year on total starch, amylose, phosphorus content and starch grain size of high starch potato cultivars for food and industrial processing. *Food Chemistry*, 141, 3872–3880. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.080.
13. Jane, J.-L., Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H., & Robyt, J.F. (1994). Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron Microscopy. *Starch – Stärke*, 46, 121–129. doi:10.1002/star.19940460402.
14. Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Stärke*, 62, 389–420. doi:10.1002/star.201000013.
15. Seetharaman, K., Tziotis, A., Borrás, F., White, P.J., Ferrer, M., & Robutti, J. (2001). Thermal and functional characterization of starch from Argentinean corn. *Cereal chemistry*, 78, 379–386. doi:10.1094/CCHEM.2001.78.4.379.
16. Wani, A., Singh, P., Shah, M., Schweiggert-Weisz, U., Gul, K., & Wani, I.A. (2012). Rice Starch Diversity: Effects on Structural, Morphological, Thermal, and Physicochemical Properties—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 417–436. doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00193.x
17. FAO Reports (2013). *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional doi:10.1016/0006-2952(67)90244-4.
18. Bazile, D., Martínez, E.A., Fuentes, F.F., Chia, E., Namdar-Irani, M., Olguin, P., Saa, C., Thomet, M., & Vidal B., A. (2014). La quinua en Chile. In: D. Bazile *et al.* (Eds.) *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013*. (p. 477-503). FAO (Santiago de Chile) y CIRAD,(Montpellier, Francia)

19. Jan, K.N., Panesar, P.S., & Singh, S. (2017b). Process standardization for isolation of quinoa starch and its characterization in comparison with other starches. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *11*, 1919-1927. doi:10.1007/s11694-017-9574-6.
20. Lindeboom, N. (2005). *Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)*. Tesis doctoral. University of Saskatchewan. Saskatoon. Canada. <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk3/SSU/TC-SSU-08152005110823.pdf>.
21. Tetlow, I.J. (2010). Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Science Research*, *21*, 5-32. doi:10.1017/S0960258510000292.
22. Li, G., & Zhu, F. (2017a). Amylopectin molecular structure in relation to physicochemical properties of quinoa starch. *Carbohydrate Polymers*, *164*, 396-402. doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.014.
23. Lin, J.H., Singh, H., Cio, J.Y., Kao, W.T., Huang, W.H., & Chang, Y.H. (2013). Genotype diversity in structure of amylopectin of waxy rice and its influence on gelatinization properties. *Carbohydrate Polymers*, *92*, 1858-1864. doi:10.1016/j.carbpol.2012.11.023.
24. Kong, X., Bao, J., & Corke, H. (2009). Physical properties of Amaranthus starch. *Food Chemistry*, *113*, 371-376. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.028.
25. Fuentes, C., Perez-Rea, D., Bergenstahl, B., Carballo, S., Sjö, M., & Nilsson, L. (2019). Physicochemical and structural properties of starch from five Andean crops grown in Bolivia. *International journal of biological macromolecules*, *125*, 829-838. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.120.
26. Li, G., Wang, S., & Zhu, F. (2016). Physicochemical properties of quinoa starch. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 328-338. doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.064.
27. Lindeboom, N., Chang, P. R., & Tyler, R. T. (2004). Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch-Stärke*, *56*, 89-99. doi:10.1002/star.200300218.
28. López-Fernández M.P., Rodríguez, S.D, Favre, L., Maldonado, S., & Buera, M.P. (2016). Identificación y análisis de la enzima GBSS en 5 ecotipos de Quinoa y su relación con el contenido de amilosa. *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, Córdoba.
29. López-Rubio, A., Flanagan, B.M., Gilbert, E.P., & Gidley, M.J. (2008). A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: a combined XRD and NMR study. *Biopolymers*, *89*, 761-8. doi:10.1002/bip.21005.
30. Jane, J.L., & Robyt, J.F. (1984). Structure studies of amylose-V complexes and retro-graded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate Research*, *132*, 105-118. doi:10.1016/0008-6215(84)85068-5.
31. Ring, S.G., Colonna, P., l'Anson, K.J., Kalichevsky, M.T., Miles, M.J., Morris, V.J., & Orford, P.D. (1987). The gelation and crystallisation of amylopectin. *Carbohydrate Research*, *162*, 277-293. doi:10.1016/0008-6215(87)80223-9.
32. Li, G., & Zhu, F. (2017b). Molecular structure of quinoa starch. *Carbohydrate Polymers*, *158*, 124-132. doi:10.1016/j.carbpol.2016.12.001.
33. Wang, S., & Copeland, L. (2013). Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. *Food & function*, *4*(11), 1564-1580.
34. Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E.A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa wild.*), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*, 2541-2547. doi:10.1002/jsfa.4158.
35. Li, G., & Zhu, F. (2017c). Physicochemical properties of quinoa flour as affected by starch interactions. *Food Chemistry*, *221*, 1560-1568. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.137.
36. Srichuwong, S., Curti, D., Austin, S., King, R., Lamothe, L., & Gloria-Hernandez, H. (2017). Physicochemical properties and starch digestibility of whole grain sorghums, millet, quinoa and amaranth flours, as affected by starch and non-starch constituents. *Food Chemistry*, *233*, 1-10. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.019.
37. Jan, K.N., Panesar, P.S., Rana, J.C., & Singh, S. (2017a). Structural, thermal and rheological properties of starches isolated from Indian quinoa varieties. *International Journal of Biological Macromolecules*. *102*, 315-322. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.027.
38. Sharma, M., Yadav, D.N., Singh, A.K., & Tomar, S.K. (2015). Rheological and functional properties of heat moisture treated pearl millet starch. *Journal of Food Sciences and Technology*, *52*, 6502-6510. doi:10.1007/s13197-015-1735-1.

39. Miranda, M., Vega-gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., & Rodríguez, M.J. (2013). Nutritional aspects of six quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) ecotypes from three geographical areas of Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *72*, 175–181. doi:10.4067/S0718-58392012000200002.
40. Kim, Y.S., & Wiesenborn, D.P. (1996). Starch noodle quality as related to potato genotypes. *Journal of Food Science*, *61*, 248–252. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb14771.x.
41. Shi, A.-M., Wang, L.-J., Li, D., & Adhikari, B. (2013). Characterization of starch films containing starch nanoparticles: part 1: physical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, *96*, 593–601. doi:10.1016/j.carbpol.2012.12.042.
42. Peng, J., Wang, Y., Chen, G., Pan, L., & Tu, K. (2018). Morphological and Physicochemical Properties of Very Small Granules Starch from *Agriophyllum squarrosum* (L.) Moq. in Comparison with Maize Starch. *Starch - Stärke* *70*, 1700068. doi:10.1002/star.201700068.
43. Steffolani, M.E., León, A.E., & Pérez, G.T. (2013). Study of the physicochemical and functional characterization of quinoa and kañiwa starches. *Starch/Stärke*, *65*, 976–983. doi:10.1002/star.201200286.
44. Sívoli, L., Pérez, E., & Rodríguez, P. (2012). Análisis estructural del almidón nativo de yuca (*Manihot esculenta* C.) empleando técnicas morfométricas, químicas, térmicas y reológicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, *29*, 293–313.
45. Inouchi, N., Nishi, K., Tanaka, S., Asai, M., Kawase, Y., Hata, Y., Konishi, Y., Shaoxian, Y., & Fuwa, H. (1999). Characterization of amaranth and quinoa starches. *Journal of applied glycoscience*, *46*, 233-240.
46. Praznik, W., Mundigler, N., Kogler, A., Pelzl, B., & Huber, A. (1999). Molecular background of technological properties of selected starches. *Starch*, *51*, 197-211.
47. Zhu, F. (2015). Isolation, Composition, Structure, Properties, Modifications, and Uses of Yam Starch. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*, 357-386.
48. Tang, H., Watanabe, K., & Mitsunaga, T. (2002). Characterization of storage starches from quinoa, barley and adzuki seeds. *Carbohydrate Polymers*, *49*, 13–22.
49. Marefati, A., Rayner, M., Timgren, A., Dejmeek, P., & Sjöo, M. (2013). Freezing and freeze-drying of Pickering emulsions stabilized by starch granules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *436*, 512–520. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.07.015.
50. Marefati, A., Wiege, B., Haase, N.U., Matos, M., & Rayner, M. (2017). Pickering emulsifiers based on hydrophobically modified small granular starches – part I: Manufacturing and physico-chemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, *175*, 473-483. doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.044
51. Araujo-Farro, P.C., Podadera, G., Sobral, P.J.A., & Menegalli, F.C. (2010). Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. *Carbohydrate Polymers*, *81*, 839–848. doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.051.
52. Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *5*, 2058-2076.
53. Pagno, C.H., Costa, T.M.H., De Menezes, E.W., Benvenuti, E.V., Hertz, P.F., Matte, C.R., & Flôres, S.H. (2015). Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chemistry*, *173*, 755-762. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.068
54. Tari, T.A., Annapure, U.S., Singhal, R.S., & Kulkarni, P.R. (2003). Starch-based spherical aggregates: Screening of small granule sized starches for entrapment of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrate Polymers* *53*, 45–51. doi:10.1016/S0144-8617(02)00293-X.
55. Wang, S., & Zhu, F. (2016). Formulation and Quality Attributes of Quinoa Food Products. *Food Bioprocess Technology*, *9*, 49-68. DOI 10.1007/s11947-015-1584-y

Capítulo 10

Aplicaciones tradicionales y potenciales de recursos de bosques tropicales y de cuatro especies en particular

Aldo Alexander Fernández Varela

Universidad Popular del César. Departamento de Agroindustria, Grupo de investigación BIAT.
Fundación Tropilología, Valledupar. Colombia
cientificoagroindustrial@gmail.com

Resumen

El grupo Biat (Biotecnología e Innovación Agroindustrial Tropical) mantiene su trabajo en las líneas de investigación Nuevos Alimentos y Tecnologías Sostenibles por las que ha transitado en los últimos años con el desarrollo de actividades de ciencia tecnología e innovación como los proyectos en las temáticas de bioprospección de bignoniáceas, exploración y caracterización de forrajes tropicales para la producción de carne y leche. Este capítulo se inicia con la muestra de forma general de especies más abundantes del bosque húmedo, que abarca el área mayor y luego con especies del bosque seco y continúa con cuatro especies escogidas por su potencial: balsamín, totumo, cañandonga y acacias, para finalizar con un llamado de atención por la conservación de los ecosistemas y recursos del trópico.

1. Recursos y residuos para sustentabilidad de zonas y población vulnerable

Se presume que son más de 3000 especies desconocidas en todo nuestro territorio colombiano. De estas especies ya se han empezado a descubrir algunas con el auspicio de Colciencias y el apoyo de otras instituciones reunidas en las nuevas expediciones biológicas a las selvas colombianas y que también ha posibilitado el reciente ambiente de paz en esas regiones. Además, actualmente se tiene los siguientes registros de especies vegetales de nuestra biodiversidad:

- Hay 119 especies registradas en vademécum colombiano de plantas medicinales.
- Aproximadamente 1700 tienen usos en medicina, aromáticas y condimentarias (nativas e introducidas) y de las que se tienen algún indicio, pero no se han estudiado.

Para el estudio y desarrollo libre, público y universal de bioproductos para el desarrollo sostenible se debe tener claro que los usos tradicionales e industriales requieren más volumen de materiales mientras que los beneficios son moderados y en cambio hay más beneficios en salud, alimentación y desarrollo social cuando hacen partícipes a las comunidades rurales propietarias del conocimiento tradicional, a las universidades públicas e instituciones estatales y a las poblaciones vulnerables.

¿Dónde pueden tener aplicación estos conocimientos?

Dentro de los objetivos del milenio, en la estrategia de erradicación de la pobreza y desarrollo sostenible, garantizando la sostenibilidad del medio ambiente

2. Biodiversidad de bosques húmedos colombianos.

Se mencionan características y aplicaciones tradicionales y potenciales de algunas especies del bosque húmedo. Dada su mayor abundancia y área disponible, se podría considerar que prevalezca el interés ambiental, humanitario y/o académico de éste por sobre otros biomas y regiones.

2.1. Alimentos no catalogados

En un estudio realizado por Rivas-Abadía *et al.* (1) apoyado por el ICBF y el CIAT con comunidades indígenas de varias regiones de Colombia se encontraron 93 nuevos alimentos y no catalogados por que no estaban registrados en la tabla de composición de alimentos colombianos. Entre estos nuevos alimentos se encuentran los hongos de diferentes variedades que consumen los indígenas de la etnia Cubeo en el departamento de Vaupés, quienes los usan tradicionalmente como fuente de proteína en reemplazo de la carne. Estos tienen contenido de agua entre el 80 y el 90 % y poseen altas cantidades de proteína, grasa y vitaminas como riboflavina, AUPEC (2) -citado por Rivas-Abadía *et al.* (1). En el departamento de Vichada los indígenas Sikuni consumen otro alimento referido por ellos como "nido de avispa rayona", el cual se asa levemente para su consumo y también es usado para hacer rituales.

La colección general de los tres departamentos en el Herbario Amazónico Colombiano-COAH, está representada por 204 familias de plantas vasculares agrupadas en siete divisiones; de las cuales *Magnoliophyta* (plantas con flores), con 4.387 especies y *Pteridophyta* (tipos de helecho), con 224, son las más representativas.

2.2. Bacterias y hongos macro y microscópicos de ambientes terrestres

Estos grupos, han sido los mejor estudiados, debido a la amplia incidencia que tienen bacterias y hongos presentes en todos los ecosistemas sobre el desarrollo de especies vegetales.

Un aporte importante es el estudio de bacterias que participan en los ciclos de mineralización del suelo. El Instituto Sinchi ha estudiado bacterias edáficas como las solubilizadoras de fosfatos, y reporta que el 5,5 % de los aislamientos tienen capacidad solubilizadora. Dentro de las bacterias solubilizadoras de fosfatos reportadas para el sur del trapecio amazónico, la mayoría corresponde a bacilos gram negativos de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Enterobacter* y *Chromobacterium*.

Con respecto a los hongos el grupo de macromicetos más estudiado en la región es el de los Agaricales en Chiribiquete, Caquetá, donde se identificaron 103 especies (24 especies y 79 morfoespecies) correspondientes a 28 géneros (3,4) las cuales se listan en la Tabla 1.

Los hongos microscópicos más estudiados en la región, son los formadores de la simbiosis micorriza arbuscular. Estos pueden representar el segundo componente en biomasa, favoreciendo el desarrollo de especies vegetales. La asociación planta-hongo permite que la planta movilice mayor cantidad de fósforo, micronutrientes y agua, y mejore sus condiciones de crecimiento. Colombia ha realizado grandes aportes al mundo en el conocimiento de nuevas especies de este grupo de hongos: siete especies de *Acaulospora*, dos de *Entrophospora* y dos de *Glomus* (5). Para la región amazónica colombiana se han registrado cinco de los seis géneros existentes: *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Archaeospora* y *Gigaspora* (6-8). *Glomus* es el género más representativo de los suelos de la región, seguido por *Acaulospora*. Los demás géneros aparecen en menor proporción y con menor diversidad (4).

Tabla 1. Hongos agaricales en Chiribiquete

Género	Especie	Género	Especie
<i>Agaricus</i>	<i>griseorimosus</i>	<i>Inopylus</i>	<i>sp.</i> <i>bombicynus</i> <i>denissii</i>
<i>Collybia</i>	<i>sp.</i> <i>trinitatis</i> <i>dryophila</i>	<i>Lactarius</i>	<i>fragilis</i>
<i>Rynus</i>	<i>sp.</i>	<i>Leptonia</i> <i>Leucuprimus</i>	<i>caeruleocapitata</i> <i>fragilissimus</i> <i>venezuelans</i>
<i>Cudemansiella</i>	<i>sp.</i>	<i>Marasmius</i>	<i>sp.</i> <i>dealbatus</i>
<i>Cystoderma</i>	<i>sp.</i>	<i>Nolanea</i> <i>Phaecollybia</i> <i>Phaellusmarasmius</i>	<i>permutata</i> <i>sp.</i> <i>sp.</i>

Tabla 1. Hongos agaricales en Chiribiquete (cont.)

Género	Especie	Género	Especie
<i>Entoloma</i>	<i>sp.</i>	<i>Marasmius</i>	<i>sp.</i>
	<i>sparsicytis</i>		<i>helvolus</i>
	<i>staurusporum</i>		<i>tageticolor</i>
	<i>pnebrevisporum</i>		<i>haedinus</i>
	<i>bakeri</i>		<i>hinnuleus</i>
<i>Fayodia</i>	<i>sp.</i>	<i>Pseudohiatula</i>	<i>sp.</i>
<i>Gallerina</i>	<i>sp.</i>		
<i>Genorrema</i>	<i>sp.</i>	<i>Psilocybe</i>	<i>sp.</i>
<i>Gleocantharellus</i>	<i>sp.</i>		
<i>Hemimycena</i>	<i>sp.</i>		
	<i>sp.</i>	<i>Russula</i>	<i>Brevipes</i>
<i>Hydropus</i>	<i>sp.</i>		
<i>Hygrocibe</i>	<i>occidentalis</i>	<i>Trogia</i>	<i>sp.</i>
	<i>trintensis</i>	<i>Xerula</i>	<i>sp.</i>

Fuente: Sánchez (3) citado por Prieto y Arias (4).

3. Algunas especies del bosque seco tropical

La biodiversidad de los bosques secos de Colombia (BST) está en alto riesgo de extinción (lo que ya ha sucedido con varias especies) por que estos BST tienen un estado crítico de fragmentación y deterioro, de acuerdo con el trabajo de Pizano y García (9).

De acuerdo con Roenes y Reales (10), las áreas aledañas a la población de Guacochito, César, en Colombia, que se han mantenido con relictos de bosque seco tropical, albergan plantas leguminosas con potencial nutricional que bien podrían ser usadas racionalmente para suplementar la alimentación del ganado bovino y especies menores en las temporadas de sequía. El análisis en la zona indicó la prevalencia de especies con características forrajeras tales como *Prosopis juliflora* (trupillo) y *Samanea saman* (algarrobillo). Este trabajo (10) logró establecer que trupillo es una especie muy común en la zona, encontrándose en todos los transectos muestreados, alcanzando de esta manera un índice valor de importancia (IVI) prometedor, que, junto con algarrobillo, las convierten en especies de fácil consecución y uso para los fines indicados.

Como sucede en todo el país se da el mismo fenómeno en Guacochito, la mayoría de los relictos del bosque seco tropical se encuentran dentro de fincas privadas donde sus propietarios no los tocan (y, por ende, no se aprovechan) para evitar que quede espacio libre para invasores, o no los usan adecuadamente, es decir de manera sostenible, planificada y técnica (9).

Podemos encontrar en el medio rural de forma silvestre o domesticada: totumo, acacias, yuca (que también se encuentra en bosque lluvioso), guandul, palma de vino, orejero, maíz rojo.

A continuación, describimos los aspectos sobresalientes estudiados y reportados por las especies florísticas que tienen por nombre común en la región Caribe de Colombia balsamín, totumo, cañandonga y acacia, pero que también se encuentran en otras regiones del país.

3.1. *Momordica balsamina* (balsamín)

Es una planta rastrera trepadora, de la familia *Cucurbitaceae* (Figura 1), que con recientes análisis de frutos, semillas y hojas se puede contribuir y promover su potencial aplicación en alimentación funcional. Se pueden aprovechar los pigmentos rojos y anaranjados de sus frutos y en el tratamiento de hipertensión.



Figura 1. *Momordica balsamina* (balsamín), frutos

3.1.1. Usos tradicionales

La planta se emplea como antidiabético, antiparasitario, emenagogo, antihelmíntico, antimicótico, antirreumático, antihipertensivo, antimalárico, carminativo, colerético, antipirético y antiflatulento. También se emplea en casos de litiasis, ictericia, leucorrea y neumonía. La infusión de la planta entera se usa en el tratamiento de escabiosis y prurito. El fruto tiene como uso tradicional laxante, emenagogo, antihelmíntico y se emplea para el tratamiento de la anorexia, asma, bronquitis, diabetes, dismenorrea y reumatismo. En forma de jalea o jarabe se usa contra la fiebre y el paludismo. El cocimiento de los frutos se utiliza como emético. Los frutos maduros se emplean en el tratamiento de úlcera péptica y externamente en la cicatrización de heridas, aplicados en forma de cataplasma (11, 12,13).

3.1.2. Principales constituyentes

Los colores de sus frutos se deben a antocianos, y se han reportado los componentes triterpenospentacíclicos, (momordicina, momordicinina, momordicilina), esteroles, aminoácidos, alcaloides, ácido ascórbico, citrulina y niacina. Las hojas contienen alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, saponinas, compuestos fenólicos, taninos y triterpenos. (11, 14).

3.1.3. Indicaciones, contraindicaciones y precauciones

Está indicado como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes no insulino-dependiente. Debe tenerse mucho cuidado y precaución en su uso o abstenerse de su uso en casos de hipoglicemia, cetoacidosis diabética, embarazo, lactancia, menores de 18 años, daño renal y hepático.

3.1.4. Interacción con medicamentos

La planta puede potenciar el efecto de los hipoglicemiantes (15). Puede producir efectos teratogénicos. Las semillas y la cáscara contienen lecitinas tóxicas que inhiben la síntesis de proteínas de la pared intestinal. Individuos con insuficiencia de 6-fosfato deshidrogenasa tienen el riesgo de desarrollar favismo. La administración oral del extracto puede producir cambios histopatológicos en el hígado.

En ocasiones se ha reportado cefalea después de la ingestión de semillas. Se debe evitar el consumo por parte de pacientes con antecedentes de alergia a la planta o a las plantas de la familia Cucurbitaceae (15).

3.2. *Crescentia cujete* (totumo)

La Figura 2 muestra una fotografía de esta planta, perteneciente a la familia Bignoniaceae, y detalle de sus frutos. En presentes y futuros trabajos sobre este recurso el principal objetivo es promover la realización de análisis fitoquímico en frutos, hojas y flores de esta planta conocida en el Caribe colombiano como totumo, para conocer el potencial de esta planta para su aprovechamiento sostenible y el ya mencionado interés ambiental, humanitario y académico. Además, utilizar sosteniblemente

compuestos bioactivos en nutrición humana y en cosmética como agentes antialopécicos (acción atribuible a ácidos grasos poliinsaturados, furanonaftoquinonas, iridoideas).

3.2.1. Usos tradicionales

La pulpa del fruto se emplea por vía oral para el tratamiento de afecciones respiratorias tales como asma, bronquitis, pulmonía, resfrío, tos, así como para aliviar afecciones gastrointestinales. Se aplica tópicamente en emplasto para el tratamiento de dermatitis (11).

3.2.2. Principales constituyentes

La pulpa del fruto contiene 10,5 % de proteína; 10,6 % de materia seca; 7,54 % de extracto etéreo; 16,3 % de fibra cruda, de acuerdo a lo reportado por Insuasty *et al.* (16). También se han encontrado ácidos orgánicos (cianhídrico, clorogénico, cítrico, tánico y tartárico), alcaloides cuaternarios, polifenoles y esteroides insaturados. Las semillas contienen aceites fijos constituidos por ácido oleico y linoleico. La planta también contiene compuestos de tipo iridoide e iridoideasglicosilados, denominados crescentinas y crecentósidos (11,17).

3.2.3. Actividad farmacológica

Se comprobó actividad antibacteriana limitada de la tintura y el extracto etanólico de las hojas. La pulpa presenta menor actividad que el extracto etanólico de las semillas (18, 19).

3.2.4. Estudio de aplicación en alimentación bovina

La aplicación de nuevas tecnologías alimenticias en el desarrollo de la producción ganadera es importante social, ambiental y económicamente para las regiones. Un trabajo de Flórez (19) tuvo el objetivo de evaluar bromatológicamente fórmulas de suplementación alimenticia para bovinos teniendo como ingrediente básico pulpas ensiladas de totumo maduro y verde, trabajo que arrojó con sus resultados la afirmación de que la pulpa de totumo ensilada es una alternativa de alimentación animal por el alto contenido de proteína que se presentó mayoritariamente en los tratamientos correspondientes a la pulpa de totumo maduro con porcentajes de 8,84; 10,29; y 10,56; este último porcentaje de proteína está muy cerca del contenido arrojado en el estudio de Insuasty *et al.* (16), mientras que los tratamientos con pulpa de totumo verde, arrojaron en promedio menor concentración proteica con porcentajes de 8,44; 9,96 y 10,32. En este trabajo se logró determinar además el contenido cianhídrico, fibra y de minerales de la pulpa del totumo ensilada, demostrando que la del totumo amarillo sometido a secado en horno presentó menor concentración de cianuro.



Figura 2. *Crescentia cujete* (totumo). Planta (a) y detalle de los frutos (b y c)

3.2.5. Indicaciones, posología, contraindicaciones y precauciones

Uso interno: Coadyuvante en el manejo de trastornos respiratorios leves. Su modo de empleo es oral en jarabe de 1-3 cucharadas diarias. Hipersensibilidad a los componentes de la planta. Por ser irritante gástrico, está contraindicado en enfermedad ácido-péptica. No se encuentran reportes sobre toxicidad. Una forma farmacéutica adecuada es Jarabe con extracto de pulpa del fruto fresco de totumo (1:1) en etanol (21).

3.3. *Cassia grandis* (cañandonga) y *Acacia agustissima* (acacia)

Cassia grandis (Figura 3a y 3b) y *Acacia agustissima* (Figura 4) son dos miembros de la familia Fabaceae. Para su mejor conocimiento, conservación y uso estrictamente sostenible para la salud y el desarrollo social de poblaciones vulnerables y comunidades ancestrales guardianas, es indispensable analizar micronutrientes y otros de sus componentes. Es importante además realizar un nuevo inventario de acacias y otras leguminosas silvestres de la región.

3.3.1. *Cassia grandis* (cañandonga)

Un trabajo de Lafourcade-Prada *et al.* (22) confirma el propósito de este capítulo en seguir estudiando las especies por un interés ambiental, humanitario y académico cuando dice que aún son insuficientes los estudios que avalan su utilidad y seguridad farmacotóxica como antianémico, así como pocas las formulaciones farmacéuticas desarrolladas. El fruto es el órgano más estudiado de la especie, pero aun así se necesita realizar nuevas investigaciones para avalar su efecto antianémico y de otras alternativas terapéuticas que permitan eliminar el olor desagradable de las preparaciones de los frutos de esta planta.



Figura 3. *Cassia grandis* planta (a) y detalle de sus frutos (b y c)

(a) Foto tomada del portal: iNaturalist /Alfonsina Hernández Cardona. (b) Foto tomada del portal <https://www.plantasyremedios.com/canandonga-y-sus-propiedades-medicinales/> (c) Foto tomada del portal https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ae/Cassia_grandis_fruit.jpg/250px-Cassia_grandis_fruit.jpg

Este olor del fruto indica presencia de compuestos volátiles y aromáticos que se pueden transformar y/o aprovechar, pero además también indica que puede estudiarse mejor la cáscara, semillas, pulpa, follaje, flores, tronco y raíces.

Con la belleza de sus flores, el refrescante sombrío de su follaje y los nutritivas y curiosos frutos, el género *Acacia* contiene alrededor de 1350 especies de distribución tropical y subtropical (23). *Acacia agustissima* es una fabácea tropical originaria de Centroamérica, pero extendida desde el suroeste de Estados Unidos hasta el norte de Suramérica (24). La tribu se define tradicionalmente por los lóbulos del cáliz valvados y estambres numerosos indefinidos casi libre o menos frecuentemente unido solamente en la base.

3.3.1.1 Usos tradicionales

En un trabajo de Tillán-Capó *et al.* (25), que partió de las referencias del uso tradicional del fruto de la *Cassia grandis* L. para tratar la anemia por la población de la zona oriental de Cuba, se tuvo como objetivo evaluar dicho efecto en un modelo experimental de anemia ferropénica inducida en ratas y administración de una dieta carente de hierro. Se formaron 3 grupos y se mantuvo la misma dieta: grupo I sin suplementar, grupo II suplementado con 15 mg de hierro/kg de dieta y grupo III la misma cantidad de hierro más 750 mg/kg de peso corporal de polvo seco de *Cassia grandis* L. durante otros 15 días. Las concentraciones medias de hemoglobina al cabo de los 15 días fueron significativamente diferentes en los 3 grupos experimentales, con resultados mayores en el grupo suplementado con hierro y *Cassia grandis* L.

También en este grupo se observó un incremento significativo de los valores medios de hierro en plasma en relación con los valores obtenidos en los animales no suplementados y en los animales que recibieron solamente hierro en la dieta. El porcentaje de hematocrito no mostró diferencia significativa entre tratamiento. Los resultados corroboran el uso popular y tradicional en el oriente cubano de la *Cassia grandis* L. en los estados anémicos, al mejorar la utilización del hierro y la producción de hemoglobina. Es posible que este efecto se explique por mayor absorción de hierro, movilización de la reserva en forma de ferritina y hemosiderina, estimulación de la transferrina, un efecto antioxidante que aumente la biodisponibilidad de hierro ferroso o a una combinación de estos factores.

3.3.1.2. Principales constituyentes

En estudios preliminares la composición bromatológica *Cassia grandis* muestra niveles sobresalientes del 5,6 % de polifenoles totales y del 3,6 % de taninos precipitantes de proteínas (26), como puede verse en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Composición bromatológica del follaje de *Cassia grandis* (en porcentajes)

MS	PC	FDN	FDA	CHS	P	Ceniza
52,64	15,67	42,83	22,23	14,29	0,25	7,98

Fuente: García y Medina (26).

Tabla 3. Niveles de metabolitos secundarios en *Cassia grandis* (en porcentajes)

FT	TT	TPP	TC	TH	Sap	AlcT
5,61	3,59	3,64	4,70	0,28	1,62	0,32

Fuente: García y Medina (26).

1 FT: polifenoles totales; TT: taninos totales; TPP: taninos que precipitan las proteínas, como equivalente de ácido tánico; TC: taninos condensados, como equivalente de leucocianidina; TH: taninos hidrolizables, como equivalente de ácido gálico; Sap: saponinas, como equivalente dediosgenina; AlcT: alcaloides totales (26).

3.3.2. *Acacia agustissima* (acacia)

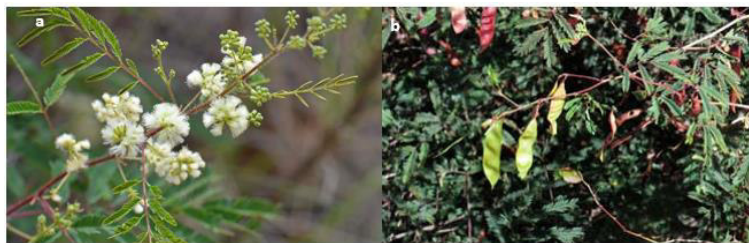


Figura 4. *Acacia agustissima* (acacia), flores (a) y frutos (b) Fotografías tomadas del portal: http://southwestdesertflora.com/WebsiteFolders/All_Species/Fabaceae/Acacia%20angustissima,%20White-ball%20Acacia.html

Acacia agustissima tiene un alto contenido de nitrógeno y varias ventajas en cuanto a su crecimiento, tales como el alto rendimiento de la hoja, tolerancia a la sequía, adaptación a suelos ácidos infértiles y a grandes variaciones de temperatura (27). Tiene actualmente usos como forraje, leña, tinte, en el curado del cuero y en procesos fermentativos (28). En alimentación de aves ha dado buenos resultados en 5-15 % en la dieta (29). La toxicidad en monogástricos y rumiantes está poco documentada bajo condiciones convencionales.

Teniendo en cuenta las colecciones en el herbario nacional colombiano, se ha establecido que la subfamilia Mimosoidae está representada por 32 géneros y unas 345 especies en Colombia. Entre los géneros más conocidos están *Acacia*, *Albizia*, *Calliandra*, *Inga*, *Mimosa*, *Parkia*, *Pithecellobium*, *Prosopis* y *Zygia*, todos nativos de Colombia. Son árboles o arbustos y raramente hierbas, las cuales se caracterizan por presentar hojas generalmente (no siempre) doblemente pinnadas; las flores son regulares o de simetría radial y prefloración valvada; estambres de 10 a numerosos, generalmente llamativos; el polen aparece en monadas, tetradas o políadas, y la semilla presenta por lo general una línea en forma de U llamada pleurograma (23).

4. Conclusiones

En el trópico existen biomas muy frágiles y degradados por la presión antrópica a los que solo se les deben mirar con interés de recuperación y respeto absoluto como lo es el bosque seco.

Los conocimientos ancestrales y científicos sobre la biodiversidad, los recursos genéticos y sus derivados no se deberían perder, concentrar ni explotarse económicamente sino compartirse y armonizarse.

El bioma tropical del bosque húmedo ha estado degradado por cultivos ilícitos y minería ilegal, y en décadas anteriores por el cultivo del caucho. Aunque posea gran número de especies y extensas superficies tanto vírgenes como intervenidas, debe evitarse exponer dichas especies y sus ambientes a la voracidad comercial.

El potencial alimenticio y medicinal que se han encontrado hasta el momento en estas especies incluyendo balsamín, totumo, cañandonga y acacias, además de inspirarnos trabajar desinteresadamente por la humanidad y el ambiente debe motivarnos y obligarnos a seguirlas estudiando también desinteresadamente para eliminar en la tierra el hambre, las enfermedades, la degradación ambiental, la violencia y la ignorancia.

Este capítulo concluye con un llamado a promover el respeto y aprovechamiento sostenible de especies tropicales y a exigir que este posible uso esté a cargo de personas y equipos de trabajo con una gran fortaleza ética y principalmente para fines humanitarios. No se puede disponer para fines económicos de los recursos genéticos del trópico, sus derivados y los ambientes en donde estos se han establecido porque están en peligro de extinción y en degradación por la presión antrópica. Además, estos le pertenecen a la misma naturaleza, a toda la humanidad y especialmente a las comunidades que los han conservado y respetado durante milenios. Existen protocolos estrictos que, en Colombia, por ley, se deben seguir para estudiar estos recursos o para su aprovechamiento sostenible y pase lo que pasaba antes.

Finalmente, para reflexiones de todos lanzamos estas preguntas:

- ¿Cómo inciden las políticas nacionales e internacionales y el mercado en la conservación de las especies tropicales, la eliminación del hambre y el desarrollo sostenible?
- ¿Cuáles son los puntos débiles y fuertes en la investigación, la docencia y la extensión de las universidades en estos propósitos?

Se proponen los siguientes criterios para trabajar en equipos interdisciplinarios:

1. Asociado a entidades que defienden la biodiversidad, el desarrollo sostenible y el conocimiento libre.
2. Por pasión y amor a la humanidad y a la naturaleza.

Agradecimiento

Dedicado a la memoria de mi querida sobrina Natalie Fernández Arrieta.

A todos los compañeros miembros de la Red LACFUN del programa Cyted, a los compañeros del grupo de investigación BIAT, a mi familia y a todos los que siempre nos han apoyado.

Referencias

1. Rivas-Abadía, X., Pazos, S.C., Castillo-Castillo, S.K., & Pachón, H. (2010). *Alimentos autóctonos de las comunidades indígenas y afrodescendientes de Colombia*. Instituto colombiano de bienestar familiar (ICBF), Bogotá DC, Colombia Centro internacional de agricultura tropical (CIAT), Palmira-valle del Cauca, Colombia.
2. AUPEC. Agencia Universitaria de Periodismo Científico de la Universidad del Valle. (2010). *Ciencia al día. Alimentos autóctonos de las comunidades indígenas y afrodescendientes de Colombia*. Instituto colombiano de bienestar familiar (ICBF), Bogotá DC, Colombia Centro internacional de agricultura tropical (CIAT), Palmira-Valle del Cauca, Colombia. Citado por Rivas-Abadía y otros.
3. Sánchez, I.M. (2003). *Composición de hongos agaricales en dos bosques de la cuenca de Puerto Abeja, Parque Nacional Natural Chiribiquete, Caquetá*. Tesis de grado. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
4. Prieto, A., y Arias, J.C. (2007). Diversidad biológica de la región sur de la Amazonía colombiana. En: *Diversidad biológica y cultural del sur de la amazonía colombiana*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAvH). Bogotá, Colombia.
5. Schenck, N.C., y Perez, Y. (1990). Manual for Identification of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. (INVAM). Gainesville. University of Florida.
6. Restrepo, M.C., Martínez, J.E., Montenegro, J.E., Caicedo, A., y Torres, E. (1993). Análisis sobre la actividad de hongos formadores de micorrizas vesículo arbusculares. En: *Aspectos ambientales para el ordenamiento territorial del occidente del departamento del Caquetá*. Estudios en la Amazonia colombiana. (p. 698-736). Bogotá, Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi – IGAC.
7. Arcos, A.L. (2003). Distribución de la asociación micorrízica arbuscular en ecosistemas naturales e intervenidos. En: *Aspectos ambientales para el ordenamiento territorial del Trapecio Amazónico*. (p. 1-39). Bogotá, Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi – IGAC.
8. Peña-Venegas, C.P., Cardona, G.I., Mazorra, A., Arguellez, J.H., & Arcos, A.L. (2006). *Micorrizas arbusculares de la amazonia colombiana*. Catalogo Ilustrado. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.
9. Pizano, C., y García, H. (2014). *El bosque seco Tropical en Colombia*. Bogotá, Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAvH).
10. Roenes, G., y Reales, J. (2018). Importancia de los cobertores vegetales transformados para la sustentabilidad ganadera en el noreste del Cesar, Colombia. *Revista Colombiana Ciencia Animal*, 10(1), 51-60
11. Cáceres, A. (1986). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala, (p. 153-155). Guatemala. Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos. Citado por Ministerio de la protección social. 2008. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. Bogota, Colombia.
12. Gupta, M. (1996). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas, (p. 250-254). Bogotá. Convenio Andrés Bello-CYTED, Editorial Presencia. Citado por Ministerio de la protección social. 2008. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. Bogota, Colombia.
13. Grover, K., & Yadav, S. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*. A review, *Journal of Ethnopharm* (93), 123-132. Citado por Ministerio de la protección social. 2008. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. Bogota, Colombia.
14. Duke, J. (2007). *Phytochemical and Ethnobotanical Database*. [Http://www.arsgrin.gov/duke](http://www.arsgrin.gov/duke). Citado por Ministerio de la protección social. 2008. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. Bogota, Colombia.
15. Basch, E., Gabardi, S., & Ulbricht, C. (2003). Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 60 (4), 356–359. Citado por Ministerio de la protección social. 2008. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. Bogota, Colombia.
16. Insuasty, E., Apráez, E. & Cerón, A. (2013). Caracterización botánica, nutricional y fenológica de especies arbóreas y arbustivas de bosque muy seco tropical. *Ciencia Animal*, (6):109-124.
17. Kaneko, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., & Nguyen, M. (1998). n-alkyl glycosides and p-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry*, 47, 259-263. Citado por Ministerio de la protección social. 2008. Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales. Bogota, Colombia.

18. Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., & Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of ethnopharmacology*, 30, 55-73. Citado por Ministerio de la protección social. 2008. *Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales*. Bogota, Colombia.
19. Cáceres, A., Álvarez, A.V., Ovando, A.E., & Samayoa, B. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of ethnopharmacology*, 31, 193-208. Citado por Ministerio de la protección social. 2008. *Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales*. Bogota, Colombia.
20. Florez, E.J. (2013). Evaluación de la pulpa de totumo ensilada en dos estados de maduración como alternativa en la alimentación bovina. *Temas Agrarios*, 17(1), 44-51.
21. Ministerio de la Protección Social. (2008) *Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales*. Bogotá, Colombia
22. Lafourcade-Prada, A., Rodríguez-Amado, J.R., Escalona-Arranz, J.C., & Laurido-Fuenzalida, C. (2013). Estado del arte sobre *Cassia grandis* L. f. (cañandonga). *Revista cubana de plantas medicinales*. 19(1), 21-28. www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/rt/printerFriendly/147/52
23. Forero, E., & Romero, C. (2005). *Estudios en Leguminosas Colombianas*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Jorge Alvarez Lleras No. 25. Bogotá, Colombia. Editora Guadalupe.
24. McSweeney, C.S., Gough, J., Conlan, L.L., Hegarty, M.P., Palmer, B., & Krause, D.O. (2005). Nutritive value assessment of the tropical shrub legume *Acacia angustissima*: Anti-nutritional compounds and in vitro digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 121 (1/2), 175-190.
25. Tillán-Capó, J., Rodríguez-Chanfrau, J., Gómez-Mirabal, J.M., Pardo Ruíz, Z., & Agüero Fernández, S. (2004). Actividad antianémica de la *Cassia grandis* L. *Revista Cubana Farmacia*, 38(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000300009&lng=es
26. García, D.E., y Medina, M.G. (2006). Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zootecnia Tropical*, 24(3), 233-250.
27. McSweeney, C.S., Collins, E.M.C., Blackall, L.L., & Seawright, A.A. (2008). A review of anti-nutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 158-171.
28. Jiménez, G., López, M., Nahed, J., Ochoa, S., & de Jong, B. (2008) Árboles y arbustos forrajeros de la región nortetzotzil de Chiapas, México. *Revista Veterinaria México*, 39(2), 199-213.
29. Ncube, S., Hamudikuwanda, H., & Banda P. (2012). The potential of *Acacia angustissima* leaf meal as a supplementary feed source in broiler finisher diets. *International Journal of Poultry Science*, 11(1):55-60.

Capítulo 11

Aprovechamiento y análisis de fuentes lácteas no convencionales para el desarrollo de alimentos innovadores

Estela Mari Álvarez¹, Leonardo Martín Calderón², Fabiano Freire Costa³, Anselmo Reggiardo¹, Patricia Hilda Risso^{1,5,6}, Ana María Romero⁴, Sergio Rozycki², Franco Vasile^{4,6}

¹Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas, Área Físicoquímica. Argentina. estelamalvarez@hotmail.com; phrisso@yahoo.com.ar

²Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, Instituto de Tecnología de Alimentos. Área Leche y Productos Lácteos, Santa Fe; Argentina. leo_caldera@hotmail.com; sdrozycki@hotmail.com

³Universidad Federal de Juiz de Fora, Facultad de Farmacia, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Minas Gerais. Brasil. fabianofreirecosta@gmail.com

⁴Universidad Nacional del Chaco Austral, Laboratorio de Alimentos Funcionales. Argentina

⁵Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Veterinarias. Argentina. francovasile@hotmail.com

⁶Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina

Resumen

El concepto de alimentación ha ido transformándose en los últimos años de acuerdo a una percepción y elección “más saludable” que tienen los consumidores al momento de ingerir un alimento y esto ha determinado que la Industria Alimentaria maximice su rédito, incorporando valor agregado e innovación tecnológica a sus productos. De esta manera, la aparición de los “Alimentos Innovadores” y “Funcionales”, ha tenido un gran impulso gracias a este cambio en el paradigma alimentario. Esto trae consigo modificaciones en los procesos productivos, debido a la aparición de nuevos productos, o reformulación de otros, otorgándoles las propiedades funcionales adecuadas, que consecuentemente presentarán cambios en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del alimento y que deberán tenerse en cuenta en el diseño de equipos, control de calidad y estudios de aceptabilidad de los productos en cuestión.

En este contexto, la leche y los productos lácteos constituyen unos de los segmentos de mercado más importantes en relación al desarrollo e implementación de productos innovadores (1). Estos alimentos, cuentan con la ventaja de contar con la aprobación previa de los consumidores, quienes reconocen en estos la capacidad de ejercer efectos positivos en la salud. El desarrollo de alimentos lácteos con propiedades especiales encuentra, por tanto, numerosas ventajas en el mercado actual siendo la innovación un requisito clave. En este sentido, el aprovechamiento de fuentes lácteas distintas a la bovina, así como el uso de subproductos de la industria láctea, constituyen estrategias promisorias en relación a la obtención de productos lácteos con calidades nutritivas, tecnológicas y funcionales diferenciadas, permitiendo el agregado de valor a subproductos o recursos localmente disponibles y en muchos casos con escaso o nulo aprovechamiento a escala industrial.

En este capítulo se realizará una breve reseña de los aspectos más sobresalientes de la estructura y composición de la leche, así como de las tecnologías más recientes aplicadas al análisis y evaluación de la calidad de la fracción proteica. Seguidamente se introducirán aspectos tecnológicos y nutricionales de dos leches no convencionales de incipiente desarrollo en Argentina. Por último, se presentarán diversos productos lácteos con propiedades especiales a base de leches de oveja, búfala y subproductos de la industria láctea.

1. Estructura y composición de la leche

En términos generales, la leche contiene un gran número de sustancias que se encuentran ya sea en solución, dispersión coloidal o formando una emulsión. Las caseínas, que constituyen la principal fracción proteica de la leche, se encuentran dispersas como un gran número de partículas pequeñas agrupadas en las llamadas micelas de caseína (MC) que permanecen estabilizadas en forma de dispersión coloidal. Las grasas y vitaminas liposolubles se encuentran en forma de emulsión de pequeños glóbulos líquidos de grasa inmiscibles con el agua de la leche. Las MC y los glóbulos grasos le confieren a la leche la mayoría de sus características físicas, además de las propiedades

organolépticas y funcionales a los productos derivados tales como quesos, manteca, yogurt, etc. (2). Por otro lado, la lactosa (azúcar característico de la leche) junto a otras proteínas (llamadas proteínas séricas) y los componentes minerales, se encuentran totalmente disueltos en la fase acuosa. Mucho de estos minerales resultan indispensables para el crecimiento del lactante, siendo la leche una excelente fuente de estos nutrientes. Entre los minerales, la leche contiene calcio, potasio, sodio, magnesio y zinc en forma de sales, destacándose el alto contenido de calcio, lo cual convierte a la leche y a sus derivados en la principal fuente de este mineral imprescindible para la vida. La digestibilidad y capacidad de absorción del calcio y el fósforo de la leche son generalmente altas, en parte debido a que estos minerales se encuentran asociados con las caseínas de la leche (3).

El conocimiento de la composición y características fisicoquímicas de los componentes de la leche constituye la base para el entendimiento de mucho de los mecanismos involucrados en la obtención de derivados lácteos. En particular, el análisis cuali y cuantitativo de la fracción proteica constituye un aspecto clave en la evaluación de los patrones de calidad de la materia prima, así como en el direccionamiento de ésta, para la obtención de productos específicos.

2. Nuevas tecnologías en el análisis de las proteínas de la leche

Existen en la actualidad, una gran variedad de métodos analíticos que permiten la separación, identificación y cuantificación de las principales proteínas de la leche (4). Entre ellos, la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), acopladas a detectores de ultravioleta y espectrómetros de masas, son los más utilizados. Entre sus principales ventajas puede citarse la automatización y el límite de detección. Sin embargo, el elevado consumo de reactivos (muchas veces tóxicos), el tiempo de preparación de las muestras y el alto costo de los equipos, constituyen las principales desventajas (4-8).

Recientemente, la electroforesis microfluidica (chip), ha sido propuesta como una alternativa eficiente para el análisis de las principales fracciones proteicas de la leche (4-8). Esta metodología, denominada *lab-on-a-chip* (Figura 1) fue inicialmente desarrollada para la separación y cuantificación de proteínas, ADN y ARN, siendo el Bioanalyser (Agilent 2100) el primer equipo comercial disponible en el mercado específico para el análisis de las fracciones proteicas de la leche. En comparación a las técnicas existentes, además de proporcionar buenos resultados, ésta presenta la ventaja de requerir menores tiempos de preparación de las muestras (~ 30 min/chip), menores cantidades de reactivos utilizados (0.5 mL/chip) y límites de detección capaces de medir nanogramos de material en microlitros de muestra (5, 6, 8).



Figura 1. Chip (Kit lab Protein 80) para análisis de proteínas de leche (Bioanalyzer: Agilent 2100)

Diversos autores han reportado buenos resultados respecto de la aplicación de esta metodología en la identificación y cuantificación de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina del suero lácteo (9, 10). Sin embargo, los resultados alcanzados para las diferentes fracciones de caseína (β -caseína, α_s -caseína y κ -caseína), aún son pocos satisfactorios, debido principalmente a la separación incompleta y a la superposición de señales (11).

Costa y col. (2014) (4) optimizaron y validaron una metodología basada en la utilización de tampones para solubilizar, separar, identificar y cuantificar las principales fracciones proteicas utilizando el Bioanalyser (4, 12). Esta metodología permitió el análisis tanto de muestras en que las proteínas debieron

ser extraídas (por trituración en presencia de tampón de urea 7.0 M, bis-tris-propano 20 mM, pH=7.5), por ejemplo en quesos (13), como de muestras fluidas, cuyo análisis se realizó directamente. En ambos casos, las muestras (con o sin extracción previa) deben mezclarse con el tampón de separación (hidroxipropilmetil celulosa 0.05 % w/w en buffer de urea 6.0 mol L⁻¹, citrato trisódico anhidro 20 mmol L⁻¹, ácido cítrico 0.1 mol L⁻¹, pH=3.0), dejándose reaccionar por 2 h a 4 °C. Después de este tiempo, se debe colocar una alícuota en los chips de acuerdo con la recomendación del fabricante. Los chips se insertan en el equipo y éste realiza la lectura.

La Figura 2 muestra el electroferograma obtenido a partir de muestras de leche con tampón de separación. De acuerdo con el orden de elución se identificaron las siguientes proteínas (1) α -lactalbúmina (2) β -lactoglobulina (3) β -caseína (4) α_s -caseína (5) κ -caseína.

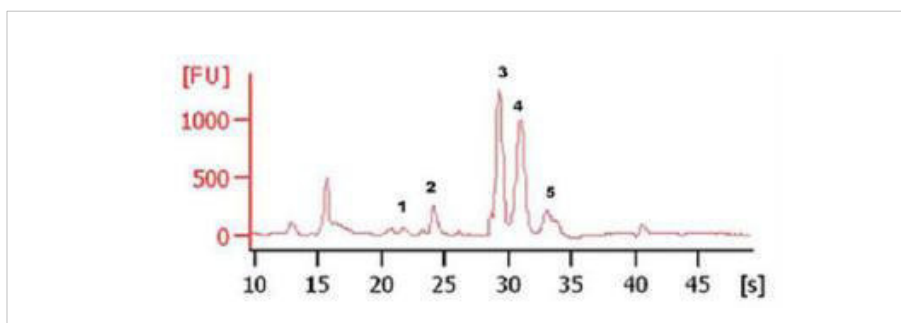


Figura 2. Electroferograma obtenido a partir de muestras de leche con tamaño de separación (SEP) apropiado para la identificación de cada una de las proteínas. (1) α -lactalbúmina (2) β -lactoglobulina (3) β -caseína (4) α_s -caseína (5) κ -caseína

Ramos y col. (2013) (12), reportaron buenos resultados en el análisis de proteínas de queso. En este caso, las proteínas se extrajeron con tampón para la solubilización y posteriormente se mezclaron con el tampón de separación.

Al igual que con leche bovina, esta metodología también resultó eficiente en la identificación y cuantificación de las proteínas de fuentes lácteas no convencionales tales como el suero de leche de búfalas (14).

Santos y col. (2018) (7), compararon el perfil electroforético de muestras de leche de origen caprino y bovino y sus mezclas mediante electroforesis microfluídica y convencional. La electroforesis microfluídica permitió la separación completa de las principales caseínas de la leche, excepto la κ -caseína de la leche de cabra. Además, las principales proteínas del suero se separaron con una perfecta distinción de las variantes A y B de la β -lactoglobulina. Sin embargo, las variantes A y B de la β -lactoglobulina no pudieron aislarse utilizando SDS-PAGE. Aunque el método urea-PAGE no mostró alta resolución entre las proteínas del suero de leche, las γ -, κ -, β - y α -caseína fueron claramente identificadas. Este trabajo permitió concluir que la electroforesis microfluídica en chip complementa los métodos actuales para el análisis de proteínas de la leche bovina y caprina, destacando la separación de las proteínas del suero que presentaron mejores resultados que las técnicas de urea y SDS-PAGE.

La electroforesis microfluídica *lab-on-a-chip* mostró ser una herramienta alternativa bastante interesante para los fines que se utilizaron. Se considera un excelente equipo para línea de producción, debido a su facilidad y versatilidad.

3. Fuentes lácteas no convencionales como estrategia de innovación

Como alternativas a la producción y comercialización de productos lácteos de origen bovino, la crianza y producción lechera ovina, bubalina y caprina se han convertido en una parte vital de la economía agraria de muchos países, especialmente en la región mediterránea y el Medio Oriente (15, 16).

En Argentina, sin embargo, el mercado de productos lácteos obtenidos de fuentes distintas de la bovina, se encuentra aún en estado de desarrollo.

Así, por ejemplo, se están realizando importantes esfuerzos tendientes a estimular la producción ovina brindando un marco apropiado para recuperar esta actividad. En el año 2001, el Estado Nacional aprobó la Ley para la Recuperación de la Ganadería Ovina. En particular, la región santafesina se adhirió a esta ley en el año 2007 sumándose a actividades experimentales adaptativas. Pese a no constituir una opción habitual para los consumidores, el creciente interés en la elaboración de productos derivados de la leche ovina se basa en sus propiedades fisicoquímicas particulares que otorgan un mayor valor nutricional y comercial a dichos productos. En efecto, la leche ovina está principalmente destinada a la obtención de productos considerados "gourmet", de alto valor agregado (17).

En comparación con la leche de vaca (Tabla 1), la leche de oveja (*Ovis orientalis aries*) contiene una mayor proporción de sólidos totales y nutrientes (mayor contenido de lactosa, grasas, el doble de contenido de caseínas y minerales) (16, 18). Este mayor contenido en caseínas y minerales ejerce una influencia muy importante durante la elaboración de productos lácteos derivados, como los quesos, debido a que afecta los tiempos de coagulación, textura final y firmeza de los coágulos, etc. En efecto, para la leche ovina se ha observado un mayor rendimiento quesero (19). Los niveles de Ca, P, Mg, Zn, Fe y Cu son mayores en leche de oveja mientras que lo contrario ocurre respecto del contenido de K, Na y Mn (20).

Los minerales que se encuentran disueltos en la leche ovina se distribuyen entre la fase soluble y la fase micelar, y este balance tiene un gran efecto sobre las propiedades nutricionales y funcionales de la leche, por ejemplo, en la capacidad de retención de estos minerales en el proceso de coagulación durante la elaboración de muchos productos lácteos derivados como queso, manteca, etc. (21). El consumo del queso y la leche de oveja es una manera excelente de incorporar minerales y proteínas en la dieta ya que, si se compara con las raciones diarias recomendadas, la leche de oveja proporciona más proteínas y fósforo en una porción que la leche vacuna, además de un importante aporte de Ca²⁺, Mg²⁺ y Zn²⁺. En cuanto al queso de oveja, las concentraciones son aún más elevadas que en la leche, por lo que se convierten en una fuente aún más valiosa de proteínas, materia grasa y minerales (22).

Tabla 2. Comparación de la composición de las leches bovina y ovina

Composición (%)	Leche bovina	Leche ovina
Grasas	3.6	7.9
Lactosa	4.7	5.1
Proteínas	3.2	6.2
* Caseínas	2.6	4.2
* N-no proteico	0.2	0.8
Minerales	0.7	1.1

Por su parte, la producción de búfalos (*Bubalus bubalis*) constituye una actividad agropecuaria emergente en nuestro país. Desde 1992, la producción de ganado bubalino ha experimentado un marcado crecimiento, concentrándose en la actualidad en la región nordeste. La cría de búfalos se ha destinado principalmente a la producción de carne y en menor medida a la obtención de leche (23).

La leche de búfalas es un alimento rico en grasas y proteínas de alto valor biológico, lo que la convierte en un concentrado de nutrientes y energía. Entre sus componentes se destacan el retinol, calcio, ácidos grasos mono y poliinsaturados, proteínas, hierro, zinc, vitaminas B3, B6, B9 y B12, fósforo, sodio y selenio (24). La mayor proporción de sólidos totales en comparación con leche vacuna, hace de la leche de búfala un alimento nutritivo con buenos rendimientos en la obtención de derivados lácteos (25). Sin embargo, a pesar de los beneficios nutricionales y tecnológicos reportados en la literatura (26), y a la disponibilidad de animales con potencial capacidad productora (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, 2014), la leche de búfalas presenta un reducido nivel de industrialización, siendo el queso mozzarella el principal derivado (23).

La utilización de leches no convencionales, tales como la leche de oveja y de búfalas, plantea alternativas interesantes en el desarrollo de alimentos innovadores, al mismo tiempo en que amplía y diversifica las posibilidades de aprovechamiento de recursos que, como los anteriormente mencionados, resultan escasamente industrializados.

4. Obtención de productos lácteos con propiedades especiales

Fortificación de leche ovina con minerales biológicamente activos

El consumo generalizado, continuo y más o menos regular de leche y productos lácteos, posibilita el empleo de estos alimentos como vehículo de diferentes nutrientes, por ejemplo, cationes divalentes de gran importancia biológica. En alimentos lácteos, muchas de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las caseínas, le permiten actuar como transportadores de estos cationes, ejerciendo un importante efecto sobre la bioaccesibilidad de los mismos (27).

Entre las propiedades funcionales que poseen las caseínas y sus sales derivadas, existen dos que merecen especial atención debido a las características visuales y organolépticas que brindan a los productos derivados: estabilidad coloidal y gelificación. Por un lado, la estabilidad coloidal de las caseínas desempeña un rol capital en la biodisponibilidad de elementos bioactivos, tales como los minerales, frecuentemente empleados como suplementos en la elaboración de productos alimenticios (27). Por otro lado, las caseínas tienen excelentes propiedades gelificantes; esto es la capacidad de formar una estructura de gel bajo determinadas condiciones. En particular, la gelación ácida tiene lugar durante la producción de alimentos tales como quesos, yogurt, etc.

La adición de distintos cosolutos por sobre los niveles naturales de la leche puede generar efectos sobre la funcionalidad de las caseínas, afectando su estabilidad coloidal y capacidad gelificante, con impacto directo en las características finales del alimento elaborado. Por ello, es fundamental evaluar la influencia de las especies iónicas adicionadas (iones calcio, magnesio y zinc), con el fin de fortificar la leche y/o sus derivados, sobre la estabilidad coloidal y el proceso de agregación ácida de las caseínas con el objeto de hallar las condiciones óptimas que favorezcan dicho proceso.

En este sentido, se estudió la estabilidad coloidal del caseinato de origen ovino (CASO) empleando métodos espectrofotométricos y electroforéticos que permitieron realizar un análisis de los cambios estructurales y de composición del CASO en presencia de los cationes antes mencionados. El estudio comparativo de estabilidad coloidal para el CASO y el caseinato bovino (CASB) frente al Ca^{2+} permitió concluir que el CASO presenta una estabilidad coloidal mucho menor en comparación con el CASB, ya que ante el agregado de iguales concentraciones de Ca^{2+} , su solubilidad se vio altamente disminuida. Este comportamiento puede atribuirse a una mayor presencia de grupos fosfoserina sensibles al Ca^{2+} y cuya unión al catión induce, en un principio, la formación de partículas más compactas y con mayor porcentaje de sitios hidrofóbicos expuestos, incrementándose la posibilidad en una segunda etapa, de establecer entre ellas interacciones de tipo hidrofóbicas que favorecen su agregación en partículas de mayor tamaño y comprometen consecuentemente su estabilidad. Otro factor responsable de la menor estabilidad coloidal del CASO sería la menor proporción de κ -CN respecto del CASB, para la cual está bien establecida su función como estabilizante de los agregados caseínicos.

En presencia de Mg^{2+} y Zn^{2+} , la estabilidad coloidal del CASO se redujo significativamente, obteniéndose valores de solubilidad mucho menores que en presencia de Ca^{2+} . Este efecto más destabilizante puede atribuirse a una mayor inespecificidad en la unión de ambos cationes con los grupos fosfoserina como con las cadenas laterales ácidas, razón por la cual presentan un mayor efecto disociante sobre los agregados proteicos en la primera etapa del estudio de estabilidad. Esta mayor cantidad de agregados de menor tamaño y con mayor superficie hidrofóbica expuesta facilita la posterior formación de partículas de mayor tamaño con una solubilidad menor.

Estos resultados permitieron establecer las condiciones óptimas para el estudio del proceso de agregación ácida del CASO inducida por la hidrólisis de la glucono- δ -lactona (GDL) en presencia de distintas concentraciones de los cationes mencionados. El proceso de agregación se evaluó a través del cambio, durante el tiempo (t) y a medida que disminuyó el pH, de la absorbancia a 650 nm (A_{650}) y del parámetro α inversamente proporcional al tamaño medio de las partículas de CASO. Por lo tanto, la disminución de α indicó el comienzo de la agregación por desestabilización coloidal de las caseínas.

Se determinó que la adición de Mg^{2+} y Zn^{2+} tuvo un mayor efecto sobre la velocidad del proceso (Figura 3). Este comportamiento se atribuiría a la formación de un mayor número de partículas de menor tamaño y grado de compactación, pero con una superficie hidrofóbica mayor, capaces de difundir e interactuar más fácilmente para organizarse en una estructura de red de gel. Para una concentración

de 0.5 mM, los tiempos a los cuales comenzó la agregación resultaron ser significativamente menores en presencia de Mg^{2+} y Zn^{2+} (Figura 3 A y D), debido a que en su presencia la velocidad de disminución del pH fue considerablemente mayor (Figura 3 C), permitiendo minimizar las repulsiones electrostáticas entre las partículas de CASO y favoreciendo su agregación en menos tiempo.

Por otra parte, el pH al cual comienza la agregación fue menor en presencia de Mg^{2+} y Zn^{2+} respecto al de CASO a la misma concentración de Ca^{2+} (Figura 3 B). Este comportamiento podría deberse a que en presencia de Mg^{2+} y Zn^{2+} la velocidad de disminución del pH es significativamente mayor, por lo cual en un menor intervalo de tiempo pueden alcanzarse valores de pH más bajos. Además, cuando se adicionó Mg^{2+} y Zn^{2+} se obtuvo una malla de red de gel final con menor grado de compactación que en presencia de Ca^{2+} . El mayor grado de compactación de la red de gel en presencia de este catión se debería a un proceso de agregación más lento durante el cual las cadenas polipeptídicas pueden adquirir una mayor cantidad de estados conformacionales y mayor posibilidad de acomodarse en una estructura más compacta donde priman las interacciones proteína-proteína y el porcentaje de hidratación es menor.

A partir de estos resultados puede concluirse que la adición de diferentes cationes, con el fin de fortificar leche de oveja, puede alterar las propiedades sensoriales de productos lácteos derivados como su textura, dureza, etc., afectando de esta manera su calidad final, con un consecuente impacto sobre la aceptación de los mismos por parte de los consumidores.

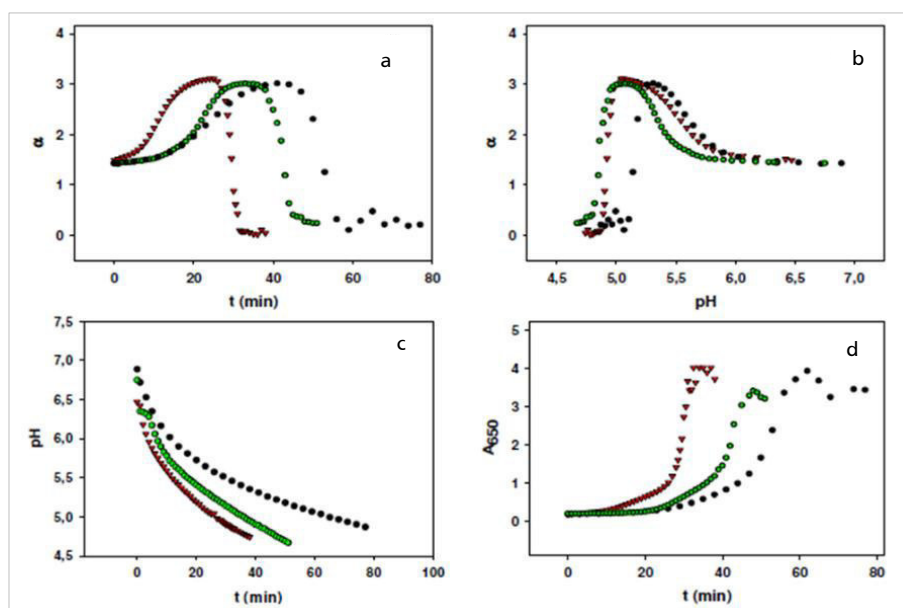


Figura 3. A) Parámetro α vs. tiempo (t), B) Parámetro α vs. pH, C) pH vs. t, D) Absorbancia a 650 nm (A_{650}) vs. t, durante la agregación ácida de CASO (1 g/L) en presencia de 0,5 mM de (●) Ca^{2+} , (●) Mg^{2+} , (▼) Zn^{2+}

5. Aprovechamiento de suero lácteo líquido como materia prima para la formulación de postres funcionales

En la elaboración de quesos, la separación de la cuajada genera como subproducto suero líquido, el cual está compuesto principalmente de agua, proteínas solubles, lactosa, ácido láctico y minerales (principalmente calcio). El aprovechamiento del suero de leche plantea un escenario promisorio en relación a la potencial obtención de ingredientes y productos con características atractivas para el sector alimentario. En este sentido, se realizaron pruebas preliminares de formulación de un Postre Lácteo Funcional (PLF) a partir de suero líquido con un porcentaje aproximado del 30 % de sólidos totales (ST), un porcentaje de materia grasa del 10 %, con agregado de leche en polvo entera (LPE)

y descremada (LPD), WPC en polvo, sacarosa y saborizantes de varios gustos (vainilla, frutilla y dulce de leche), en dosis que van desde 0.5 mL a 1.5 mL por kilogramo de producto, lográndose así productos con elevada aceptabilidad, según evaluaciones sensoriales preliminares.

El impacto de las distintas formulaciones se observó en términos de las propiedades reológicas, texturales y sensoriales. Con esta finalidad, para el estudio reológico se empleó un viscosímetro de cilindros concéntricos (Rheolab QC), en muestras a 10°C, obteniendo reogramas de esfuerzo de Corte (τ) vs. Gradiente de Deformación ($\dot{\gamma}$), primero ascendente desde 0 hasta 200 s⁻¹ y luego descendente desde 200 hasta 0 s⁻¹, obteniéndose curvas (reogramas) similares a la Figura 4, con curvas superior e inferior bien diferenciadas (tixotropía del producto), y se calcularon parámetros representativos del comportamiento en flujo del producto, mediante la aplicación de modelos reológicos adecuados, como ser: Ley de Potencia (ec. 1) y Ley de potencia modificada, deducida de la anterior, linealizada (ec. 2).

$$\tau = K * \dot{\gamma}^n \quad (\text{ec. 1})$$

$$\ln \mu = \ln K + m * \ln \dot{\gamma} \quad (\text{ec. 2})$$

Donde: *Esfuerzo de corte*; (Pa): fuerza por unidad de área necesaria para alcanzar una deformación dada; $\dot{\gamma}$: *Gradiente de deformación*; (s⁻¹): cambio de velocidad en sentido perpendicular a la dirección del movimiento; μ : *Viscosidad*; (Pa.s): medida de la resistencia interna al flujo, originada por rozamiento; *K*: *Índice de consistencia*; (Pa.sⁿ): relacionada en forma directa con la consistencia y la viscosidad (Vanegas Pérez, 2009); *n*: *Índice de comportamiento*; (*n*) = *adimensional*: Indica la desviación del comportamiento respecto al newtoniano (*n* = 1) (Vanegas Pérez, 2009) y *m* = *n* - 1 es la velocidad de cambio de la viscosidad, con el gradiente de deformación.

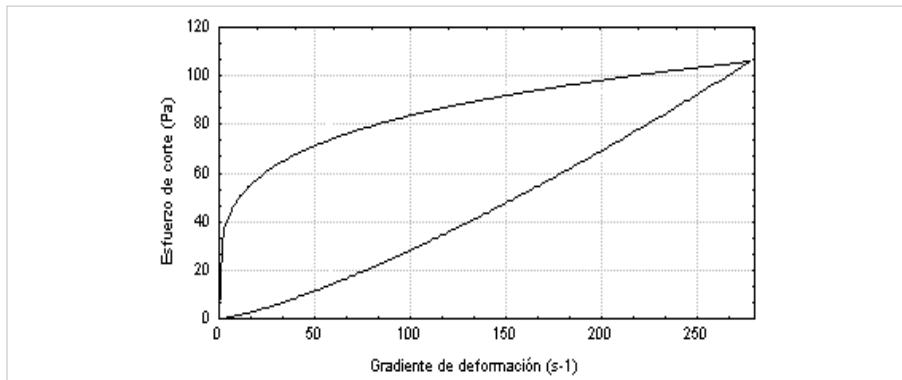


Figura 4. Reograma Esfuerzo de Corte vs. Gradiente de Deformación, para los PLF

Por medio de ensayos reológicos (reometría destructiva), se encontró que los PLF elaborados con suero lácteo (Tabla 2), presentaron un comportamiento semejante a aquellos elaborados con leche fluida, caracterizado por un comportamiento No-newtoniano (valores de $n \neq 1$) y fuertemente tixotrópico ($0 < n < 1$, y una visible separación entre las curvas del reograma). Sin embargo, presentaron Índices de consistencia bastante mayores, y menores valores de Índices de comportamiento, alejándose más del comportamiento Newtoniano.

Tabla 3. Valores promedios experimentales de parámetros reológicos obtenidos en PLF, elaborados a partir de suero lácteo líquido. Subíndice i: curva inferior. Subíndice s: curva superior. R²: coeficiente de determinación; (K) = Pa.sⁿ; (*n*) = adimensional

Muestras	K _s	n _s	R ²	K _i	n _i	R ²
PLF sin esencia	128,92 ± 4,96	0,139 ± 0,006	0,999	21,02 ± 0,53	0,430 ± 0,002	0,937
PLF con esencia	158,44 ± 18,54	0,099 ± 0,011	0,993	20,28 ± 0,99	0,435 ± 0,002	0,940

En todos los casos, la Ley de Potencia modificada resultó adecuada para el estudio reológico en los PLF (elevados valores de R²), tanto para la curva superior como la inferior.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa (DES) entre los Índices de Consistencia (K) y entre los Índices de Comportamiento (n) de la curva superior (con menor tratamiento mecánico), con y sin saborizante, no así para la curva inferior.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de Perfil de Textura (TPA), por doble penetración (Instron Bluehill), con profundidad 30 mm, a una velocidad de 1 mm/s, con una celda de 10 N, diámetro del penetrómetro cilíndrico de 12 mm, diámetro de probeta de 36 mm (relación 1/3 para evitar efectos de borde), en condiciones de temperatura controlada a 10 ± 1 °C. A partir de los datos de la fuerza (N) vs. tiempo (seg) se determinaron los parámetros: Dureza, Cohesividad, Elasticidad, Adhesividad, Gomosidad y Masticabilidad, de los productos elaborados (Tabla 3). Estos resultados mostraron que el parámetro *adhesividad* (A) fue el más notorio, presentando para ambos PLF (con y sin esencia) una *dureza* (D) limitada, concluyéndose que no se necesita de una fuerza notoria para remover el material que queda adherido en la superficie bucal durante su consumo. Luego se observó un valor elevado de *elasticidad* (E) (máximo valor = 1), no evidenciándose diferencias estadísticamente significativas (DES) entre ambas formulaciones, lo cual indica que ambos presentaron el mismo grado de recuperación, luego de librarse del estrés (fuerza deformante) al que fueron sometidas sus correspondientes estructuras. La *cohesividad* (C) presentó valores intermedios adecuados. Los bajos valores de *gomosidad* y *masticabilidad*, podrían relacionarse con una fácil masticación y posterior deglución del producto, lo cual se relaciona con la *dureza* limitada. Esta podría elevarse simplemente aumentando la concentración de hidrocoloides y/o el % ST y/o la proporción entre cada materia prima en la formulación (LPE, LPD, WPC).

Tanto de la Tabla 3 como de la Figura 5 se observa que generalmente no existen DES entre los parámetros texturales, con y sin saborizante, salvo para la adhesividad (A), siendo ésta mayor cuando se utiliza esencia, en aproximadamente un 30 % respecto de cuándo no se utiliza.

Tabla 4. Valores promedios experimentales de parámetros texturales obtenidos en PLF, elaborados a partir de suero lácteo líquido. Parámetros texturales: dureza (D), cohesividad (C), elasticidad (E), adhesividad (A), gomosidad (G) y masticabilidad (M)

Muestras	D	C	E	A	G	M
PLF sin esencia	0.190 ± 0.004	0.685 ± 0.015	0.951 ± 0.007	1.631 ± 0.028	0.130 ± 0.000	0.124 ± 0.001
PLF con esencia	0.210 ± 0.001	0.672 ± 0.016	0.955 ± 0.011	2.165 ± 0.128	0.141 ± 0.003	0.135 ± 0.004

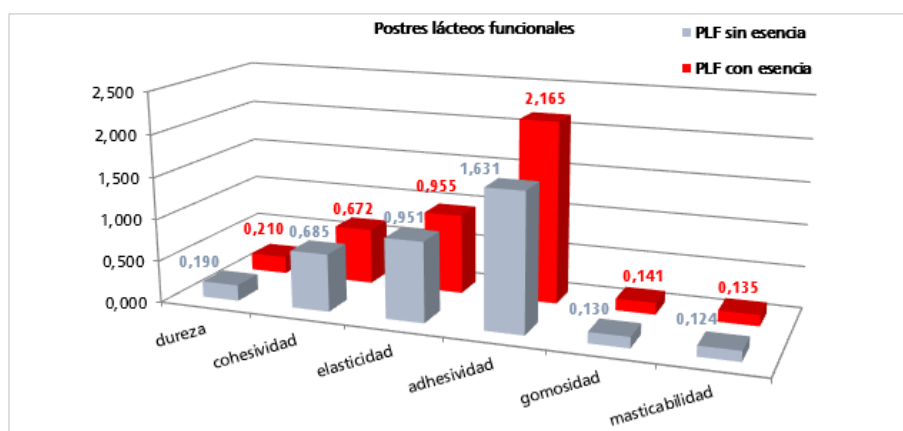


Figura 5. Valores experimentales de los PLF con y sin esencia

El análisis sensorial con un panel de evaluadores entrenados (ITA- FIQ- UNL, Santa Fe, Argentina) permitió observar que los PLF presentaron una elevada consistencia, cremosidad, uniformidad superficial y brillo, baja acidez y casi nula sinéresis.

Los resultados preliminares indican que es posible desarrollar PLF con buenas características generales, a partir de suero líquido, revalorizando este efluente sub-aprovechado, de difícil y costoso tratamiento, logrando un producto funcional de aceptación masiva, con elevado valor agregado.

6. Alimento infantil a base de leche de búfala

Los postres lácteos (también conocidos como *natillas*, *custards*, *panacotas*, etc.) resultan de la transformación de la leche en productos semisólidos por efecto de la incorporación de sólidos lácteos y/o ingredientes modificadores de la textura (almidones, gomas, etc.). Estos productos constituyen alimentos de preferencia en la población infantil, habiendo experimentado en los últimos años una gran diversificación en la oferta de productos con texturas, sabores y presentaciones variadas [28]. Sin embargo, a partir de un estudio exploratorio de productos similares existentes en el mercado argentino, se observó que todos son elaborados a partir de leche y derivados (leche en polvo, crema, etc.) de origen bovino. En este sentido, el empleo de fuentes lácteas distinta a la bovina, no solo posibilita el desarrollo de productos con calidad nutritiva diferenciada, sino que además plantea beneficios inminentes al ofrecer nuevas alternativas en la valorización de recursos localmente disponibles. No obstante, su aplicación requiere un estudio minucioso de las características finales del producto.

Como se ha indicado previamente, la leche de búfalas (*Bubalus bubalis*) constituye un alimento con numerosas propiedades nutritivas benéficas para los seres humanos y especialmente, para las poblaciones en etapa de crecimiento y establecimiento del estado nutricional. El desarrollo de productos lácteos a base de leche de búfalas, con buenas propiedades nutricionales, permitiría resolver carencias en la alimentación, contribuyendo así al mantenimiento de la salud en niños y adolescentes.

Ante ello, se realizó un estudio sensorial exploratorio a los efectos de evaluar la aceptabilidad de alimentos infantiles elaborados a base de leche de búfala, como así también, identificar aquellos atributos más influyentes en la respuesta hedónica del consumidor. Por tratarse de un producto destinado a la población infantil, resultó de especial importancia contar con el criterio y la percepción organoléptica de niños.

Para este estudio, se formularon tres alimentos lácteos (tipo postre) a base de leche de búfala de la región nordeste de Argentina, con grandes variaciones en su composición: almidón de maíz (4, 5 y 7 %), azúcar (10, 20 y 30 %) y colorantes/aromatizantes alimentarios (150, 300 y 450µL/100 mL de leche), siguiendo un diseño completamente aleatorizado (Tabla 4). Por sus distintas composiciones, los postres presentaron diferencias organolépticas fácilmente perceptibles. En comparación a los productos comerciales, los postres obtenidos presentaron mayor contenido de proteínas (> 4.5 %) y menor contenido de grasa (< 3.5 %), constituyendo así una alternativa de colación saludable y nutritiva para niños.

Tabla 5. Formulación final de los postres elaborados a base de leche de búfala

	Almidón, % p/v	Azúcar, % p/v	Colorante/aromatizante µ/100 g
Postre 1	4	20	450
Postre 2	5	30	150
Postre 3	7	10	300

El estudio de las propiedades sensoriales se llevó a cabo mediante la metodología del perfil ideal basada en preguntas CATA (*check all that apply*) (Figura 6).

Esta técnica permite de manera simultánea realizar una medida hedónica de los productos en estudio como así también, una descripción de sus atributos sensoriales. De acuerdo con la metodología, los consumidores deben marcar todos aquellos términos que consideren adecuados para describir a las muestras en estudio (29) Del mismo modo, se les solicita que indiquen aquellos términos que describen a su "producto ideal". Esto introduce una referencia en la evaluación, permitiendo obtener recomendaciones confiables para la reformulación del producto (30).

Tal como lo han indicado Ares y Jaeger (2015) (29) el éxito de esta prueba radica en los términos incluidos, los cuales deberían ser fáciles de entender. Con esta finalidad, se conformó una mesa redonda con participación de seis personas adultas relacionados con niños (padres, abuelos, etc.). A éstas, se les presentaron los productos a evaluar, motivándolos a expresar con lenguaje coloquial los

principales atributos del producto, que a su entendimiento podrían ser determinantes en la apreciación por parte de los niños. Atendiendo a sus sugerencias se definieron 14 términos correspondientes a los principales mecanismos de percepción sensorial (visual, táctil, olfativo y gustativo) resultando estos: "dulce", "poco dulce", "mucho gusto a leche", "poco gusto a leche", "blandito", "poco blandito", "gusto raro", "sin gusto raro", "cremoso", "poco cremoso", "olor a vainilla", "menos olor a vainilla", "amarillo fuerte" y "amarillo claro".


EDAD: _____ años


Instrucciones


- Probá y marcá con "X" todo lo que corresponda.
- Al terminar podés pedir un poco de agua.


LETRAS : _____

¿Te gustó?












<input type="checkbox"/> Mucho gusto a leche <input type="checkbox"/> Dulce <input type="checkbox"/> Blandito <input type="checkbox"/> Gusto raro <input type="checkbox"/> Poco cremoso <input type="checkbox"/> Olor vainilla <input type="checkbox"/> Amarillo fuerte	<input type="checkbox"/> Poco dulce <input type="checkbox"/> Amarillo claro <input type="checkbox"/> Menos blandito <input type="checkbox"/> Sin gusto raro <input type="checkbox"/> Menos olor a vainilla <input type="checkbox"/> Cremoso <input type="checkbox"/> Poco gusto a leche
---	---


LETRAS : _____

¿Te gustó?












<input type="checkbox"/> Mucho gusto a leche <input type="checkbox"/> Dulce <input type="checkbox"/> Blandito <input type="checkbox"/> Gusto raro <input type="checkbox"/> Poco cremoso <input type="checkbox"/> Olor vainilla <input type="checkbox"/> Amarillo fuerte	<input type="checkbox"/> Poco dulce <input type="checkbox"/> Amarillo claro <input type="checkbox"/> Menos blandito <input type="checkbox"/> Sin gusto raro <input type="checkbox"/> Menos olor a vainilla <input type="checkbox"/> Cremoso <input type="checkbox"/> Poco gusto a leche
---	---


LETRAS : _____

¿Te gustó?










<input type="checkbox"/> Mucho gusto a leche <input type="checkbox"/> Dulce <input type="checkbox"/> Blandito <input type="checkbox"/> Gusto raro <input type="checkbox"/> Poco cremoso <input type="checkbox"/> Olor vainilla <input type="checkbox"/> Amarillo fuerte	<input type="checkbox"/> Poco dulce <input type="checkbox"/> Amarillo claro <input type="checkbox"/> Menos blandito <input type="checkbox"/> Sin gusto raro <input type="checkbox"/> Menos olor a vainilla <input type="checkbox"/> Cremoso <input type="checkbox"/> Poco gusto a leche
---	---

POSTRECITO IDEAL



<input type="checkbox"/> Mucho gusto a leche <input type="checkbox"/> Dulce <input type="checkbox"/> Blandito <input type="checkbox"/> Gusto raro <input type="checkbox"/> Poco cremoso <input type="checkbox"/> Olor vainilla <input type="checkbox"/> Amarillo fuerte	<input type="checkbox"/> Poco dulce <input type="checkbox"/> Amarillo claro <input type="checkbox"/> Menos blandito <input type="checkbox"/> Sin gusto raro <input type="checkbox"/> Menos olor a vainilla <input type="checkbox"/> Cremoso <input type="checkbox"/> Poco gusto a leche
---	---

Figura 6. Instrumento de recolección de datos para la evaluación sensorial con niños (8-13 años), según metodología del perfil ideal basada en preguntas CATA (*Check all that apply*)

En la evaluación sensorial participaron 100 niños de 8 a 13 años de edad (Figura 7) requiriéndose en todos los casos el consentimiento firmado de los padres. Aproximadamente 30 g de muestras se sirvieron a 4 °C en envases de polipropileno provistos con tapa y cucharitas. Se utilizó agua mineral como borrador. Las pruebas se efectuaron en un salón (25 °C, luz artificial y circulación de aire), con guía de un panelista líder, cuya presencia fue necesaria para el mantenimiento del orden y el cumplimiento de las consignas.



Figura 7. Evaluación sensorial con jueces consumidores con edades comprendidas entre 8 y 13 años

En términos generales, todas las formulaciones presentaron gran aceptabilidad con puntajes comprendidos entre 3 y 5 según la escala estructurada de 5 puntos (“Me disgusta muchísimo” =1; “No me gusta” =2; “No me disgusta ni me gusta” =3; “Me gusta” =4 y “Me gusta muchísimo” =5). Entre las muestras se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), resultando los Postres 1 y 2 los de mayor aceptabilidad y el Postre 3 el de menor aceptabilidad.

Los resultados de las preguntas CATA se analizaron siguiendo un código binario donde 1=marcado y 0=sin marcar. Seguidamente se calculó la frecuencia de uso de cada término (frecuencia porcentual, %) para cada muestra y se las comparó mediante el Test Q de Cochran. De acuerdo con esta prueba, las muestras resultaron diferentes ($p < 0.05$) para 11 de los términos incluidos, excepto para “mucho gusto a leche”, “poco gusto a leche” y “menos olor a vainilla”, interpretándose que para dichos atributos las muestras fueron percibidas similares entre sí.

Adicionalmente, se realizó un Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) sobre los resultados de aquellos términos del cuestionario CATA que presentaron diferencias significativas entre las muestras. En la Figura 8 se representan gráficamente las relaciones donde cada término, cada postre formulado y el ideal, son ubicados en el mapa de correspondencia.

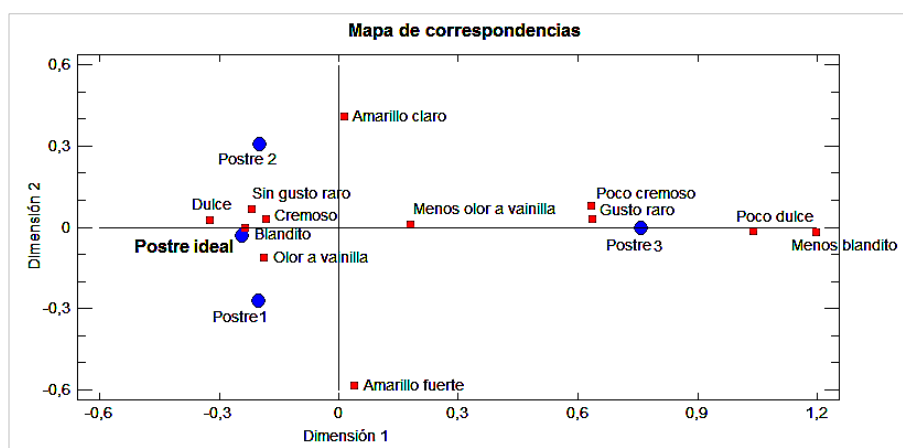


Figura 8. Representación de los términos (■), muestras y postre ideal (●) en las primeras dos dimensiones del Análisis de Correspondencia Múltiple de las preguntas CATA

La primera dimensión del ACM (76 % de la varianza), permitió diferenciar con gran capacidad discriminativa dos grupos de muestras con características diferentes. Por un lado, los Postres 1 y 2 se relacionaron con los términos blandito, cremoso y dulce, lo cual concuerda con las formulaciones, en tanto estos presentaron las concentraciones alta e intermedia de azúcar y las concentraciones media y baja de almidón (Tabla 4). Por otro lado, el Postre 3 se correlacionó con los términos poco cremoso, menos blandito, poco dulce y gusto raro, lo cual puede explicarse considerando su mayor proporción de almidón y menor proporción de azúcar. Atendiendo al significado de los atributos, la primera dimensión estuvo correlacionada a las características de sabor y textura.

La segunda dimensión del ACM (17 % de la varianza), ordenó las muestras respecto a la intensidad del color (propiedades cromáticas), resultando consistente con la concentración de colorante añadido (Tabla 4).

La representación simultánea del “Postre ideal”, permitió observar su proximidad (respecto del primer componente) a los Postres 1 y 2, los cuales resultaron los de mayor aceptabilidad. De acuerdo con Worch y col. (2014) (31), la información del producto ideal puede considerarse consistente si su descripción resulta similar a la de el/los productos de mayor aceptabilidad. Esto podría indicar que los Postres 1 y 2 presentaron texturas y sabores similares al esperado, siendo estos atributos direccionadores de preferencia. Sin embargo, respecto de la segunda dimensión, el Postre ideal, resultó más similar al Postre 3 (de menor preferencia), indicando con ello que a pesar de que el color no fue un direccionador de preferencia, la concentración intermedia de colorante permitiría alcanzar las propiedades cromáticas identificadas en el ideal.

Por lo anteriormente expuesto, los Postres 1 y 2 fueron identificados como los postres con mayor potencial para ser reformulados. A partir del estudio de las frecuencias de uso de términos para la descripción del postre ideal y de los Postres 1 y 2 se podrían obtener direcciones de reformulación para para aproximarlos al ideal (máximo de aceptabilidad). En este sentido las diferencias más notorias implican considerar que para el Postre 1 debe aumentarse la cremosidad, mientras que en el Postre 2 es necesario aumentar la intensidad del color y del sabor a vainilla para alcanzar en ambos casos el máximo de aceptabilidad.

Los resultados alcanzados permiten concluir que pueden desarrollarse postres lácteos a base de leche de búfalas con buenas propiedades nutritivas y gran aceptabilidad.

7. Conclusiones

El avance en la ciencia y tecnología de la leche ha permitido disponer de numerosas metodologías y herramientas que posibilitan el análisis y desarrollo de productos innovadores y comercialmente viables en un contexto demandante de alimentos saludables, con buenas propiedades organolépticas. El uso de ingredientes subproductos de la industria láctea y fuentes lácteas no convencionales amplía y diversifica la oferta de productos existentes en el mercado, brindando nuevas oportunidades para la valorización de recursos subvalorados.

El desarrollo y comercialización de productos de origen lácteo con características diferenciadas, innovadoras, saludables y funcionales, permitirá aumentar la sustentabilidad y rentabilidad de las empresas relacionadas (principalmente lácteas), aumentando así los desarrollos regionales y poblacionales, inclusive de aquellos que actualmente son considerados de bajos recursos.

Referencias

1. Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchia, R., & Carlucci, D. (2017). Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. *Appetite*, 113, 141-154.
2. Jenness, R., & Walstra, P. (1984) *Dairy chemistry and physics*. Wiley.
3. Wong, N.P. (2012). *Fundamentals of dairy chemistry*. Springer Science & Business Media.
4. Costa, F.F., Brito, M.A., Furtado, M., Martins, M.F., Oliveira, M.D., Barra, P., Garrido, L., & Santos, A.O. (2014). Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffer effects and quantitative approaching. *Analytical Methods*, 6, 1666-1673.
5. Bütikofer, U., Meyer, J., & Rehberger, B. (2006). Determination of the percentage of α -lactalbumin and β -lactoglobulin of total milk protein in raw and heat treated skim milk. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 61, 263-266.
6. Goetz, H., Kuschel, M., Wulff, T., Sauber, C., Miller, C., Fisher, S., & Woodward, C. (2004). Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 60, 281-93.
7. Santos, A.O., Meurer, V.M., Costa, F.F., Paiva, I.M., Fogaça, G.N., Egito, A.S., Furtado, M., & Martins, M. (2018). Major goat milk protein: separation and characterization by "lab-on-a-chip" microfluidic electrophoresis. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 35(2).
8. Wu, D., Qin, J., & Lin, B. (2008). Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography a*, 1184, 542-559.
9. Li, H., Dauriac, V., Thibert, V., Sénéchal, H., Peltre, G., Zhang, X., & Descroix, S. (2010). Micropillar array chips toward new immunodiagnosis. *Lab on a chip*, 10, 2597-604.
10. Mayer, H.K., Buerger, J., & Kaar, N. (2012). Quantification of cow's milk percentage in dairy products – a myth? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 3031-3040.
11. Anema, S.G. (2009). The use of "lab-on-a-chip" microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. *International Dairy Journal*, 19(4), 198-204.
12. Ramos, T.d.M. (2013). Tipos de pasteurização e agentes coagulantes na fabricação do queijo tipo prato. In: *Lavras: UFLA*. 2013, (p. 233). Brasil. Universidade Federal de Lavras.

13. Costa, F.F., Resende, J.V., Abreu, L.R., & Goff, H.D. (2008). Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. *Journal of dairy science*, *91*, 2165-74 .
14. Buffoni, J.N., Bonizzi, I., Pauciuolo, A., Ramunno, L., & Feligini, M. (2011). Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Food Chemistry*, *127*, 1515-1520.
15. Haenlein, G. (2007). About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Research*, *68*, 3-6.
16. Park, Y.W., & Haenlein, G.F. (2008). *Handbook of milk of non-bovine mammals*. John Wiley & Sons.
17. Suárez, V. (2004). Lechería ovina y raza Pampinta. *IDIA XXI*, *4*(7), 194-200.
18. Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, *68*, 88-113.
19. Park, Y.W. (2009). *Bioactive components in milk and dairy products*. John Wiley & Sons.
20. Rincón, F., Moreno, R., Zurera, G., & Amaro, M. (1994). Mineral composition as a characteristic for the identification of animal origin of raw milk. *Journal of Dairy Research*, *61*, 151-154.
21. Park, Y. (2007). Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, *68*(1-2), 73-87.
22. Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small ruminant research*, *79*(1), 57-72.
23. Patiño, M.E. (2011). Producción y calidad de la leche bubalina. *Revista Tecnología en Marcha*, *24*(5), 25.
24. Correddu, F., Serdino, J., Manca, M.G., Cosenza, G., Pauciuolo, A., Ramunno, L., & Macciotta, N.P.P. (2017). Use of multivariate factor analysis to characterize the fatty acid profile of buffalo milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, *60*, 25-31.
25. Sales, D.C., Rangel, A.H.N., Urbano, S.A., Freitas, A.R., Tonhati, H., Novaes, L.P., Pereira, M.I.B., & Borba, L.H.F. (2017). Relationship between mozzarella yield and milk composition, processing factors, and recovery of whey constituents. *Journal of dairy science*, *100*(6), 4308-4321.
26. Brijesha, N., & Aparna, H. (2017). Comprehensive characterization of bioactive peptides from Buffalo (*Bubalus bubalis*) colostrum and milk fat globule membrane proteins. *Food research international*, *97*, 95-103.
27. Livney, Y.D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current opinion in colloid & interface sci.* *15*(1-2), 73-83.
28. Saunders, A.B. (2016) *Dairy Desserts, in Reference Module in Food Science*. Elsevier.
29. Ares, G., & Jaeger, S. (2015). Check-all-that-apply (CATA) questions with consumers in practice: Experimental considerations and impact on outcome. In: *Rapid sensory profiling techniques*. (p. 227-245). Elsevier.
30. Bruzzone, F., Vidal, L., Antúnez, L., Giménez, A., Deliza, R., & Ares, G. (2015). Comparison of intensity scales and CATA questions in new product development: Sensory characterisation and directions for product reformulation of milk desserts. *Food Quality and Preference*, *44*, 183-193.
31. Worch, T., Crine, A., Gruel, A., & Lê, S. (2014). Analysis and validation of the Ideal Profile Method: Application to a skin cream study. *Food Quality and Preference*, *32*, 132-144.

Capítulo 12

Alternativas para ampliar el potencial de gomas de fuentes regionales

Verónica María Busch^{1,2}, María Pilar Buera¹, Fernando Ferreyra³,
Luis Alberto Pannizzolo Martínez⁴

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Argentina.

²Universidad Nacional de Entre Ríos. Facultad de Bromatología, Gualeguaychú. Argentina.

³Universidad de la República. Facultad de Medicina. Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados. Uruguay.

⁴Universidad de la República. Facultad de Química. Dpto Ciencia y Tecnología de Alimentos. Uruguay.

Resumen

Existen diversas fuentes de galactomananos en la naturaleza, que le confieren características diferentes según sea su peso molecular, su grado de sustitución en la cadena polimérica, y su grado de pureza. En la última década se ha buscado nuevos recursos para extraer galactomananos. Esto provocó la extracción y caracterización de las gomas extraídas de los endospermos de algunas leguminosas de la región noreste de la Argentina y Uruguay (*Prosopis ruscifolia*, *Prosopis affinis*). Estas se destacan por ser una fuente muy abundante subexplotada y sus gomas poseen características fisicoquímicas particulares (gran grado de sustitución, alta solubilidad, gran poder viscosante). Los galactomananos pueden ser utilizados como espesantes, encapsulantes, estabilizantes, pero también en aplicaciones especiales como en películas comestibles, como matriz para vehiculizar drogas, para mejorar la estabilidad textural en proceso de congelamiento, y otras. Estas variadas aplicaciones pueden diversificarse aún más si se considera el producto de la hidrólisis de los galactomananos (enzimática, por microondas, o por ultrasonido), cuya viscosidad y peso molecular es reducida permitiendo su utilización en productos donde el proceso o el producto no permita altas viscosidades, por ejemplo, en bebidas y refrescos. En este trabajo se muestra cómo es posible reducir el peso molecular de galactomananos por dos métodos de hidrólisis y así ampliar sus aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimenticia, petrolera, textil y otras.

1. Introducción

1.1. Gomas

En sus orígenes el término goma era empleado para referirse a los productos de la exudación de algunas plantas y árboles; sin embargo, en la actualidad su uso se ha extendido a un grupo muy amplio de polisacáridos de alto peso molecular, obtenidos de plantas a nivel de tallo y semilla o por producción microbiológica, que tienen la capacidad de actuar como espesantes y gelificantes al mezclarse con agua fría o caliente y que además presentan algunas propiedades funcionales tales como las de estabilizar emulsiones, espumas y suspensiones (1-2).

Las gomas (hidrocoloides) son ampliamente utilizados a nivel mundial en diversos tipos de industrias, entre las que se pueden destacar: confitería, dulces, jugos y bebidas, como estabilizante en alimentos de bajas calorías, en la industria farmacéutica en cosmética, en perfumería, en la industria minera como coadyuvante en procesos de extracción y en la industria de la explotación gasífera y para otros fines industriales (textiles, pinturas, barnices, colas, adhesivos, tinta de escribir e imprenta, etc.) (3)

En los alimentos estas gomas se agregan como aditivos con capacidad de espesar, gelificar, ligar líquido, mejorar las características texturales, evitar o controlar la cristalización de agua o azúcares, para evitar la sinéresis y controlar la retrogradación del almidón, para una mayor adecuación al proceso de congelamiento-descongelamiento, y para estabilizar la turbidez en jugos y bebidas (4).

Las gomas de mayor aplicación industrial provienen de semillas de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), *Ceratonía siliqua* (garrofin), *Caesalpinia spinosa* (tara) (5) de los exudados gomosos de *Acacia senegal* (goma arábiga), (6-7) y de las algas de la familia *Rhodophyceae* (carragenaninas) y de la clase *Phaeophyceae* (alginatos) (2, 8). En las industrias alimenticia, cosmética, farmacéutica y nutracéutica todas estas gomas son ampliamente utilizadas.

1.2. Cuando las gomas son galactomananos

Cyamopsis tetragonoloba, *Ceratonia siliqua* y *Caesalpinia spinosa* pertenecen la familia *Leguminaceae* (leguminosas) y las gomas presentes en sus semillas son galactomananos. Ellos se encuentran sobre todo en el endospermo de las semillas de esas leguminosas como componentes de almacenamiento de la pared celular y reservas energéticas (9). Ellos son los galactomananos de mayor uso industrial e importancia comercial (10-11).

Los galactomananos son polisacáridos neutros formados por una cadena principal lineal de D-manosas (unidas en β (1-4)) con ramificaciones (uniones α (1-6)) de D-galactosas (12).

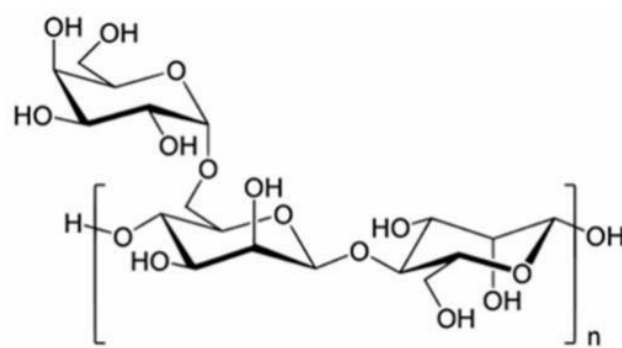


Figura 1. Estructura genérica de un galactomanano

Se diferencian entre sí en la relación manosa: galactosa (M:G) y en la distribución de ramas de galactosa individuales en la cadena principal, como así en el tamaño molecular, que influye en propiedades como la solubilidad, y el comportamiento reológico (9). La masa molecular, la relación M:G y la distribución secuencial de los sustituyentes de galactosa depende del origen del galactomanano (13). La goma acasia, goma de algarrobo, goma tara, goma guar y la goma de fenogreco se diferencian estructuralmente pues sus galactomananos presentan relaciones M:G de 5, 4, 3, 2 y 1, respectivamente (14).

Polimanano	-M-M-M-M-M-M-M-M-M-M
Galactomanano – G:M 1:5. Goma de sófora A partir de endospermo de <i>Sophora japonica</i> o <i>Styphnolobium japonicum</i>	-M-M-M-M-M-M-M-M-M-M- G G G
Galactomanano – G:M 1:4. Goma garrofín o de algarrobo A partir de endospermo de <i>Ceratonia siliqua</i>	-M-M-M-M-M-M-M-M-M-M- G G G
Galactomanano – G:M 1:3. Goma tara A partir de endospermo de <i>Caesalpinia spinosum</i>	-M-M-M-M-M-M-M-M-M-M- G G G G
Galactomanano – G:M 1:2. Goma guar A partir de endospermo de <i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	-M-M-M-M-M-M-M-M-M-M- G G G G G G
Galactomanano – G:M 1:1. Goma de alholva o fenogreco A partir de endospermo de <i>Trigonella foenum-graecum</i>	-M-M-M-M-M-M-M-M-M-M- G G G G G G G G G G

Figura 2. Estructura de galactomananos. La relación M: G depende del origen botánico del galactomanano. M: manosa - G: galactosa

2. Propiedades funcionales y utilización de los galactomananos

Los galactomananos de acuerdo a sus propiedades físico-químicas y estructurales, pueden ser usadas como agentes espesantes, estabilizantes de emulsiones y suspensiones, inhibidores de sinéresis, siendo muy utilizadas en las industrias alimentarias, cosméticas, farmacéuticas y textiles (15).

Los galactomananos son muy versátiles presentan diferentes aplicaciones tales como espesantes, estabilizadores de emulsión, formación de película, y como inhibidores de la cristalización y sinéresis; además de la industria de alimentos tienen aplicación en varios campos productos farmacéuticos, cosméticos, cuidado personal, textil, papel, minería, explosivo, y perforación de yacimientos petroleros (11,16). En la industria alimentaria específicamente se utilizan habitualmente como espesantes, estabilizantes y sustitutos de grasa en helados y salsas, entre otros productos (17), así como por proporcionar mejores características organolépticas a los alimentos industrializados (18). El uso de goma de mezquite (*Prosopis pallida*) para reemplazar parcialmente la grasa láctea en la producción de queso sería ventajosa teniendo en cuenta sus propiedades estabilizantes y de espesamiento. (19). Otra propiedad interesante de los galactomananos es su capacidad para formar mezclas sinérgicas con otros polisacáridos tales como goma xantana y κ -carrageninas, debido a que forman soluciones altamente viscosas y geles más fuertes (11, 20-22). Mikkonen *et al.* (23) informaron que el uso de galactomananos para la formación de películas comestibles sería una buena alternativa.

La goma de mesquite (*Prosopis spp.*) se utilizó para la microencapsulación de *Lactobacillus spp.* con el método de polimerización de interfaz logrando interesantes resultados (24). Además, se ha reportado que los galactomananos no son absorbidos por el cuerpo humano y forman parte de la fibra soluble por lo que su consumo puede aportar beneficios para la salud, estabilizando la curva de glucosa y mejorando la eliminación del colesterol (12).

Además, existe una patente que reivindican el uso de galactomananos combinados con otras fibras de origen vegetal como componente principal en cápsulas y tabletas para regular el movimiento intestinal en personas sanas y también como un suplemento dietético para personas con enfermedades diabéticas (25).

3. Relación estructura-funcionalidad en galactomananos

La proporción de galactosas que ramifican la cadena de manosas determina tanto la estructura como las características de funcionalidad de los galactomananos, su solubilidad, su habilidad para retener agua y sus parámetros reológicas. Estos últimos son esenciales para determinar su habilidad como agente espesante (el parámetro que se mide generalmente es la viscosidad) y pueden variar entre distintos galactomananos (19,26-28).

Las propiedades funcionales de los galactomananos están fuertemente relacionadas a su masa molar y características estructurales. El grado de sustitución de los galactomananos afecta su dispersabilidad en agua y es determinante en la capacidad de esas moléculas para interactuar entre si y con otros polisacáridos (29-32). El nivel de distribución de galactosa sobre la cadena principal ocupa un papel importante en las propiedades físico-químicas del polímero (33). La dispersabilidad en agua de los galactomananos se incrementa con el aumento de las ramas de galactosa simples. (34-35). Según Sittikijyothin *et al.* (36), propiedades como la viscosidad y el efecto sinérgico con otros polisacáridos está directamente relacionada al tamaño y masa molar y a la relación M: G. La viscosidad de las soluciones depende principalmente de la masa molar, mientras que las interacciones sinérgicas parecen estar determinado por la relación (M:G) y el patrón de distribución de galactosa en la cadena de galactomanano (37-39).

Estudios de las propiedades mecánicas y térmicas de diferentes formulaciones de películas comestibles han demostrado que galactomananos con diferente relación M: G tienen diferentes comportamientos funcionales (23). La relación M:G proporciona variaciones de tamaño molecular y en la distribución de unidades de galactosa a lo largo de la cadena de los galactomananos, tanto sean oriundos de diferente o de la misma especie, y esos factores influyen fuertemente en las interacciones moleculares y las propiedades reológicas de sus dispersiones acuosas (40). La relación M: G depende tanto de la fuente vegetal como del método de extracción utilizado.

La solubilidad depende mucho del contenido de galactosa, y de su distribución. El galactomanano del sago (*Metroxylon amicarum*) es totalmente insoluble en agua, y no tiene aplicaciones alimentarias. Por

el contrario, la goma de fenogreco es la más soluble de todas, la goma guar se puede disolver en agua a temperatura ambiente, y la goma garrofín es soluble a temperaturas cercanas a los 80 °C. La gran habilidad de estos hidrocoloides radica en que pueden absorber líquido y aumentar mucho la viscosidad en sistemas acuosos aún a bajas concentraciones de polisacárido; y debido a que no poseen grupos funcionales adicionales, su comportamiento no depende del pH, manteniendo sus propiedades inalteradas en un amplio rango de pH (entre 3,5 y 11). Se ha evidenciado que a valores de pH menores o iguales a 3, los galactomananos pierden sus propiedades, se degradan por hidrólisis (36).

En análisis termogravimétricos la temperatura de la primera pérdida de masa ha sido atribuida a la pérdida de agua adsorbida y estructural del biopolímero o debido a la desorción de agua unida a la estructura del polisacárido por puentes de hidrógeno (41). A su vez Williams *et al.* (42) describieron la existencia de una buena correlación entre la temperatura de transición (de gelificación y de fusión) obtenida por análisis de calorimetría diferencial de barrido y la evolución del módulo de almacenamiento G' (que describe el comportamiento viscoelástico lineal) en geles de mezclas de galactomananos y goma xantana. La diferente composición de monosacáridos, enlaces y configuraciones α/β , y masa molecular que presentan los galactomananos puede influir en su bioactividad (43). Ha sido demostrado que la proporción de galactosa en la cadena de galactomanano tienen un profundo efecto sobre sus propiedades reológicas tal como lo indica el ejemplo de goma de algarrobo (M: G = 4) y goma guar (M:G = 2), donde se sabe que tienen propiedades superiores de auto interacción y gelificación en sistemas mixtos (44). La dilucidación de la estructura de los galactomananos es necesaria y muy importante.

4. Hidrólisis de galactomananos

Como se ha comentado anteriormente, hay una gran número y variedad de aplicaciones y usos de galactomananos en la industria, que incluyen la de agente espesante, estabilizante, modificador de textura, encapsulante y en recubrimientos, películas y cápsulas blandas (22, 45-48) que dependen de sus características fisicoquímicas. Sin embargo, muchas de estas aplicaciones están restringidas por su alta viscosidad y alto peso molecular. Como resultado, las gomas de galactomanano despolimerizadas o sin ramificaciones aumentan la solubilidad en agua, disminuyen la viscosidad de la suspensión y amplían la diversidad de aplicaciones, funcionalidades y productos.

4.1. Métodos de hidrólisis

Muchos estudios han intentado la hidrólisis de las gomas utilizando una variedad de métodos: ácido, enzimático, por ultrasonido, microondas o una combinación de ellos. La hidrólisis de polímeros puede realizarse por varios mecanismos. Por ejemplo, la cadena polimérica podría romperse al azar, con igual probabilidad de hidrólisis para todos los enlaces. También podría ser que las cadenas más largas tengan mayor probabilidad de hidrolizarse, o que determinada posición en la cadena sea más susceptible o lábil. Según como sea el mecanismo será la distribución de peso molecular y las características de los hidrolizados obtenidos.

4.1.1. Ultrasonido

La técnica de ultrasonido es actualmente muy utilizada para degradar polímeros naturales y disminuir su peso molecular. Piculell *et al.* (1997) degradaron por ultrasonido la κ -carragenina obteniendo un peso molecular de 50-100 kDa (la sin tratar tenía 300-400 kDa) (49). Los hidrolizados mostraron mayor velocidad de equilibrio y un diagrama de estado diferente a la κ -carragenina sin degradar.

4.1.2. Enzimática

Las hidrólisis utilizando enzimas han demostrado ser eficientes para la degradación de galactomananos (utilizados como fluidos de fractura en pozos de petróleo y gas) porque se pueden realizar en bajas concentraciones de enzimas; su peso molecular es relativamente alto y por eso no se filtran en la roca como es el caso de los de bajo peso molecular; son amigables con el medio ambiente; y son menos susceptibles a cambios dramáticos por contaminantes (50). Estos autores encontraron que la cinética de degradación cambiaba según el régimen que se encontrara (muy diluido, la velocidad de reacción es de primer orden con respecto a la concentración de sustrato y en un régimen intermedio, la enzima está saturada y la

cinética de degradación es de orden cero). Además, Cheng y Prud'homme (2000), observaron que, dada la especificidad de la hidrólisis enzimática, la estructura del sustrato (tipo de sustituyentes y grado de sustitución) influye en gran manera sobre la cinética de degradación enzimática (50).

4.1.3. Ácida

Algunos autores desarrollaron un procedimiento para la hidrólisis ácida de la goma guar, con diferentes resultados para varios pesos moleculares con baja polidispersidad (26). Por otro lado, estos autores vieron que utilizando un método enzimático con endo- β -mananasa extraída de *Aspergillus niger* se obtenía mayor polidispersión y una distribución más amplia de pesos moleculares que con el método ácido.

4.1.4. Métodos combinados

Algunos autores evaluaron la combinación de métodos de hidrólisis. Propajat y Gogate (2015) compararon las hidrólisis por ultrasonido y por radiación con microondas, y su combinación, en galactomananos de goma guar (51). Estos autores encontraron que la hidrólisis por ultrasonido era más efectiva que con microondas, y la tasa de hidrólisis evaluada por la reducción de la viscosidad intrínseca mayor aplicando ultrasonido conjuntamente con un iniciador (persulfato de potasio) y a altas temperaturas (50 °C).

Estos autores también evaluaron la combinación de métodos de hidrólisis (51). Estos autores evaluaron el efecto del ultrasonido con la actividad de la enzima celulasa para hidrolizar la goma guar. La aplicación de ultrasonido mejoró el grado de despolimerización y además redujo el tiempo de hidrólisis en comparación con la técnica enzimática convencional. Los parámetros cinéticos y termodinámicos relacionados con la hidrólisis también se ven modificados con la adición del ultrasonido (reducción de la energía de activación, entalpía, entropía y energía libre). La combinación de métodos mejora la hidrólisis polimérica y hace más eficiente la reducción de la viscosidad intrínseca de la goma guar.

5. Aplicaciones de los hidrolizados

Mudgil *et al.* (2018) realizaron una hidrólisis enzimática de la goma guar y la utilizaron como prebiótico en cepas de bacterias ácido lácticas (probióticos) comparándola con la goma guar nativa y glucosa (52). Las seis variedades de bacterias probióticas estudiadas asimilaron bien la goma guar hidrolizada, sugiriendo que la goma guar parcialmente hidrolizada se puede considerar como un posible compuesto prebiótico que puede estimular aún más el crecimiento de bacterias potencialmente probióticas o microflora intestinal nativa. Además, se logró mejorar la solubilidad de la goma guar y se obtuvo una interesante disminución de la viscosidad por hidrólisis con la enzima pectinasa (53).

En su trabajo, Burke *et al.* (2005) utilizaron la enzima α -galactosidasa para romper las ramificaciones de la goma guar y aumentar en la cadena polimérica de manosas las zonas libres de galactosas (54). De esta manera lograron favorecer la cantidad de "superenlaces" y lograr las combinaciones de fuerza y baja difusión requeridas para la encapsulación y vehiculación controlada de medicamentos. Entonces a través de la hidrólisis enzimática de galactomananos es posible cambiar las propiedades del material encapsulante y cambiar la cinética de liberación del fármaco en hidrogeles de goma guar.

6. Hidrólisis de goma guar y goma de vinal (*Prosopis ruscifolia*)

La goma de vinal es extraída del endospermo de las semillas de *Prosopis ruscifolia*, una especie colonizadora del noreste argentino que fue declarada plaga nacional en 1941. Debido a su gran abundancia en una zona económicamente vulnerable, la extracción y aplicación de la goma de vinal podría convertirse en generadora de un impulso económico y productivo con múltiples ventajas para toda la región. Similar a otras gomas en varios aspectos, su composición es del tipo galactomanano (M/G=1,6) y su peso molecular de 1.6×10^5 Da (55). Su composición, estructura, constitución monosacáridica, relación manosa/galactosa, parámetros reológicos, transiciones térmicas, entre otras propiedades fisicoquímicas la convierten en un potencial sustituto (de origen argentino) de la goma guar para diferentes aplicaciones tanto alimenticias como en farmacéutica, petrolera, y otras.

En el presente trabajo se evaluaron dos tipos de hidrólisis (ultrasonido y enzimática) de tres galactomananos diferentes y a diferentes tiempos de tratamiento. La figura 3 muestra la comparación de los resultados obtenidos de viscosidad dinámica a 100 (s⁻¹) para: goma guar (GG, extraída de *Cyamopsis tetragonoloba*, con una relación M/G de 1,8), goma de vinal (VG, extraída de *Prosopis ruscifolia*, con M/G 1,6 (55); y goma garrofín (LBG, *locust bean gum*, M/G de 4).

Se puede observar que el tratamiento por ultrasonido (GGU, VGU y LBGU) disminuye la viscosidad gradualmente y no se llega a niveles tan bajos como con el tratamiento enzimático. Se puede observar comparando los resultados de la GG y la VG, con similar relación manosa/galactosa, que la hidrólisis en GG fue más rápida que en GG con el método ultrasonido. Por otro lado, la LBG se observa un leve incremento de la viscosidad a tiempo 15 minutos de hidrólisis por ultrasonido. Esto puede deberse a la incompleta hidratación y desplegamiento de la goma en las condiciones iniciales (T₀). Se podría decir que además de la relación M/G podrían estar influyendo otros factores como el peso molecular, la composición, el origen botánico de la goma y otros parámetros. El tratamiento enzimático aplicado logra disminuir la viscosidad más del 95 % en menos de 15 minutos para las tres gomas. Se puede concluir que es posible reducir la viscosidad de los galactomananos de una forma drástica y rápidamente por el método enzimático aplicado y por otro lado es posible obtener hidrolizados de viscosidad específica aplicando un método por ultrasonido a diferentes intervalos de tiempos según el requerimiento reológico del producto.

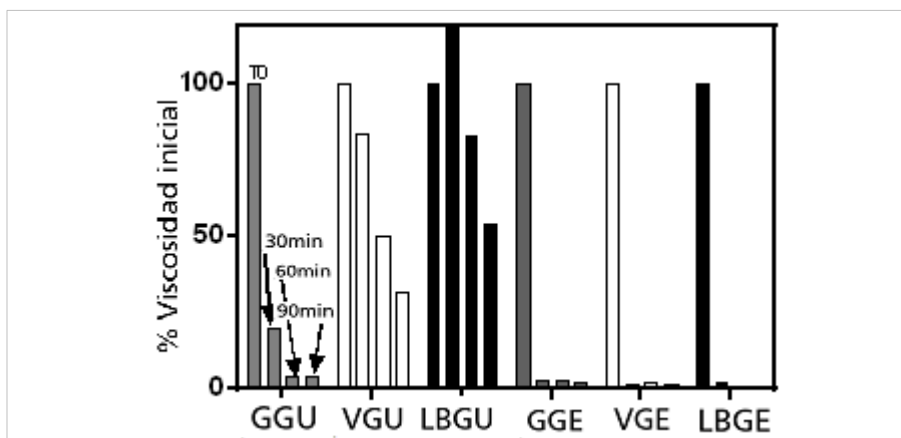


Figura 3. % Viscosidad Inicial en función del tipo de galactomanano (goma guar –GG, goma de vinal-VG y goma garrofín o locust beam gum-LBG) y tipo de hidrólisis (ultrasonido- U y enzimático-E)

7. Conclusiones

Los galactomananos de fuentes regionales poseen una gran variedad de aplicaciones en las industrias alimenticias, textil, farmacéutica, petrolera y otras. Dichas aplicaciones podrían ser aún ampliadas y diversificadas para un mayor aprovechamiento y para el desarrollo de productos innovadores. Por ejemplo, los galactomananos que las componen se pueden hidrolizar por ultrasonido, por métodos enzimáticos, por microondas, tratamiento ácido o por combinación de estas técnicas. A través de esta hidrólisis es posible obtener productos de menor peso molecular, menor viscosidad y con propiedades fisicoquímicas y funcionales diferentes a las gomas nativas, que amplían su potencial.

Referencias

1. Valdés Martínez, S.E. (2006) Hidratos de carbono. En: *Química de los alimentos*. 4 ed. (p. 29-117). México, S. Pearson Educación.
2. Gutiérrez de Gotera, O., de Servodio, O.A., León de Pinto, G., Abed El Kader, A.D., & Molina, E. (2007) Análisis fisicoquímico y estructural del polisacárido de la goma de semilla de *Leucaena leucocephala*. *Ciencia*, 15 (4), 481–487.

3. Rozycki, V.R. (2007). *Evaluación de las características reométricas de hidrocoloideos obtenidos de semillas de Prosopis sp. (Algarrobos)*. Tesis Maestría. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
4. Williams, P., & Phillips, G. (2001). Introduction to food hydrocolloids. In: *Handbook of hydrocolloids*. (p. 447). Cambridge. Woodhead
5. Haber, B. (2002). Carob fiber benefits and applications. *Cereal foods world*, 47 (8), 365-369.
6. Wang, W., & Anderson, D.M.W. (1994). Non-food applications of tree gum exudates. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 14 (3), 67-76.
7. Estévez, A., Sáenz, C., Hurtado, M.L., Escobar, B., Espinoza, S., & Suárez, C. (2004). Extraction methods and some physical properties of mesquite (*Prosopis chilensis* (mol) stuntz) seed gum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1487-1492.
8. Whistler, R.L., & Daniel, J.R. (1992). Carbohidratos. En: *Química de los alimentos*. Zaragoza. Acribia..
9. Pinto Vieira, Í.G., Pereira Mendes, F., Gallão, M.I., & Brito, E.S. (2007). NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry*, 101, 70-73.
10. Seisun D. (2002). Overview of the hydrocolloid market. In: *Gums and stabilisers for the food industry*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, 11: 3-9.
11. Wielinga, W.C. (2009). Galactomannans. En: Phillips, G.O. & Williams, P.A. (Eds.), *Handbook of hydrocolloids*. 2nd ed. (p. 228-251). Cambridge, Woodhead.
12. Rincón, F. (2013). Propiedades Físicoquímica, Reológica y funcionalidad de la goma de semilla de *Prosopis juliflora* "cují". Tesis. Universidad de Córdoba, España.
13. Azero, E., & Andrade, C. (2006). Characterization of *Prosopis juliflora* seed gum and the effect of its addition to κ -carrageenan systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 844-850.
14. Iijima, M., Hatakeyama, T., & Hatakeyama, H. (2012). Effect of side chain on thermal properties of galactomannan polysaccharides. *15th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry*.
15. Fernandes de Souza, C. (2009). *Galactomanana de sementes de Caesalpinia ferrea var. ferrea: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades*. Tesis Maestría, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.
16. Braun, D.B., & Rosen, M.R. (2010) *Rheology Modifiers Handbook. Practical Use and Applications*. New York, EEUU, William Andrew Publishing.
17. Pollard, M.A., & Fischer, P.A. (2006). Partial aqueous solubility of low galactose content galactomannans. What is the quantitative basis?. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 184-190.
18. Shirani, G., & Ganesharane, R. (2009). Extruded products with Fenugreek (*Trigonella foenum-graecium*) chickpea and rice: Physical properties, sensory acceptability and glycaemic index. *Journal of Food Engineering*, 90, 44-52.
19. López-Franco, Y.L., Cervantes-Montaño, C.I., Martínez-Robinson, K.G., & Lizardi-Mendoza, J. (2013). Physicochemical characterization of galactomannans from seed of mesquite tree (*Prosopis* sp.). *Food Hydrocolloids*, 30 (3), 656-660.
20. Morris, E., Rees, D., Robinson, G., & Young, G.A. (1980). Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharide systems. *Journal of molecular biology*, 138 (2), 363-374 .
21. Sworn G. (2010). Xanthan gum. In: Imeson, A. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. (p. 325-342) Chichester. Wiley-Blackwell.
22. Pinheiro, A., Bourbon, A.I., Rocha, C., Ribeiro, C., Maia, J., Gonçalves, M.P., Teixeira, J., & Vicente, A.A. (2011). Rheological characterization of κ -carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 83, 392-399.
23. Mikkonen, K.S., Rita, H., Helén, H., Talja, R.A., Hyvönen, L., & Tenkanen, M. (2007). Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. *Biomacromolecules*, 8, 3198-3205.
24. Yáñez-Fernández, J., Ramos-Ramírez, E.G., & Salazar-Montoya, J.A. (2008) Rheological characterization of dispersions and emulsions used in the preparation of microcapsules obtained by interfacial polymerization containing *Lactobacillus* sp. *European Food Research and Technology*, 226 (5), 957-966.
25. Saura-Calixto, F., Bravo-Clemente, L., Goñi-Cambrodón, I., & Martín-Carrón N. (1999). Fibra dietética conteniendo galactomananos. Oficina Española de Patentes y Marcas. Número de publicación: 2 136 038. España.
26. Cheng, Y., Brown, K.M., & Prud'homme, R.K. (2002). Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. *International journal of biological macromolecules*, 31, 29-35.

27. Dakia, P.A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22 (5), 807-818.
28. Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Ribeiro, C., Miranda, C., Maia, J.M., Teixeira, J.A., & Vicente, A.A. (2010). Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: Comparison with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*, 24 (2-3), 184-192.
29. McCleary, B., Amadó, R., Waibel, R., & Neukom, H. (1981). Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydrate Research*, 92, 269-285.
30. Lazaridou, A., Biliaderis, C., & Izydorczyk, M. (2001). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 68-75.
31. Mao, C., & Chen, J. (2006). Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: An interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids*, 20, 730-739.
32. Secouard, S., Grisel, M., & Malhiac, C. (2007). Flavour release study as a way to explain xanthan-galactomannan interactions. *Food Hydrocolloids*, 21, 1237-1244.
33. Ganter, J.L.M.S. (1991) *Estudos dos carboidratos de sementes de Mimosa scabrella (bracatinga) - Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana*. Tesis Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.
34. Sierakowski, M.R., Milas, M., Desbrières, J. & Rinaudo, M. (2000). Specific modifications of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 42, 51-57.
35. Jian, H., Carrasco, C., Zhang, W., & Jiang, J. (2011). Influence of dehulling pretreatment on physicochemical properties of *Gleditsia sinensis* Lam. gum. *Food Hydrocolloids*, 25, 1337-1343.
36. Sittikijyothin, W., Torres, D., & Gonçalves, M.P. (2005). Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 59, 339-350.
37. Dea, I.C., Clark, A.H., & McCleary, B. (1986). Effect of the molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties – the role of unsubstituted sides. *Food Hydrocolloids*, 1, 129-140.
38. Fernandes, P., Gonçalves, M.P., & Doublier, J. (1991). A rheological characterization of kappa-carrageenan /galactomannan mixed gels: a comparison of locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers*, 16, 253-274.
39. Schorsch, C., Gamier, C., & Doublier, J. (1997) Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum. *Carbohydrate Polymers*, 34 (3), 165–175.
40. Dakia, P.A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22, 807-818.
41. Vendruscolo, C.W., Ferrero, C., Pineda, E.A., Silveira, J., Freitas, R.A., Jiménez-Castellanos, M.R., & Bresolin, T.B. (2009). Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella* : Effect of drying method. *Carbohydrate Polymers*, 76, 86-93.
42. Williams, P.A., Cleeg, S.M., Day, D.H., & Phillips, G.O. (1991). Mixed gels formed with konjac mannan and xanthan gum. In: *Food Polymers, Gels and Colloids*. (p. 339-348). London, Dickinson. Royal Society of Chemistry.
43. Lehtovaara, B.C., & Gu, F. (2011). Pharmacological, structural, and drug delivery properties and applications of 1,3-β-glucans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (13), 6813-6828
44. Davis, A., Hoffmann, R., Russell, A.L., & Debet, M. (1995). 1H- and 13C-NMR characterization of the digalactosylmannopentaose liberated from legume seed galactomannan by β-mannanase action. *Carbohydrate Research*, 271, 43-54.
45. Busch, V.M., Pereyra-Gonzalez, A., Šegatin, N., Santagapita, P.R., Ulrich, N.P., & Buera, M. (2017). Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. *Lwt - Food Science and Technology*, 75, 227-235.
46. Busch, V.M., Delgado, J., Santagapita, P.R., Wagner, J., & Buera, M. (2018). Rheological characterization of vinal gum, a galactomannan extracted from *Prosopis ruscifolia* seeds. *Food Hydrocolloids*, 74, 333-341.
47. Cerqueira, M., Pinheiro, A., Souza, B.W., Lima, A.P., Ribeiro, C., Miranda, C., Teixeira, J., Moreira, R., Coimbra, M., Gonçalves, M.P., & Vicente, A. (2009). Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate Polymers*, 75, 408-414.
48. Wu, Y., Cui, W., Eskin, N., & Goff, H.D. (2009). An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. *Food Research International*, 42, 1141-1146.

49. Piculell, L., Borgström, J., Chronakis, I., Quist, P., & Viebke, C. (1997). Organisation and association of κ -carrageenan helices under different salt conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 141-153.
50. Cheng, Y., & Prud'homme, R.K. (2000). Enzymatic degradation of guar and substituted guar galactomannans. *Biomacromolecules*, 1 (4), 782-788.
51. Prajapat, A.L., & Gogate, P. (2015). Depolymerization of guar gum solution using different approaches based on ultrasound and microwave irradiations. *Chemical Engineering and Processing*, 88, 1-9.
52. Mudgil, D., Barak, S., Patel, A., & Shah, N. (2018). Partially hydrolyzed guar gum as a potential prebiotic source. *International journal of biological macromolecules*, 112, 207-210.
53. Shobha, M.S., Kumar, A.B., Tharanathan, R., Koka, R., & Gaonkar, A.K. (2005). Modification of guar galactomannan with the aid of *Aspergillus niger* pectinase. *Carbohydrate Polymers*, 62, 267-273.
54. Burke, M.D., Park, J., Srinivasarao, M., & Khan, S. (2005). A novel enzymatic technique for limiting drug mobility in a hydrogel matrix. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 104, 141-53.
55. Busch, V.M., Kolender, A., Kolender, A.A., Santagapita, P.R., Buera, M.P., & Buera, M. (2015). Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis rusCIFolia* seeds: Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*, 51, 495-502.

Capítulo 13

Uso de hidrocoloide no convencional como modificador de viscosidad y textura: goma espina corona

Milagros López Hiriart^{1,2}, Leonardo Calderon³, Juliana Bordino⁴, María Eugenia Hidalgo^{4,5}, Sergio Rozycki³, Patricia Hilda Risso^{1,4,5}

¹Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Santa Fe, Casilda, Argentina

²Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario. Argentina

³Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, Instituto de Tecnología de Alimentos. Área Leche y Productos Lácteos, Santa Fe. Argentina

⁴Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Argentina

⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina

Resumen

La goma espina corona (GEC), obtenida de las semillas de la leguminosa *Gleditsia amorphoides*, es un galactomanano hidrocoloide neutro y no gelificante, que posee una proporción de manosa/galactosa y características físicas, químicas, reológicas y tecnológicas similares a la goma guar (GG). En este capítulo se informa respecto de la sustitución de GG por GEC en la fórmula de crema base para helados (CBH), postre lácteo (PL) y queso untable (QU). En primer lugar, se relata el efecto de la sustitución de GG por GEC sobre el comportamiento reológico de cremas base para helados con contenido reducido de colesterol. La adición de GEC generó un comportamiento reológico diferente al observado para las CBH en presencia de GG siendo la viscosidad de las CBH ligeramente mayor al adicionar esta última goma. En segundo término, se informa respecto del reemplazo de GG por GEC sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales y sensoriales de un PL fortificado con calcio. Los valores del índice de consistencia fueron mayores para las muestras elaboradas con GEC que con GG (a igualdad de concentración), aproximadamente en un 50 % para el postre recién elaborado y hasta un 75 % al final del almacenamiento (30 días). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la adición de GG o GEC en los parámetros de textura mecánica. Por último, se reporta el efecto comparativo de GG por GEC sobre las características fisicoquímicas, reológicas y sensoriales de QU con contenido de Col reducido y fortificados con zinc. Se determinó que la sustitución de GG por GEC en la fórmula de los QU desarrollados puede ser viable debido a que, en general, la estabilidad del producto en el tiempo, las características texturales y los valores de los descriptores sensoriales no presentaron alteraciones significativas como consecuencia de la sustitución.

1. La goma espina corona

Una goma puede ser definida, en sentido amplio, como cualquier polisacárido soluble en agua, extraído a partir de vegetales terrestres o marinos o de microorganismos, que poseen la capacidad, en solución, de incrementar la viscosidad y/o de formar geles (1, 2). Las gomas pueden emplearse en la industria alimentaria como agentes emulsificantes, estabilizantes y espesantes. Algunas, además, son agentes gelificantes, aumentan la consistencia, son agentes de suspensión y tienden a aumentar la capacidad de dispersión de gases en sólidos o líquidos (3).

En particular, los galactomananos son gomas hidrocoloides neutros y no gelificantes provenientes del endosperma de las semillas de una gran variedad de leguminosas. Estos polisacáridos consisten en una cadena lineal de unidades (1→4)-β-D-manopiranosicas con unión en posición 6 de residuos -D-galactopiranosica. La relación manosa/galactosa (M/G) puede variar de 10 a 1 dependiendo del origen del galactomanano (4). Entre las gomas vegetales ampliamente utilizadas como ingredientes y/o aditivos de muchos alimentos se encuentran los galactomananos provenientes de las semillas de *Cyamopsis tetragonoloba* (goma guar) y de *Ceratonia siliqua* (goma garrofin).

La *Gleditsia amorphoides*, mejor conocida como "espina corona" o "coronillo", es una leguminosa nativa de América del Sur, que crece espontáneamente en los bosques y selvas de Argentina, en las provincias de Chaco, Formosa, Corrientes, Misiones, Entre Ríos, Salta, Jujuy y norte de Santa Fe, y en

las regiones adyacentes de Bolivia, Paraguay, Brasil y Uruguay. Es un árbol que alcanza 12-15 m de altura y 30-60 cm de diámetro, cuyo tronco y ramas tienen muchas espinas rojizas, ramificadas y de gran desarrollo (Figura 1a).



Figura 1. (a) *Gleditsia amorphoides*. (b) Fruto

La fruta de la *G. amorphoides* es una legumbre generalmente falcada, rígida, negruzca, de 6-8 cm de largo y 2-3 cm de ancho, con 6-10 semillas de forma oblongo-ovoide, de forma redondeada, 8-10 mm de largo y 4-6 mm de grosor, color oliva a canela (Figura 1b) (5). Del endospermo de las semillas se extrae la goma espina corona (GEC). La GEC es un polisacárido que posee una proporción de M/G y características físicas, químicas, reológicas y tecnológicas similares a las gomas guar (GG) y garrofín (LBG). Debido a esto, algunos autores han considerado que la GEC podría sustituir a la GG y a la LBG como aditivo alimentario (6-8).

En este capítulo se informa respecto a los efectos de la sustitución de GG por GEC en la fórmula de crema base para helados, postre lácteo y queso untable.

En primer lugar, se realizó una escarificación química de las semillas de GEC utilizando una solución de ácido sulfúrico concentrado, para mejorar la pureza física, debido a la degradación que produce el ácido sobre la cutícula, la cual luego se elimina a través de una operación extensa de lavado y frotamiento con agua destilada (9). Con el fin de disminuir el porcentaje de humedad en las semillas a un nivel que favorezca el proceso posterior de molienda, se le sometió a un secado en estufa ($45 < T < 50$ °C) durante 24 h. Por último, se molieron las semillas de GEC para separar el endosperma del resto de los componentes para obtener, con un posterior tamizado selectivo, una harina de GEC sin presencia de partículas indeseables (oscuras) y de aspecto suficientemente uniforme. La GG fue de procedencia comercial (Sigma-Aldrich, Argentina).

2. Efecto comparativo de la GG y la GEC sobre el comportamiento reológico de cremas base para helados

Con el objeto de evaluar si la sustitución de GG por GEC puede generar cambios significativos en el comportamiento reológico de cremas base para helados (CBH) con contenido reducido de colesterol, se realizaron reogramas de dichas CBH en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de GG y GEC.

Las CBH se obtuvieron a partir de leche bovina entera en polvo (Milkaut, Argentina) reconstituida en agua destilada al 13 % P/V (3,5 % de materia grasa) a la que se adicionó crema de leche (La Cabaña, Argentina) en cantidad necesaria para obtener un 6 % de materia grasa final. La mezcla se agitó durante 15 min a 50 °C, se pasteurizó durante 5 min a 80 °C, se dejó enfriar hasta temperatura (T)

ambiente y finalmente se homogeneizó durante 30 s a 25.000 rpm con un homogeneizador mecánico (OMNI GLH, EUA). Esta homogeneización, previa a la adición del agente extractor del colesterol (Col), se realizó con el fin de romper la membrana exterior de los glóbulos grasos para favorecer la liberación de las moléculas de Col contenidas en dicha membrana y en el núcleo de los glóbulos grasos y su posterior interacción con el agente extractor (10). Además, esta homogeneización permitió reducir el tamaño de los glóbulos grasos, distribuyendo la materia grasa de modo más uniforme en la matriz (11).

Luego se procedió a la remoción del Col por el método de acomplejamiento por inclusión empleando ciclodextrina β CD- (Roquette, Francia) como agente extractor, en una proporción de 1 % por cada 3,5 % de materia grasa (MG) (12). La β CD se adicionó en estado sólido y bajo agitación durante 20 min a T ambiente y velocidad constante para favorecer la interacción con el Col. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 2.200 rpm durante 15 min a 15°C utilizando una centrifuga termostatazada (Sigma Laboratory Centrifuges 3-18 KH, UK). El complejo β CD-Col se separó del sobrenadante, el cual contiene la CBH con contenido de Col reducido.

Para obtener el porcentaje de extracción de Col (%ExtCol) se cuantificó la concentración de Col, antes y después de la extracción con β CD, mediante una técnica enzimático-colorimétrica utilizando el kit comercial Colestat® (Wiener Lab., Argentina) (10, 13). Previamente se realizó una saponificación sobre la muestra a medir, seguida de la extracción del Col con n-hexano (Cicarelli, Argentina) de acuerdo a la técnica reportada por Pavón y col. (2014) (14). Se obtuvo un % Ext Col de 81,13 %.

El análisis reológico se realizó sobre las CBH con contenido de Col reducido, adicionadas de 1 % de concentrado proteico de lactosuero -WPC35- (Milkaut, Argentina) y distintas concentraciones de GG o GEC (0, 0,05; 0,10 y 0,20 % P/P). Para ello se utilizó un viscosímetro rotacional (Brookfield LVDV-III, Alemania) con geometría cono-plato, termostatazado a (24 ± 1) °C, el cual aplica un esfuerzo tangencial o de corte (τ) sobre la muestra fluida, realizando barridos ascendentes y descendentes de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$).

En la Figura 2a se muestra el efecto de la adición de diferentes concentraciones de GG. En ausencia de GG y en presencia de la menor concentración del galactomanano, se puede observar un comportamiento tixotrópico, especialmente a bajas $\dot{\gamma}$ ($<100 \text{ s}^{-1}$). Mientras que al aumentar la cantidad de GG adicionada, el perfil reológico se transforma en Newtoniano. Por otra parte, a altas $\dot{\gamma}$ ($>100 \text{ s}^{-1}$), se revela un aumento de la viscosidad a medida que se incrementa la concentración de GG.

En la Figura 2b se muestra el efecto de diferentes concentraciones de GEC adicionadas a la CBH. A todas las concentraciones de GEC, se observa un comportamiento tixotrópico de la mezcla. Sólo a elevadas $\dot{\gamma}$ ($>200 \text{ s}^{-1}$), la viscosidad aumenta al incrementar la concentración de GEC. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, la adición de GEC a las CBH genera un comportamiento reológico diferente al observado para las CBH en presencia de GG. Por otra parte, se evidenció que, a una misma concentración de polisacárido, la viscosidad de las CBH al adicionar GG es ligeramente mayor que la obtenida en presencia de GEC.

Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados, el reemplazo del hidrocoloide importado GG por el autóctono GEC sería factible, pero se debería adicionar cantidades levemente mayores de GEC para alcanzar un poder espesante equivalente al de la GG.

3. Efecto de la sustitución de GG por GEC sobre las características fisicoquímicas, reológicas, texturales y sensoriales de un postre lácteo

Se evaluó el efecto de la sustitución de GG por GEC en un postre lácteo fortificado con ion calcio. Para la elaboración del postre lácteo se preparó una base láctea constituida por leche fluida entera (Sancor Coop. Unidas Ltd. SRL, Argentina) calentada a 50 °C, leche en polvo entera en una proporción de 8–10 % P/P; leche en polvo descremada y WPC 35 (Milkaut, Argentina), ambos al 2-3 % P/P, y sacarosa 6-10 % hasta lograr un porcentaje de sólidos totales de ~30 %. La GEC o la GG se adicionaron alternativamente variando su concentración (0,5; 0,6 y 0,7 % P/P). El rango de concentraciones se eligió de acuerdo con experiencias previas, intentando obtener productos de consistencias similares a los del mercado argentino. Los ingredientes se mezclaron por agitación mecánica intensa. Se calentó la mezcla hasta 75 °C durante 5 min para pasteurizar y favorecer la hidratación del hidrocoloide; luego se enfrió hasta 50 °C y se agregaron los

restantes aditivos: citrato de calcio (100-300 ppm), sorbato de potasio (200-300 ppm), ácido cítrico (0,15-0,35 % P/V) y saborizante de esencia de vainilla (0,5-1mL/kg). A continuación, la mezcla se homogenizó a una presión de 30 bar en un homogenizador de planta piloto (Simes S.A., Argentina) a 100 L/h, para lograr una mejor distribución de los ingredientes, mejorar las características texturales (suavidad superficial y brillo) y favorecer la estabilidad del producto final (15). Finalmente, se disminuyó rápidamente la temperatura a 10 °C, para luego almacenar dicho producto a temperatura de conservación (< 5 °C).

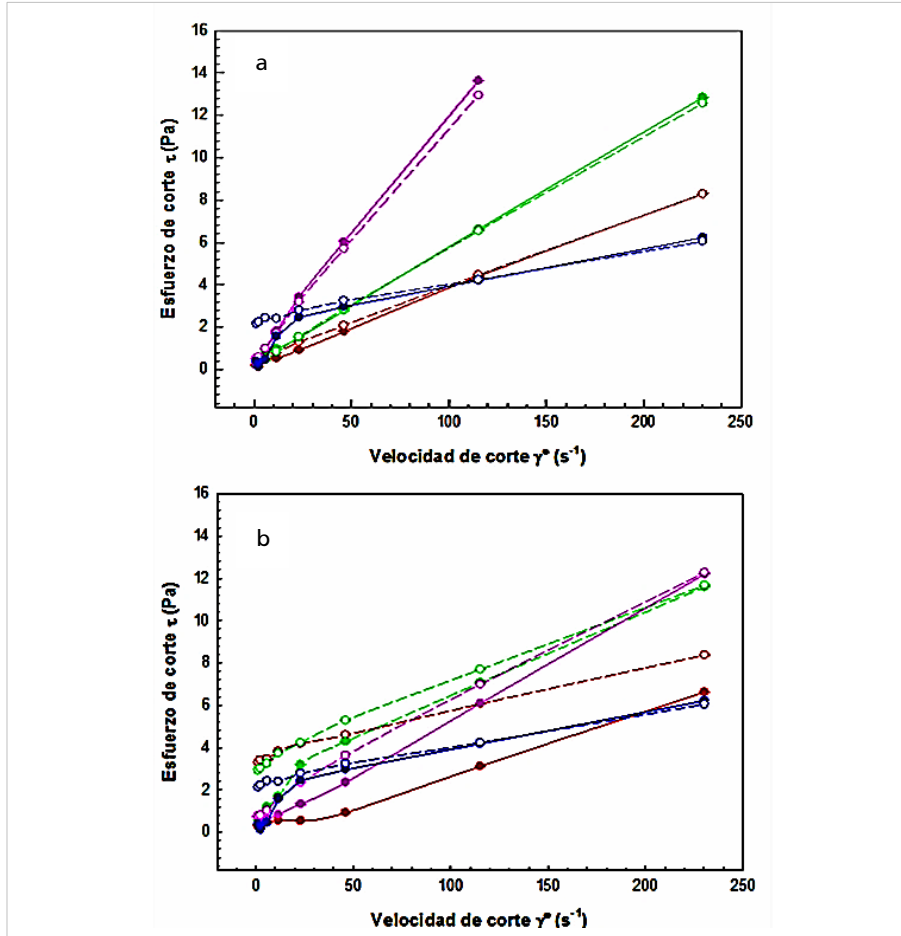


Figura 2. Gráfico de τ vs $\gamma\dot{\cdot}$ para la CbH tratada con 1 % de β CD, con adición de 1 % de WP y en ausencia (azul) y en presencia de 0,05 (rojo); 0,10 (verde) y 0,20 % (fucsia) P/P de GG (a) o GEC (b); $\gamma\dot{\cdot}$ ascendente (círculos llenos), $\gamma\dot{\cdot}$ descendente (círculos vacíos)

Durante la vida útil del producto, se determinó la composición fisicoquímica de las muestras. Los valores de composición química de los postres lácteos con GEC y con GG no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), sin observarse variaciones en el tiempo. Durante el almacenamiento, las muestras tampoco presentaron variaciones significativas de acidez y pH (< 10 %), lo cual indica una elevada estabilidad, principalmente microbiológica. La retención de agua fue siempre superior al 99 %, lo que indica una muy elevada estabilidad de la matriz alimenticia, sin sinéresis, debido a la adecuada formulación y condiciones de proceso.

El nivel de fortificación con calcio fue del 20 % (200 ppm de calcio, agregado como citrato de calcio). Además, se realizaron ensayos reológicos (reometría destructiva) con un viscosímetro de cilindros concéntricos Rheolab QC (Anton-Paar, Austria), a 10 °C, obteniendo reogramas (τ vs. $\gamma\dot{\cdot}$), primero ascendente (0 hasta 200 s^{-1}) y luego descendente (200 hasta 0 s^{-1}). Se calcularon los parámetros representativos del comportamiento de flujo: el índice de consistencia (K), relacionado en forma directa

con la consistencia y la viscosidad, y el índice de comportamiento (n), que indica la desviación del comportamiento respecto al newtoniano ($n = 1$) (Vanegas Pérez, 2009), aplicando modelos reológicos adecuados como la Ley de potencia (ec. 1) y Ley de potencia linealizada (ec. 2):

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma} \cdot^n \quad (1)$$

$$\ln \mu = \ln K + (n-1) \cdot \ln \dot{\gamma} \quad (2)$$

donde μ es la viscosidad (Pa.s) (16).

Los datos de los parámetros reológicos obtenidos indicaron que las muestras con GG y GEC se caracterizaron por ser fluidos no-Newtonianos (valores de $n \neq 1$), presentando un comportamiento tixotrópico ($0 < n < 1$), con marcada histéresis en los reogramas, también durante su almacenamiento. De esta manera, la viscosidad del producto no es constante y depende del gradiente de deformación a la que se evalúe, al igual que del tiempo de acción mecánica (tixotropía). Los valores del índice de comportamiento inferior (n_i), calculados con los valores experimentales de la curva descendente del reograma, son un poco mayores respecto a los superiores (n_s) que fueron obtenidos a $\dot{\gamma}$ ascendentes (Tabla 1), lo cual se debe a que en el primer caso las muestras son tratadas mecánicamente durante mayor tiempo, es decir, las muestras son sometidas a mayor tiempo de cizallamiento. Para productos tixotrópicos se corresponden con una mayor caída de viscosidad (mayor fluidez), asemejándose más a un fluido Newtoniano, cuyo valor es $n = 1$, por lo cual estos valores ascienden desde la curva ascendente a la curva descendente. Los valores de K fueron mayores para las muestras elaboradas con GEC que con GG (a igualdad de concentración), aproximadamente en un 50 % para el postre recién elaborado y hasta un 75 % al final del almacenamiento (30 días).

Los valores de n suelen acompañar la tendencia respecto a que cuanto mayor es K (mayor consistencia y viscosidad) menor es n , y el fluido se aleja más del comportamiento newtoniano (17, 18). En este caso se observó un aumento de n y una disminución de K a medida que aumenta el tiempo de cizallamiento sobre la muestra (mayor acción mecánica). El mismo efecto se presentó durante el período de almacenamiento de las muestras (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedios experimentales de los parámetros reológicos obtenidos para los postres lácteos a partir de la curva ascendente (K_s , n_s) y descendente (K_i , n_i) en presencia de GG o GEC 0,7 %

Día	Muestras	Parámetros Reológicos					
		K_s (Pa.s ^{n_s})	n_s	R^2	K_i (Pa.s ^{n_i})	n_i	R^2
1º	GG	46,36 ± 4,32	0,21 ± 0,01	0,99	17,47 ± 0,80	0,38 ± 0,00	0,96
	GEC	68,01 ± 5,44	0,18 ± 0,02	0,99	19,46 ± 0,95	0,40 ± 0,00	0,97
30º	GG	11,34 ± 0,07	0,35 ± 0,00	0,99	4,08 ± 0,15	0,51 ± 0,00	0,92
	GEC	19,72 ± 1,22	0,31 ± 0,01	0,99	6,84 ± 0,47	0,50 ± 0,00	0,93

Contrariamente a estos resultados, en otros productos lácteos se ha observado que durante el almacenamiento los valores de K aumentan, y disminuyen los de n , alejándose más del comportamiento Newtoniano. Esto podría deberse a la compleja formulación del producto, y a cambios en el tiempo como por ejemplo formación de enlaces intra e intermoleculares favorecidos por la baja movilidad de las moléculas a causa de la baja temperatura. Los valores elevados de K se deben a fuertes interacciones en la estructura, con participación activa del hidrocoloide utilizado (19).

Por otra parte, se realizó un ensayo del perfil de textura por doble penetración en una máquina universal de ensayos (InstronBluehill®, Canadá), con profundidad de 30 mm, a una velocidad de 1 mm/s, con una celda de carga de 10 N, diámetro del penetrómetro cilíndrico de 12 mm, diámetro de probeta de 36 mm (relación 1/3 para evitar efectos de borde), en condiciones de temperatura controlada a (10±1) °C. A partir de los datos de la fuerza (N) vs. tiempo (s) se determinaron los parámetros dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad de los productos elaborados (Figura 3 y Tabla 2).

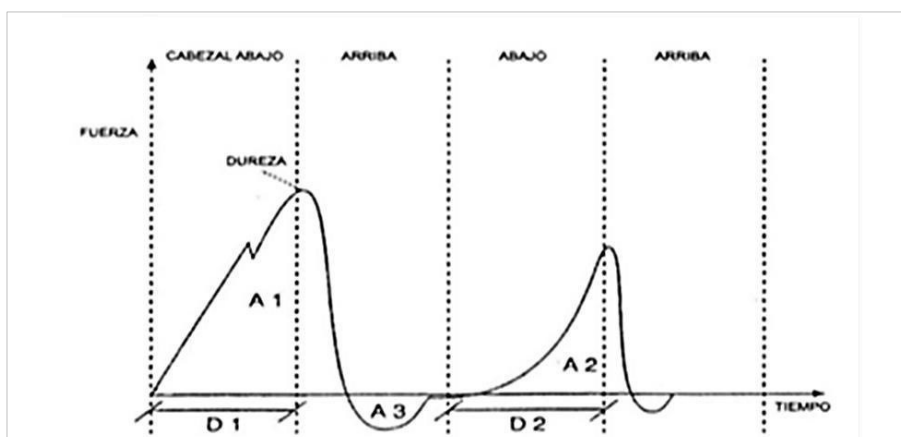


Figura 3. Curva de análisis de perfil de textura

El análisis de los parámetros texturales indicó que los postres lácteos presentaron una adecuada firmeza, requiriendo un esfuerzo intermedio para separar el producto del paladar (adhesividad media), con bajo esfuerzo, tiempo y cantidad de masticaciones (baja gomosidad y masticabilidad), con una estructura que no se desmoronó fácilmente (mayor cohesividad), presentando la misma un elevado grado de recuperación (elevada elasticidad) luego de librarse del estrés en la masticación. No se encontraron estadísticamente diferencias significativas entre la adición de GG o GEC.

Tabla 2. Parámetros del perfil de textura. Definiciones y relaciones

Parámetro	Descripción Física	Descripción Gráfica
Dureza (D)	Resistencia a una deformación dada. Fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los molares (sólidos), o entre lengua y paladar (semisólidos).	Fuerza o pico (máximo) del primer ciclo
Cohesividad ϵ	Grado de deformación del alimento antes de alcanzar su punto de ruptura. Grado en que una sustancia es comprimida entre los dientes o dedos antes de romperse.	Asociado al autosostén de la estructura. Área 2 (A2) / Área 1 (A1)
Elasticidad ϵ	Grado de recuperación del alimento luego de provocarle una deformación (compresión con los molares).	Distancia 2 (D2) / Distancia 1 (D1)
Adhesividad	Fuerza necesaria para separar el sensor de la muestra. Fuerza requerida para retirar el material que se adhiere al paladar, dientes y labios, durante el consumo, es decir, para superar la pegajosidad.	Área 3 (A3)
Gomosidad	Energía requerida para desintegrar un alimento semisólido y pasarlo a un estado listo para ser deglutido. Densidad y viscosidad que se percibe durante la masticación.	D x C
Masticabilidad	Número de masticaciones necesarias para que el producto colocado entre los molares se encuentre listo para deglutir.	D x C x E

Además, se realizó una evaluación sensorial con un panel de evaluadores entrenados (ITA- FIQ-UNL). Se evaluaron descriptores de textura, *flavor* y defectos de muestras codificadas y termostatizadas a 10 °C. Los análisis se realizaron a los 15 días posteriores a la elaboración de las muestras (tiempo de vida media).

Los postres lácteos fortificados con ion calcio presentaron claramente características sensoriales beneficiosas con elevada consistencia y cremosidad, lo que supone una ventaja para este tipo de productos, y características sensoriales negativas muy leves, como la aspereza y astringencia. Por ende, el producto obtenido posee textura suave, homogénea y de consistencia y cremosidad adecuadas. En los descriptores de *flavor*, el gusto dulce fue superior por sobre el resto. Luego, el descriptor crema fue el más puntuado, siendo mayor en la muestra con GG que con GEC, con valores bajos de descriptores como sabor a cocido, leche en polvo y ácido. Los descriptores de defectos se encontraron evaluados entre "apenas" y "moderadamente perceptibles".

4. Efecto de la sustitución de GG por GEC sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de un queso untable

Se pretendió determinar el efecto de la sustitución de GG por GEC sobre las características fisicoquímicas, reológicas y sensoriales de quesos untables (QU) con contenido de Col reducido y fortificados con zinc. Para la obtención de los QU, en primer lugar, se reconstituyó leche en polvo entera en agua destilada (23 %P/P), a 50 °C, con agitación durante 10 min en un agitador de paletas (100 rpm). Esta mezcla se pasteurizó a 75 °C y se homogeneizó utilizando un homogeneizador a válvula de dos etapas (Simes S.A., Argentina) a una presión de 150 atm. Se tomaron muestras por triplicado para la determinación del contenido de Col.

Para realizar la extracción del Col, la leche en polvo reconstituida se enfrió hasta 30 °C y se le adicionó 1,75 %P/P de β CD, se agitó 30 min y por último se centrifugó durante 30 min a 2.000 rpm. Los valores óptimos de las variables que influyen sobre la eficiencia del proceso de extracción de Col (temperatura y presión de homogeneización, concentración de β CD, temperatura y tiempo de contacto con la mezcla a tratar, vigorosidad aplicada durante la agitación, temperatura y tiempo de centrifugación para la separación del complejo β CD/Col) se obtuvieron del trabajo de Galante y col. (2016) (13). El precipitado (complejo β CD/Col) se separó del sobrenadante y se continuó trabajando con la mezcla base con contenido de Col reducido (MB). Además, se elaboró un QU control a partir de una mezcla base sin extracción de Col (MBC).

La MB y la MBC se calentaron hasta 50 °C para favorecer la disolución e hidratación de los ingredientes y aditivos secos incorporados. Se adicionaron, bajo agitación, WPC (3,5 %P/P), leche en polvo descremada (3,5 %P/P), almidón modificado de mandioca al 0,1 %P/P (Glutal S.A., Argentina), gelatina (PB Leiner, Argentina) al 0,03 %P/P, GG o GEC (0,10 %P/P) y estabilizante comercial (Veneto, Argentina) al 0,25 %P/P, todos previamente mezclados. La leche en polvo descremada se adicionó para asegurar la formación de un coágulo de adecuada compactación debido a que durante el proceso de extracción del Col se disminuye la concentración de caseínas y a que las temperaturas utilizadas promueven la desnaturalización de las proteínas del suero y su asociación a las caseínas (CN), principalmente formando el complejo β -lactoglobulina/ κ -CN. Los hidrocoloides se agregaron para incrementar la capacidad de ligar agua por parte de las proteínas y para favorecer el desarrollo de textura y firmeza, disminuyendo así la posibilidad de sinéresis del producto durante su vida de anaquel.

Todas las muestras fueron pasteurizadas a 75 °C y luego se enfriaron a 45-50 °C para poder adicionar, sin afectar sus funcionalidades por las altas temperaturas, sorbato de potasio (250 ppm), citrato de calcio (430 ppm) y $ZnCl_2$ (120 ppm), dependiendo de las muestras a realizar. La mezcla final, lista para ser fermentada, contuvo aproximadamente un 30 % de sólidos totales, independientemente de la formulación, ya que la adición de hidrocoloides se realizó en bajos porcentajes, sin alterar significativamente el contenido de sólidos de la matriz.

Finalmente, se agitaron las muestras a 40 °C y el proceso de coagulación se inició por adición de una dilución 1/100 V/V de quimosina recombinante (Chr. Hansen, Dinamarca) en proporción de 0,15 mL/100g de muestra, y el fermento iniciador YF-L811 (Chr. Hansen, Dinamarca) a $1,75 \cdot 10^{-4}$ %P/P. La mezcla permaneció en reposo total durante la fermentación, para permitir que el coágulo obtenido sea óptimo, hasta alcanzar un pH de corte entre 5,3 y 5,4 (~ 7 h), realizando medidas de pH cada 30 min y de acidez Dornic cada 60 min, por duplicado. Una vez alcanzando el pH de corte, las muestras fueron homogeneizadas a 100 atm para mejorar las características texturales del producto, otorgando homogeneidad, suavidad y brillo al producto. Luego se disminuyó rápidamente la temperatura a 10 °C para cesar la actividad microbiana termófila del fermento iniciador. Luego se colocaron en distintos envases según los análisis a realizar.

Las distintas muestras de QU fueron rotuladas de la siguiente manera: Muestra GGC: sin extracción del Col y con GG; Muestra GECC: sin extracción del Col y con GEC; Muestra GG: con extracción del Col y con GG; Muestra GEC: con extracción del Col y con GEC; Muestras GGZn y GECZn: con extracción del Col, con GG o GEC respectivamente (en igual proporción) y fortificadas con zinc.

El contenido de Col y el %ExtCol fueron obtenidos como se explicó en la sección 2.

Se determinaron las variaciones del pH y de la acidez Dornic tanto durante el proceso de fermentación como durante la vida de anaquel de los QU. El pH se midió en forma potenciométrica empleando un pHmetro (Hanna instruments, HI 8424, Italia) equipado con un electrodo de membrana de vidrio selectivo a protones combinado con un electrodo de referencia de calomel saturado a (25 ± 1) C. La acidez Dornic se determinó según metodología oficial por titulación directa con NaOH (0,11 N), diluyendo previamente la muestra en 50 mL de agua destilada y utilizando fenolftaleína como indicador (20).

Durante la fermentación, el pH inicial (pHi) y los valores de °D iniciales (°Di) de las MB y las MBC, al momento de ser inoculadas, osciló en $6,1 \pm 0,3$ y (38 ± 3) °D, respectivamente. El pH de corte (pHf) fue de $5,3 \pm 0,1$ y la acidez final (°Df) osciló en $(105,6 \pm 0,7)$ °D. En todos los casos, los valores fueron registrados sobre muestras a $(40,2 \pm 0,6)$ C. El Δ pH (pHf - pHi) no mostró diferencias significativas entre las distintas muestras. Para el caso de los Δ °D (°Df - °Di), si bien se encontraron diferencias significativas entre sus valores, no pudo correlacionarse este resultado con la extracción de Col ni con la adición de un galactomanano en particular ni del catión zinc. Por otra parte, todos los valores se encuentran dentro de los esperados para este tipo de producto.

También se evaluaron los valores de pH y °D de los QU durante 33 días, cada 7 días, desde su elaboración. Los pH iniciales fueron de $5,4 \pm 0,4$ y al final de la vida de anaquel de $4,8 \pm 0,2$. Las muestras GEC y GGZn presentaron las menores variaciones de pH y °D, sin embargo, son valores aceptables para este tipo de producto.

También se evaluaron textura, color y la composición de sólidos totales (%ST), contenido de materia grasa (%MG) y proteico (%PT) y porcentaje de humedad relativa (%HR) a los 15 días de obtenidos los QU. Además, se determinaron las concentraciones de Zn^{2+} y Ca^{2+} y se cuantificó la liberación de suero ocurrida cada 7 días hasta el final de la vida útil (33 días) en idénticas condiciones a un producto en góndola, observándose si hubo cambios en el índice de retención de agua (%IRA) en el tiempo, es decir, si ocurrió desuerado.

Los sólidos totales se determinaron de acuerdo a la metodología oficial (20). El %MG y el %PT (g/100g de producto) fueron determinados utilizando los métodos de Schmidt-Bondzynski-Ratzlaff modificado y de Kjeldahl respectivamente (21,22). El %HR se calculó por diferencia entre los porcentajes composicionales totales (100 %) y el %ST. Las concentraciones de Zn^{2+} y Ca^{2+} en los QU fueron cuantificadas mediante espectroscopía de absorción atómica de acuerdo con la metodología oficial (20).

La Tabla 3 muestra los valores obtenidos para los parámetros %ST, %MG, y %HR. Puede concluirse que todos los parámetros no sufrieron cambios significativos entre las distintas muestras luego de 15 días de su elaboración.

Tabla 3. Valores de %ST, %MG, %PT y %HR de las muestras de QU*

Muestras	%ST	%MG	%PT	%HR
GGC	27 ± 3^a	$6,7 \pm 0,1^a$	$8,6 \pm 0,1^a$	73 ± 3^a
GECC	28 ± 2^a	$6,7 \pm 0,2^a$	$8,8 \pm 0,2^a$	72 ± 2^a
GG	$28,4 \pm 0,8^a$	$6,6 \pm 0,1^a$	$8,4 \pm 0,2^a$	$72,0 \pm 0,8^a$
GEC	26 ± 1^a	$6,4 \pm 0,2^a$	$8,7 \pm 0,1^a$	74 ± 1^a
GGZn	$30,8 \pm 0,6^a$	$6,7 \pm 0,1^a$	$8,7 \pm 0,1^a$	$69,0 \pm 0,6^a$
GECZn	$28,6 \pm 0,2^a$	$6,6 \pm 0,2^a$	$8,6 \pm 0,1^a$	$71,0 \pm 0,2^a$

*La misma letra en una misma columna indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras analizadas ($p > 0,05$).

En las muestras de QU adicionadas con 120 mg/Kg de $ZnCl_2$, que equivaldrían a ~ 58 mg/Kg de Zn^{2+} , la retención de dicho catión fue prácticamente del 100 %, sin obtener diferencias significativas respecto a la goma adicionada. Con respecto al Ca^{2+} , no se encontraron diferencias significativas entre las distintas muestras, es decir que ni el proceso de extracción del Col ni la adición de los distintos cosolutos causaron modificaciones en el contenido de este catión. No se observaron cambios significativos del %IRA durante el almacenamiento de todas las muestras de QU.

Además, se realizó un análisis del perfil de textura mecánica tal como se explicó en el ítem anterior. El ANOVA de los parámetros de textura, obtenidos de las curvas de fuerza aplicada vs. tiempo de aplicación, reveló diferencias significativas para todas las propiedades, con excepción de la elasticidad. En la Tabla 4 se muestran los valores medios de cada parámetro de textura evaluado para los distintos QU.

Tabla 4. Parámetros estadísticos de las evaluaciones instrumentales de textura en QU*

Muestras	Dureza (N)	Adhesividad (N.m)	Elasticidad	Cohesividad	Gomosidad (N)	Masticabilidad (N)
GGC	1,47 ± 0,06 ^e	19 ± 1 ^e	1,000 ± 0,003 ^a	0,64 ± 0,01 ^b	0,94 ± 0,02 ^e	0,94 ± 0,02 ^e
GECC	1,24 ± 0,02 ^d	16 ± 1 ^d	1,000 ± 0,002 ^a	0,65 ± 0,02 ^b	0,81 ± 0,04 ^d	0,81 ± 0,04 ^d
GG	1,9 ± 0,1 ^f	22,4 ± 0,8 ^f	1,000 ± 0,003 ^a	0,583 ± 0,006 ^a	1,13 ± 0,06 ^f	1,13 ± 0,06 ^f
GEC	0,07 ± 0,04 ^a	6,8 ± 0,5 ^b	1,000 ± 0,001 ^a	0,75 ± 0,01 ^d	0,49 ± 0,03 ^b	0,49 ± 0,03 ^b
GGZn	1,07 ± 0,03 ^c	12 ± 1 ^c	1,000 ± 0,002 ^a	0,687 ± 0,008 ^c	0,73 ± 0,04 ^c	0,71 ± 0,02 ^c
GECZn	0,30 ± 0,02 ^b	2,3 ± 0,1 ^a	1,000 ± 0,001 ^a	0,770 ± 0,009 ^d	0,23 ± 0,02 ^a	0,24 ± 0,01 ^a

*La misma letra en una misma columna indica que no hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas ($p > 0,05$).

La dureza, adhesividad, gomosis y masticabilidad resultaron máximos para las muestras de QU con adición de GG. Si bien la GG y la GEC son hidrocoloides que aumentan significativamente la viscosidad del sistema y mejoran su textura, incluso a bajas concentraciones, su capacidad de hidratación relativa es diferente en función de sus características estructurales. Se ha reportado que, para una misma concentración de ambos galactomananos, la GG aumenta en mayor grado la viscosidad del sistema, así como que se necesita mayor concentración de GEC para alterar el comportamiento reológico de las MC(14). Por lo tanto, es de esperar que los valores de los parámetros reológicos mencionados sean mayores para las muestras de QU con mayor viscosidad, o sea las que contienen GG.

Por otra parte, se ha demostrado que existen interacciones entre los hidrocoloides adicionados (AM, G y gomas), aunque no se conocen con exactitud los mecanismos por los que ocurren. Se sabe que una de las principales razones es la competencia por el agua presente en la matriz, y, a partir de ello, pueden ocasionarse diferentes interacciones que dependen de las concentraciones y características de los hidratos de carbono considerados y de los demás componentes presentes en la matriz (14, 23).

Respecto a la participación de la GEC en la matriz alimentaria hay poca información reportada. Según Spotti y col. (2012), es probable que actúe como relleno en los espacios de la red proteica láctea, aumentando la concentración efectiva de macromoléculas y por ende el rozamiento interno, es decir la viscosidad del sistema (24). Perduca y col. (2012) señalaron que la GEC muestra un comportamiento reológico que responde a la ley de potencia y aumenta la viscoelasticidad de los sistemas. En este sentido, los resultados para los QU a los que se extrajo Col mostraron valores superiores de cohesividad (indicador de la viscoelasticidad del alimento) para los QU adicionados con GEC, si bien no se detectaron diferencias significativas en la elasticidad (7).

Por otra parte, la importancia del color de los QU está relacionada directamente con el aspecto, que es uno de los parámetros que definen la calidad de un alimento y que condiciona su aceptabilidad (25). Para la determinación del color de las muestras por análisis de imágenes digitales, éstas fueron colocadas en una caja de madera de acuerdo con el diseño descrito por Mendoza y Aguilera (2004), con algunas modificaciones (26). Las muestras fueron iluminadas con cuatro lámparas fluorescentes (Osram, Biolux, Luz Natural, 18W / 965) con una temperatura de 6.500 K (D65, fuente de luz estándar de uso común en la investigación de los alimentos) y un índice de rendimiento del 95 %. Al mismo tiempo, se utilizó un balasto electrónico y un difusor de luz de acrílico que aseguraron un sistema de iluminación uniforme. Las muestras fueron fotografiadas sobre un fondo blanco mate empleando una cámara digital Nikon P 7100 (Nikon, China) con los siguientes ajustes de la cámara: modo manual con apertura del objetivo en $f = 8$ y tiempo de exposición de 1/200, sin flash, ISO sensibilidad 400, resolución máxima (3648 x 2736 píxeles) y un almacenamiento en formato RAW 65.

Con el fin de comparar los colores de las diferentes formulaciones de QU se utilizó una tarjeta de calibración IT8 (Wolf Faust, Alemania) que fue fotografiada en las mismas condiciones que las muestras para obtener el perfil International Color Consortium (ICC) que emplea el software Lprof (Free Software Foundation Inc., EUA). Este perfil se aplicó a las imágenes de las muestras utilizando el programa Photoshop (Adobe Systems Inc., EUA). Se obtuvieron los parámetros L, a y b que luego se convirtieron en L* (luminosidad), a* (rojo-verde) y b* (amarillo-azul) (27). En la Tabla 5 se muestran los valores medios y desviaciones estándares obtenidas para L*, a* y b* para los QU ensayados.

Tabla 5. Parámetros del color de los distintos QU a 15 días de su producción*

Muestras	L*	a*	b*
GGC	826 ± 2 ^a	9,3 ± 0,5 ^a	20,8 ± 0,8 ^a
GECC	829 ± 5 ^a	8,8 ± 0,6 ^a	19,7 ± 0,7 ^a
GG	826,3 ± 0,6 ^a	9,6 ± 0,7 ^a	20,2 ± 0,5 ^a
GEC	826,3 ± 0,7 ^a	9,2 ± 0,6 ^a	21,6 ± 0,7 ^a
GGZn	824 ± 2 ^a	9,6 ± 0,7 ^a	22,6 ± 0,8 ^a
GECZn	825 ± 3 ^a	9,6 ± 0,7 ^a	22,6 ± 0,8 ^a

*La misma letra en una misma columna indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

Las distintas condiciones ensayadas no influyeron en los parámetros de color, no encontrándose diferencias significativas entre los valores de L*, a* y b* entre las muestras. Los tres parámetros resultaron positivos, por lo tanto, las muestras tendieron al blanco (L*>0), al rojo (a*>0) y al amarillo (b*>0).

Los atributos de textura y *flavor* de los QU fueron determinados por un panel de evaluadores entrenados a los 15 días de su obtención. Se utilizaron descriptores, referencias y escalas apropiados para caracterizar a este tipo de producto. El panel de evaluadores entrenados trabajó en cabinas individuales, ambientadas y equipadas para la óptima concentración del evaluador durante el ensayo. Las muestras fueron acondicionadas, codificadas y presentadas a los evaluadores.

Los descriptores de textura utilizados fueron: consistencia (Co), untabilidad (Un) y suavidad al paladar (SP). Las referencias para la escala no estructurada anclada en los extremos usada para Co fueron: 1 (forma un hilo que penetra dejando un orificio que se cierra inmediatamente) y 9 (cae en bloque y se hunde de manera intermedia). Para el resto de los descriptores de textura, los extremos de la escala correspondiente fueron desde 1 ("casi nada") a 9 ("mucho"), al igual que para las sensaciones trigeminales: astringencia (As) y sabor metálico (SM).

El *flavor* se analizó cuali y cuantitativamente, siendo los descriptores analizados: ácido (Ac), salado (Sa), dulce (Du), crema (Cr), suero (Su), leche en polvo (LP) y cocido (Coc). Las referencias para la escala discreta utilizada en este caso fueron: 1 ("apenas perceptible"), 3 ("poco perceptible"), 5 ("moderadamente perceptible"), 7 ("muy perceptible") y 9 ("extremadamente perceptible"). Además, cuando se encontraron defectos (*flavors* atípicos), se les clasificó y cuantificó usando las mismas referencias extremas empleadas para los descriptores antes mencionados.

Otro de los parámetros obtenidos de los descriptores de *flavor* fueron los porcentajes percibidos por el panel entrenado (%Perc), sin tener en cuenta su intensidad. Los descriptores cuantificados en escalas continuas fueron tratados por ANOVA y se expresaron como valores medios informados por el panel y sus desviaciones estándares respectivas. En cambio, para aquellos cuali-cuantificados en escalas discretas, se calculó el promedio ponderado (PP) como el producto entre la sumatoria de los puntajes asignados a cada opinión (Intensidad, por ejemplo: 1 = apenas perceptible) y el número de panelistas que eligió dicha opinión (frecuencia), sobre el total de panelistas. Al trabajar con el PP, a cada valor se le asigna una ponderación y por lo tanto algunos valores influirán más que otros (14).

En la Tabla 6 y la Figura 4 se muestran los valores obtenidos por el panel sensorial entrenado (12 panelistas) para los descriptores texturales (Co, Un, SP) y sensaciones trigeminales (As y SM). Sólo la Co presentó leves variaciones para la muestra GECZn, siendo menor que para el resto de las muestras (p=0,031).

Tabla 6. Descriptores texturales y sensaciones trigeminales de QU*

Muestras	Co	Un	SP	As	SM
GGC	9,5 ± 0,6 ^b	9,0 ± 0,7 ^a	0,9 ± 0,8 ^a	3 ± 2 ^a	2 ± 1 ^a
GECC	9,6 ± 0,4 ^b	8,7 ± 0,8 ^a	1,2 ± 1,0 ^a	2,9 ± 1,6 ^a	1,4 ± 1 ^a
GG	9,7 ± 0,5 ^b	9,0 ± 0,7 ^a	0,6 ± 0,6 ^a	2 ± 1 ^a	2 ± 1 ^a
GEC	9,5 ± 0,5 ^b	9 ± 1 ^a	0,6 ± 0,5 ^a	2 ± 1 ^a	1,0 ± 0,7 ^a
GGZn	9,7 ± 0,4 ^b	8,9 ± 0,7 ^a	0,5 ± 0,5 ^a	1,0 ± 0,9 ^a	1,3 ± 1 ^a
GECZn	8 ± 1 ^a	8 ± 1 ^a	0,5 ± 0,5 ^a	1,3 ± 0,6 ^a	0,8 ± 0,7 ^a

*La misma letra en una misma columna indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas (p > 0,05).

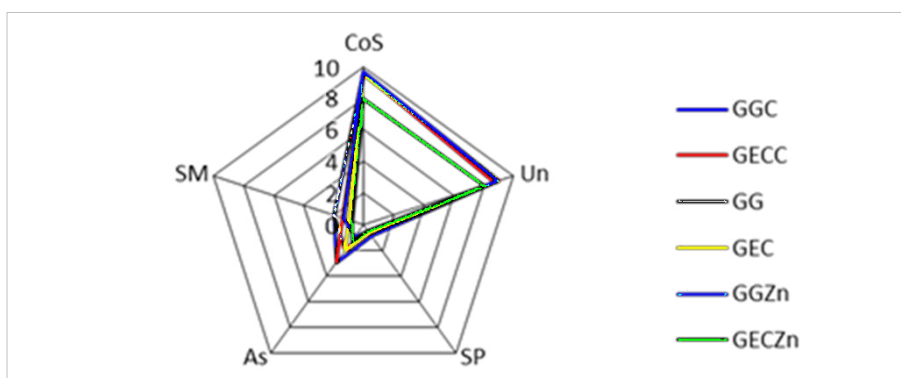


Figura 4. Descriptores texturales y sensaciones trigeminales de QU (15 días almacenamiento)

Por otra parte, para los descriptores trigeminales, la As no varió perceptiblemente entre las muestras. Con respecto al SM, contrariamente a lo esperado, las muestras que tuvieron un poco de percepción con respecto a este sabor fueron las muestras que no tenían la adición de la sal de zinc.

Los resultados del análisis del flavor se muestran en la Figura 5 y en la Tabla 7, donde se pueden observar los valores obtenidos del panel de evaluadores entrenados para los PP y para los %Perc.

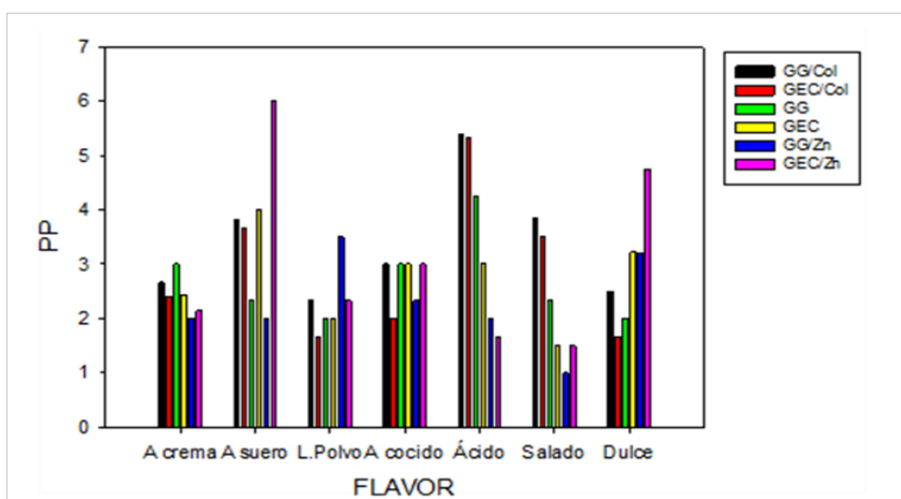


Figura 5. PP para los atributos de *flavor*: “crema”, “suero”, “leche en polvo”, “cocido”, “ácido”, “salado” y “dulce” para las diferentes muestras ensayadas

Tabla 7. PP y % Percepción para los atributos de *flavor* para las diferentes muestras de QU ensayadas a los 15 días de almacenamiento*

<i>Flavor</i>	Muestra GGC		Muestra GECC		Muestra GG		Muestra GEC		Muestra GGZn		Muestra GECZn	
	PP	%Perc	PP	%Perc	PP	%Perc	PP	%Perc	PP	%Perc	PP	%Perc
Crema	2,7	100	2,4	90,9	3	81,8	2,3	63,6	2	54,5	2,1	63,6
Suero	3,8	45,5	3,7	27,2	2,3	27,3	4	18,2	2	18,2	6	18,2
L.Polvo	2,3	54,5	1,7	27,2	2	18,2	2	18,2	3,5	36,4	2,3	27,3
Cocido	3	27,3	2	18,2	3	18,2	3	9,1	2,3	27,3	3	18,2
Ácido	5,4	100	5,3	100	4,2	100	3	91	2	91	1,7	81,8
Salado	3,8	63,6	3,5	36,4	2,3	27,3	1,5	36,4	1	18,2	1,5	36,4
Dulce	2,5	72,7	1,7	54,5	2	54,5	3,2	81,9	3,2	91	4,8	36,4

Como puede observarse en la Figura 5, los valores del PP del descriptor “crema” fueron para todas las muestras cercanos a 3, lo que estaría infiriendo que para los panelistas las muestras poseían un

sabor a crema poco perceptible. Por otro lado, la mayoría de los evaluadores lo percibieron durante el período de estudio en las muestras GGC, GECC y de GG, con un %Perc mayor del 80 %.

En cuanto al descriptor "suero", puede señalarse que el PP osciló entre 2 y 6, pero la muestra con mayor sabor a suero percibido fue la muestra GECZn, a pesar de que se adicionó a todas las muestras una concentración constante de WPC35 (3,5 %) para evitar la aparición del suero en la muestra. Para la misma muestra, con respecto al %Perc, menos del 20 % de los evaluadores lo percibieron. Por lo tanto, se debería evaluar si el consumidor lo percibe en la misma magnitud que el panel sensorial.

Los PP obtenidos para el sabor a "leche en polvo" variaron entre 1,6 y 3,5. La muestra GGZn presentó el mayor PP, cercano a 3,5 (poco perceptible). Por otro lado, para dicho tipo de QU, menos de la mitad de los evaluadores lo percibieron (%Perc < 40 %).

En general, el sabor a "leche cocida" obtuvo valores que rondaron entre 2 y 3 (poco perceptibles) y su %Perc fue bastante bajo para los panelistas, lo que sería muy positivo ya que en este tipo de productos esta clase de sabores se presentan como defecto.

El descriptor "ácido" ha sido moderadamente perceptible para el panel sensorial para las muestras GGC y GECC que son las que no tuvieron la extracción de Col. En general, un sabor muy ácido enmascara la percepción del sabor dulce y viceversa (28). Debido que una vez separado el complejo CD/Col, en la mezcla base queda CD libre, el sabor dulce impartido por ésta podría enmascarar el sabor ácido de las muestras con contenido de Col reducido. De todas formas, en todas las muestras estudiadas el descriptor "ácido" ha obtenido un %Perc muy alto (~ 94 %).

Por otra parte, para el sabor "salado", los valores más elevados fueron alrededor de 3,8 (poco perceptibles), correspondientes a las muestras GGC y GECC. El mayor %Perc fue para la muestra GGC (> 60 %). Esto concuerda con la bibliografía que remarca que para bases de productos lácteos con grasa se obtuvo mayor percepción del sabor salado que para bases descremadas (29). El sabor "dulce" fue percibido en las distintas muestras en intensidad similar ("ligeramente" a "moderadamente" perceptible). Por otro lado, el %Perc fue muy alto para las muestras que contenían GEC y GGZn.

En conclusión, se determinó que la sustitución de GG por GEC en la fórmula de los QU desarrollados puede ser viable debido a que, en general, la estabilidad del producto en el tiempo, las características texturales y los valores de los descriptores sensoriales no presentaron alteraciones significativas como consecuencia de la sustitución.

5. Conclusiones

Los resultados demuestran que es posible realizar el reemplazo de un aditivo importado (GG), actualmente de muy elevado costo, por otro de origen autóctono (de la región chaqueña Argentina, en donde crece como plaga) como la GEC, en las fórmulas de diversos productos a base de leche bovina. Estos hallazgos deberían impulsar la obtención local de la GEC para lograr una disponibilidad adecuada del aditivo a bajo costo, permitiendo generar trabajo formal para la población de la región mencionada, generalmente campesina y aborígen y de bajos recursos.

Referencias

1. BeMiller, J., & Whistler, R.L. (1985). Carbohydrates. In: Fennema, O. *Food Chemistry*. (p. 189–265). New York, Marcel Dekker.
2. Pasquel, A. (2001). Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1(1), 1-8.
3. Dziezak, J.D. (1991). A focus on gums. *Food Technology*, 45(3), 116-132.
4. Dea, I.C., & Morrison, A. (1975). Chemistry and Interactions of Seed Galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 241-312.
5. Riqué, T., y Pardo, L. (1952). *Estudio de la goma obtenida de semillas de espina corona (Gleditsia amorphoides)*. Buenos Aires. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Reporte, 19.

6. Doublier, J., & Launay, B. (1981). Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies*, 12, 151-172.
7. Perduca, M.J., Spotti, M.J., Santiago, L., Judis, M., Rubiolo, A., & Carrara, C.R. (2013). Rheological characterization of the hydrocolloid from Gleditsia amorphoides seeds. *Lwt - Food Science and Technology*, 51, 143-147.
8. López, D.N., Galante, M., Alvarez, E., Risso, P., & Boeris, V. (2017). Physicochemical study of mixed systems composed by bovine caseinate and the galactomannan from Gleditsia amorphoides. *Carbohydrate polymers*, 173, 1-6 .
9. Páez Kelly, J.C., Lasso Gómez, T., Lara Rosas, A., & Suárez Pérez, G. (2006) Escarificación de semillas de gramíneas forrajeras. In: Carvajal, S. *Avances en la Investigación Científica en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias* (CUCBA). Guadalajara, Mexico. Ed. CUCBA, Universidad de Guadalajara
10. Lee, D.K., Ahn, J., & Kwak, H. (1999). Cholesterol removal from homogenized milk with β -cyclodextrin. *Journal of Dairy Science*, 82, 2327-2330.
11. Alais, C. (1971). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. México. Compañía Editorial Continental;
12. Hedges, A. (1998). Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chemical reviews*, 98 5, 2035-2044.
13. Galante, M., Pavón, Y., Lazzaroni, S., Soazo, M., Costa, S.C., Boeris, V., Risso, P., & Rozycki, S. (2017). Effect of cholesterol-reduced and zinc fortification treatments on physicochemical, functional, textural, microstructural and sensory properties of soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 533-541.
14. Pavón, Y., Lazzaroni, S., Sabbag, N., & Rozycki, S. (2014). Simultaneous effects of gelatin and espina corona gum on rheological, physical and sensory properties of cholesterol-reduced probiotic yoghurts. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2245-2251.
15. Early, R. (2000) *Tecnología de los productos lácteos*. 1a ed. Zaragoza. Acribia.
16. Steffe, J.F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. 2nd ed. East Lansing, USA: Freeman.
17. Gösta Bylund, M. (2002) *Manual de las industrias lácteas*. Madrid. Mundi-Prensa.
18. Sharma, S.K., Mulvaney, S.J., & Rizvi, S.H. (2003) *Ingeniería de los alimentos: Operaciones unitarias y prácticas de laboratorio*. 1a ed. México. Limusa Wiley.
19. Toker, O.S., Do an, M., Caniyılmaz, E., Ersöz, N.B., & Kaya, Y. (2012). The Effects of Different Gums and Their Interactions on the Rheological Properties of a Dairy Dessert: A Mixture Design Approach. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 896-908.
20. AOAC. (2005). Dairy products. In: Helrich, K. (ed.). *Official Methods of Analysis* (p. 81–84). Arlington, VA. AOAC. Association of Official Analytical Chemists.
21. Walstra, P., & Mulder, H. (1963) Gravimetric methods for the determination of the fat content of milk and milk products. 3. The Schmid-Bondzynski-Ratzlaff method. *Nederlandsch Melk- en Zuiveltijdschrift*, 17, 334-346.
22. Thompson, M., Owen, L., Wilkinson, K., Wood, R., & Damant, A. (2002). A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme. *The Analyst*, 127(12), 1666–1668.
23. Whistler, R., & BeMiller, J. (1997). *Carbohydrate chemistry for food scientist*. Sant Paul, Minnesota. Eagan.
24. Spotti, M.J., Santiago, L., Rubiolo, A., & Carrara, C. (2012). Mechanical and microstructural properties of milk whey protein/espina corona gum mixed gels. *Lwt - Food Science and Technology*, 48, 69-74.
25. Ibáñez, M., & Ferrero, C. (2003). Extraction and characterization of the hydrocolloid from Prosopis flexuosa DC seeds. *Food Research International*, 36, 455-460.
26. Mendoza, F., & Aguilera, J. (2006). Application of Image Analysis for Classification of Ripening Bananas. *Journal of Food Science*, 69, E471-E477
27. Yam, K., & Papadakis, S. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61, 137-142.
28. Hough, G., y Fiszman, S.C. (2005). *Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos*. Madrid. CYTED.
29. Panouillé, M., Saint-Eve, A., Loubens, C., Délérís, I., & Souchon, I. (2011). Understanding of the influence of composition, structure and texture on salty perception in model dairy products. *Food Hydrocolloids*, 25, 716-723.

Parte 3

Herramientas tecnológicas y analíticas

Capítulo 14

Optimización de la molienda de algarrobo para fomentar el uso no maderable de fuentes autóctonas. Aplicaciones alimentarias

Víctor Rozycki, Carlos Osella

Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ingeniería Química. Instituto de Tecnología de Alimentos. Argentina.
vrozycki@fiq.unl.edu.ar

Resumen

La humanidad ha experimentado cambios en relación con su alimentación durante el transcurso del tiempo reduciendo el consumo de diversas especies que en el pasado fueron utilizadas como recurso alimenticio, apartándose de los ambientes naturales, modificando la forma de relacionarse con la naturaleza. Actualmente existe a nivel mundial una corriente que busca revalorizar los recursos naturales buscando nuevas maneras de utilizarlos o recuperando antiguos procesos de aprovechamiento de estos.

Se han encontrado en Latinoamérica pruebas fehacientes de la utilización de los prosopis desde épocas pre-coloniales. Durante la investigación en Perú de la cultura nazca se encontraron vainas y semillas cuya antigüedad se calcula en mil setecientos años. Los arqueólogos informaron también el hallazgo de frutos de prosopis cuya antigüedad sería de aproximadamente ocho mil años. El capítulo está dedicado a informar el desarrollo de un proceso de optimización de la molienda de algarrobos y sus potenciales aplicaciones alimentarias.

1. Introducción

En las zonas semiáridas y áridas donde los cultivos tradicionales, fuente de alimentos del ser humano no pueden desarrollarse, las poblaciones que las habitan encuentran en los algarrobos una fuente alimenticia natural. Esto se ve reflejado en la gran variedad de productos fabricados a partir de sus vainas pan, harina, aloja, arrope, sucedáneos de café y chocolate y hasta productos utilizados con fines medicinales (1-5).

La humanidad sigue incrementando continuamente su número, lo que estimula a la industria alimenticia a aumentar su producción para compensar la demanda creciente de alimentos. Esto induce a los gobiernos a buscar soluciones mediante el aprovechamiento de las regiones áridas, superficies extensas que actualmente ocupan casi un 43 % de la superficie total de la tierra. En Sudamérica esas regiones ocupan un 18 % de la superficie total, teniendo la Argentina poco más del 50 % de ese valor (6).

Perú y Brasil han desarrollado diferentes proyectos que utilizan los prosopis para recuperar las tierras que poseen baja productividad debido a la escasez de agua. Los algarrobos, que pertenecen a la especie prosopis, poseen muchas características que son particularmente adecuadas para este tipo de proyectos ya que son extremadamente resistentes a ambientes adversos (calor, sequía, alcalinidad y salinidad) contribuyendo a la estabilización y mejora del suelo, permitiendo una agricultura sostenible (7, 8). Sus raíces sumamente ramificadas impiden la erosión del suelo (6, 9, 10).

Las especies vegetales que se escogen para la recuperación de los suelos deben seleccionarse de tal manera que puedan ser utilizadas por los animales o por el hombre como recurso alimenticio, más que como materia prima de la industria de la madera. Este recurso natural es muy valioso en épocas de sequía ya que aportan una buena cantidad de chauchas y hojas que aumentan la disponibilidad de alimentos para los rebaños de esas regiones, siendo reconocido el valor nutricional de las vainas en la alimentación animal (2, 11, 12). También ha sido destacado el reemplazo de un porcentaje de harina de trigo por harina de algarrobo en la producción de panes, lo que permite revalorizar una harina subutilizada por la industria (13-16).

2. Características, recolección y secado de las vainas

La recolección de las vainas se efectúa manualmente. Las chauchas poseen un contenido de humedad que impide obtener un fruto que mantenga sus características durante un tiempo prolongado. Por ello una vez recolectadas se procede a disminuir su actividad acuosa mediante un proceso de secado artificial o natural aprovechando el calor del sol (2,9).

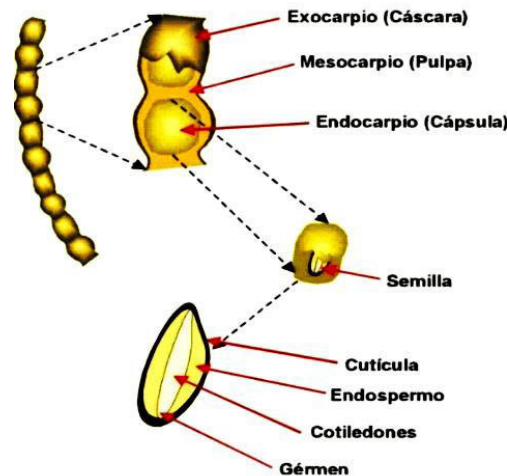


Figura 1. Descripción gráfica vaina de Algarrobo blanco

A medida que avanza el proceso de secado la chaucha cambia su estructura interna. Al principio, cuando el contenido de humedad es elevado presenta una textura flexible que impide que la vaina se quiebre, aun al doblarla de manera que se toquen sus extremos. Cuando el contenido de agua disminuye por debajo del 5 %, el material se vuelve quebradizo permitiendo de esta manera la reducción de su tamaño utilizando diferentes procesos de molienda (2). En la Figura 1 se puede observar la composición del fruto de los algarroberos. La zona más externa, denominada exocarpio está compuesta fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (constituyentes todos de las fibras de las especies vegetales) siendo su estructura relativamente blanda (2).

Hacia el interior del fruto se encuentra el mesocarpio compuesto principalmente por una gran proporción de azúcares, 40-45 % (2, 9, 10), de estructura blanda y con una gran capacidad de absorber la humedad ambiente tornándolo pegajoso (2) siendo el principal azúcar la sacarosa (17) con proporciones más bajas de maltosa, fructosa y glucosa. La cantidad de grasas, cenizas y proteína es relativamente baja (2).

El mesocarpio rodea por completo al endocarpio, el que se encuentra formado principalmente por fibra y se comporta de manera similar al exocarpio, es decir, al disminuir su humedad (llegando el fruto al estado vítreo) se vuelve quebradizo, y es en este estado que se puede liberar la semilla más fácilmente. Existen en la industria técnicas y equipos adecuados para este propósito (2).

La semilla, está formada por tres elementos claramente diferenciados y constituye aproximadamente un 10 % de la vaina. La cutícula o testa es la parte más externa conformada fundamentalmente por celulosa, lignina y taninos, representando un 33 % del peso de la semilla, es muy dura y fibrosa. Es materia prima para la obtención de extractos que contienen una alta proporción de taninos, soluciones colorantes y carbón activado utilizados en la industria alimentaria, química y farmacéutica (2,9).

Hacia el interior aparece el endospermo, que es la reserva energética de la semilla y está constituido por polisacáridos en una proporción aproximada del 42 al 46 %. Por sus aplicaciones resulta ser la parte más importante del fruto (2) y está constituido por galactomananos (2,9), una categoría de aditivos alimentarios conocidos como hidrocoloides.

Finalmente, rodeados por el endospermo se encuentran el germen y los cotiledones que representan del 23 al 25 % en peso de la semilla y son esencialmente proteínas. En prácticamente todas las superficies

tropicales y templadas del planeta las semillas de leguminosas se utilizan como fuente de alimentos por su alto contenido en proteínas el que puede variar entre el 17 y el 40 % dependiendo del tipo de grano.

3. Molienda de algarrobo blanco

3.1. Preparación para la molienda

En el momento de su recolección, las vainas de algarrobo blanco poseen un elevado contenido de agua, lo que provoca que su estructura sea sumamente blanda y difícil de moler a la vez que facilita el ataque de insectos. En la práctica habitual utilizada por las comunidades originarias, luego de la recolección, las vainas se someten a un secado utilizando energía solar. En el caso de que el aprovechamiento sea a escala industrial, el secado solar puede ser reemplazado por secaderos rotatorios o de bandas, siendo la variable fundamental la humedad final del producto la que debe encontrarse en el rango del 4 al 6 %.

Como se explicó en la sección previa, el mesocarpio de las vainas que da lugar a la harina de algarrobo es sumamente higroscópico, lo que dificulta su molienda en aquellas circunstancias en las que la humedad relativa del aire es elevada, por lo que es muy importante la localización del sistema de molienda. Si el clima en el que se ubica la planta es seco, la molienda se puede realizar sin inconvenientes. Si el clima es húmedo el sistema de molienda debe encontrarse en un ambiente en el que la humedad relativa pueda ser regulada.

La molienda es una operación unitaria aplicada a la reducción del volumen de una muestra sólida. Para ello la muestra es sometida solo a procesos físicos con el objetivo de reducir su tamaño conservando las características de la materia prima a transformar, donde la muestra es sometida a fuerzas de compresión, impacto, corte o cizalla/frotación, o combinadas al mismo tiempo, aunque en general una de ellas es la predominante. Estos esfuerzos aplicados provocan un estrés en el material, deformando las partículas hasta el momento en que en algún lugar se supera el límite del estrés elástico, produciendo una deformación permanente provocando la ruptura de la estructura con la consiguiente reducción del tamaño de la partícula lo que se traduce en crecimiento de su superficie específica. Como operación unitaria es altamente ineficiente ya que la mayor parte de la energía aplicada se acumula hasta lograr la ruptura, momento en el que se pierde en forma de calor. El producto obtenido se caracteriza por no poseer un único tamaño de partícula, sino que está conformado por un conjunto de partículas de diferente tamaño dentro de un rango determinado, lo que le brinda las características deseadas. La molienda puede utilizarse para obtener rangos de tamaños grandes, medianos o finos.

Las fuerzas aplicadas para lograr la reducción del tamaño dependen fundamentalmente de las características del material y del producto que se quiere conseguir. Algunos ejemplos del tipo de fuerza respecto a las características de la materia prima serían los siguientes:

- **Compresión:** se aplica en el caso de sólidos duros y se utiliza para obtener una reducción moderada de tamaños grandes a medianos.
- **Impacto:** se utiliza para reducir sólidos frágiles a tamaños que van desde grandes a finos.
- **Cizalla/Frotación:** para sólidos blandos y dúctiles.
- **Corte:** para materiales fibrosos con el objetivo de obtener tamaños específicos.

La reducción de tamaño en alimentos se lleva cabo utilizando equipamientos que aplican algunos de los principios indicados anteriormente citados dependiendo fundamentalmente del estado físico de los alimentos relacionados con su contenido de agua.

Los alimentos húmedos utilizan fundamentalmente el esfuerzo de corte como principio físico para la reducción de su tamaño. Por ejemplo, la carne picada combina fuerza de compresión producida por un tornillo que varía su paso disminuyéndolo a medida que se acerca a un disco, con esfuerzo de cizalla y corte al pasar por los agujeros de este los que producen la reducción desde un tamaño relativamente grande a uno más pequeño. Las frutas, pan fresco y hortalizas son sometidos a esfuerzo de corte (cuchillas) para disminuir su tamaño. El queso se ralla y el medio físico utilizado son puntas de acero que producen efectos de corte. Para alimentos secos el equipamiento utilizado se puede dividir en dos grandes grupos: las trituradoras que disminuyen el

tamaño desde grande a mediano y los molinos que lo hacen desde medianos a finos y/o ultrafinos. Las fuerzas aplicadas son fundamentalmente la compresión, el esfuerzo de cizalla y el impacto.

3.2. Equipos para la molienda de alimentos secos

Los molinos más utilizados en la reducción de tamaño de alimentos secos, la fuerza aplicada y el tipo de alimento se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los molinos empleados para la reducción de tamaño de alimentos secos

Molino	Fuerza Aplicada	Tipo de Alimento
De bolas	Impacto y cizalla	Colorantes
De martillos	Impacto	Verduras deshidratadas
De rodillos lisos	Compresión	Molienda de café
De rodillos estriados	Compresión y corte	Caña de azúcar
De discos lisos	Cizalla	Maíz
De discos estriados	Corte	Trigo
De discos y clavos	Cizalla e impacto	Azúcar

La molienda aplicada a una materia prima para obtener el producto requerido puede ser simple o compleja, en un paso o en varios, utilizando un único tipo de molino o diferentes en cada etapa del proceso. También la materia prima puede requerir un requerimiento previo que facilite la operación, como el maíz o el trigo en el que sufren un tratamiento previo de humectación que le permite ablandar la cáscara facilitando su separación del resto de los componentes del grano. Como vimos, en el caso de las vainas de vinal se requiere una operación de secado.

3.3. Sistema de Molienda para vainas de algarrobo blanco

En una tesis de Magister realizada en la Universidad Nacional del Litoral se analizaron las condiciones y equipos adecuados para efectuar la molienda de las vainas del algarrobo blanco (18). El sistema de molienda que se encontró apropiado para las vainas de algarrobo blanco se esquematiza en la Figura 2.

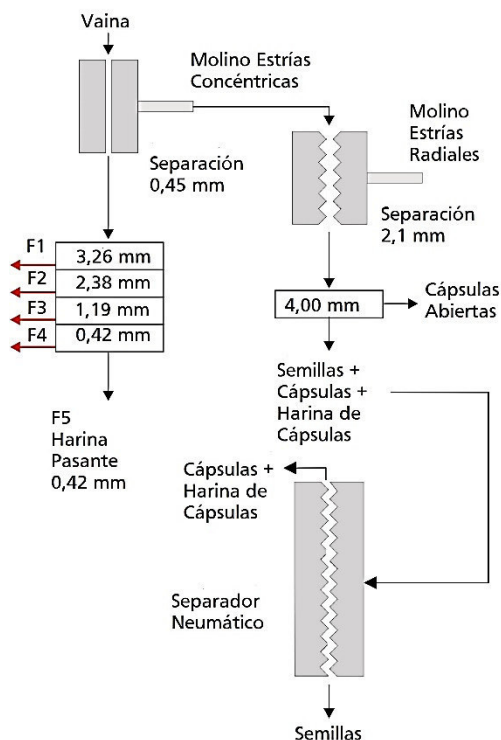


Figura 2. Sistema de molienda apropiado para las vainas de algarrobo blanco

Dicho sistema consta de los siguientes elementos:

Molino de discos (I) con estrías concéntricas y poco profundas. Marca BICO - Pulverizer Type. Bico Inc. Burbank California.

Molino de discos (II) con estrías radiales, profundas y filosas, Marca Buhler-Miag, Modelo MLI.204 (Milano).

Los tamices utilizados para la separación por tamaño de partícula del producto molido poseían una trama cuadrada y las medidas fueron las siguientes: 3,36 mm, 2,38 mm, 1,19 mm y 0,42 mm.

La molienda inicial se realizó con el molino I descrito más arriba utilizando una separación de 0,45 mm entre el estator (fijo, con abertura lateral para el ingreso de las chauchas) y el rotor. Las fuerzas de corte y rozamiento a las que se sometieron las vainas lograron transformar en harina el endospermo, romper en pedazos pequeños el exocarpio y dejar intacto el endocarpio con la semilla en su interior. La escasa abertura entre el rotor y el estator hizo que el endocarpio con la semilla quedara retenido dentro del molino mientras permitió el paso de la harina y de los pequeños trozos de exocarpio hacia el exterior del equipo. La harina así obtenida se sometió a un proceso de tamizado utilizando los tamices ya descritos y se obtuvieron cinco productos bien diferenciados, denominados P1, P2, P3, P4 y P5. El producto P1, retenido en el tamiz de mayor abertura estaba formado fundamentalmente por trozos de cápsula observables a simple vista. El producto P5, pasante del tamiz con malla más pequeña presentaba el aspecto de una harina gruesa y fue utilizado posteriormente en el reemplazo de harina de trigo para panificación. Los otros tres (P2, P3, P4) resultaron una mezcla de exocarpio y harina gruesa que se enriquecerá en esta último a medida que el tamaño del tamiz disminuía. Para poder evaluar la proporción de cada producto, se pesó la cantidad total obtenida de cada uno de ellos.

La semilla y el endocarpio retenidos en el molino eran extraídos procediendo a la apertura de este lo que transforma a la operación en discontinua. Para separarlos se sometió esta fracción a una nueva molienda, pero utilizando en este caso el Molino II, estableciendo una distancia entre el rotor y el estator de 2,1 mm.

Las cápsulas con las semillas en su interior eran introducidas al molino por una abertura superior del estator. Una vez en el interior del molino que ingresaban a este molino eran expuestas a dos tipos de fuerzas: corte y abrasión los que en conjunto lograban romper parte de la cápsula con lo cual a la semilla era expulsada de la misma. Las semillas salían intactas del molino (con un porcentaje ínfimo de las mismas con alguna escoriación) mientras que la cápsula resulto una mezcla de abiertas y trozos pequeños debidos al efecto de ruptura que producía el molino. Las dos fracciones fueron separadas mediante la utilización del tamiz de mayor tamaño (4 mm) obteniendo en el retenido solo cápsulas y en el pasante una mezcla de trozos de cápsulas y semillas. En esta fracción el tamaño de los componentes de la mezcla era similar, por lo que no era posible separarlos con el sistema de tamices. Por ello se utilizó un equipo que utiliza una corriente de aire para realizar una separación neumática aprovechando las diferentes densidades de las partículas presentes en la mezcla. Las semillas más pesadas no podían ser transportadas por la corriente de aire ascendente por lo que caían y eran recogidas en un recipiente en la parte inferior del equipo. Mientras los trozos de cápsula mucho más livianos eran arrastrados por el aire hacia la parte superior del equipo donde eran recuperadas por intermedio de un ciclón cayendo los productos celulósicos en un recipiente y escapando el aire por el centro de este. El esquema del equipo utilizado puede verse en la Figura 3.

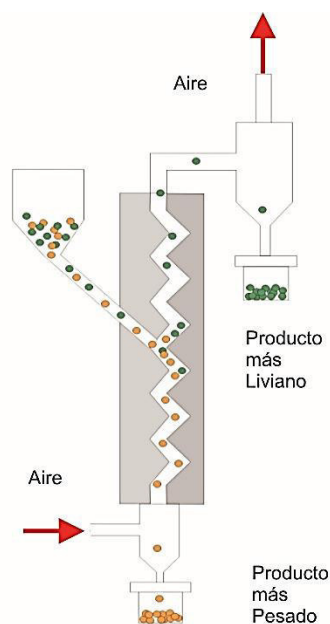


Figura 3. Sistema de separación neumático

Para evaluar el sistema de molienda se procedió a tomar 5 muestras de algarrobo blanco con una humedad comprendida entre 4 y 6 %. Cada muestra se sometió a dos procesos diferentes: una parte fue procesada en el molino de estrías concéntricas separándose las cápsulas del resto de la vaina. Posteriormente las cápsulas fueron abiertas manualmente extrayendo las semillas de estas. Se pesaron las tres fracciones obtenidas. La parte restante de la muestra también procesada en el molino de estrías concéntrica pero las cápsulas fueron abiertas con el molino de estrías radiales, pesando las tres fracciones obtenidas. Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 2.

La separación manual de cápsula y semilla sirvió para obtener el porcentaje de semilla exacto respecto al fruto ya que no se perdió material en ninguna de las etapas. Esto se vio facilitado al utilizar muestras pequeñas de material con lo que pudo observarse detenidamente el proceso evitando, por ejemplo, que parte de las cápsulas conteniendo semillas pasen junto con la harina. Luego la apertura manual de cada cápsula permitió obtener todas las semillas y sin que sufran ningún tipo de daño. La cantidad de semillas de algarrobo blanco obtenidas utilizando este sistema fue de esta manera (9,3 %). En otro trabajo, aplicando el mismo procedimiento, pero sobre muestras de algarrobo negro se obtuvo un porcentaje de 11,1 %. Ambos valores son similares a los para especies de *Ceratonia siliqua* obtenidas de distintas regiones áridas y semiáridas de Túnez, en las que los porcentajes hallados se encontraban entre un 11 % y un 18 % (19). Otros autores trabajando sobre diferentes especies han encontrado valores muy distintos. Meyer (2) encontró que la cantidad de semillas en *Prosopis glandulosa* y *velutina* alcanzaba un 25 % mientras que López Hernández y Col. (20), obtuvieron un porcentaje del 32,25 % en *Prosopis alba*.

Tabla 2. Promedio y desviación estándar de los porcentajes correspondientes a la molienda del fruto. Separación manual de la semilla

	Manual	Sistema de Molienda
Harina	61,9 ± 1,6	63,2 ± 1,9
Cápsulas	27,2 ± 2,4	27,4 ± 2,2
Semillas	9,3 ± 1,8	6,4 ± 2,1

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de las tres fracciones obtenidos al utilizar la separación manual y al aplicar el esquema completo de molienda. La cantidad de harina y cápsulas es similar ya que se utilizó el mismo sistema y con las mismas condiciones para lograr separar la cápsula del resto del fruto, es decir el molino I. Al utilizar el Molino II para producir la apertura de la cápsula y la expulsión de la semilla es indudable que una porción importante de las semillas se rompe disminuyendo considerablemente la proporción de semillas enteras obtenidas respecto a la apertura manual.

4. Aplicación de las harinas de algarrobo en panificación

Las medidas de volumen, utilizando el sistema de desplazamiento de semillas, se llevaron a cabo una hora después que los panes se retiraran del horno. Los valores obtenidos fueron tratados estadísticamente por análisis de varianza, test de rango múltiple de Duncan de acuerdo con Amerine y Col. (21).

El puntaje del pan fue asignado por panel entrenado tomando como parámetros: volumen, estructura, textura, aroma y sabor (22, 23). No se tuvo en cuenta el color de la miga ya que las harinas le confieren una coloración oscura que crece a medida que aumenta el nivel de reemplazo, sobre todo en harina de algarrobo negro. Este hecho no influye en el puntaje ya que le da un color a la miga típica del algarrobo utilizado.

En Tabla 3 muestra los resultados de los alveogramas realizados a consistencia constante.

Tabla 3. Resultados de los alveogramas de mezclas de harina de trigo con harinas de algarrobo

	Testigo	Harina de Algarrobo Blanco			Harina de Algarrobo Negro		
		4 %	8 %	12 %	4 %	8 %	12 %
W	270	245	235	250	170	135	100
P	92	100	117	134	71	69	60
G	19,5	18,0	16,0	14,0	19,5	17,2	17,5
P/L	1,19	1,53	2,25	3,35	0.92	1.11	0.97

W: energía absorbida; P: tenacidad de la masa; G: índice de inflamamiento; P/L: Relación Elasticidad/Extensibilidad.

Cuando se trabajó con harina de algarrobo blanco, el aumento del porcentaje de reemplazo produce un aumento de la tenacidad de la masa (P) pero la absorción de energía (W) prácticamente no varía. Esto significa un crecimiento de la elasticidad de la masa, pero manteniendo constante la capacidad de absorción de energía. Cuando se reemplaza harina de trigo con harina de algarrobo negro disminuyen la tenacidad de la masa (P) y la absorción de energía (W), éste último cae en forma muy significativa con respecto al testigo.

Se puede decir finalmente que hay una marcada diferencia en el comportamiento alveográfico cuando se utiliza en la mezcla harina de algarrobo blanco o harina de algarrobo negro, siendo esta última la que produce un efecto negativo más intenso.

En los farinogramas se observó una marcada diferencia entre las dos harinas respecto a la absorción de agua y al comportamiento que manifiestan durante el amasado. El reemplazo con harina de algarrobo blanco prácticamente no produce cambios en la absorción de agua, pero se observa que hay un aumento de la estabilidad y una disminución del ablandamiento a mayores niveles de reemplazo de harina de trigo por algarrobo blanco. Este comportamiento hace pensar en una interacción proteína-proteína favorable para aumentar la resistencia de la masa durante el amasado. Por su parte el reemplazo con harina de algarrobo negro genera una importante caída de los valores de absorción y un incremento muy evidente del ablandamiento.

Los resultados obtenidos en panificación reflejan con claridad las cualidades, ya analizadas en los ensayos reológicos, de las harinas de algarrobo. Es decir, el volumen específico disminuye con el aumento de harina de algarrobo agregado. Siendo mayor la disminución del volumen específico cuando se utiliza harina de algarrobo negro. Por otro lado, lo mismo sucede con el puntaje total del pan.

5. Conclusiones

El sistema de molienda descrito permitió conseguir un buen rendimiento de semilla de algarrobo blanco tomando en cuenta la cantidad máxima obtenible a través de la apertura manual de las vainas. Durante el proceso se separaron diferentes fracciones de harina con distinta granulometría verificándose una menor proporción de cáscara a medida que el tamaño de partícula decrecía y un aumento de la presencia de endospermo rico en azúcares. La harina más fina, pasante del último tamiz, fue utilizada en ensayos de panificación concluyendo que se podría utilizar hasta un 12 % de harina de algarrobo blanco en reemplazo de harina de trigo, logrando así un pan de aceptable calidad, en coincidencia con lo encontrado por Correa y Col. (24), quienes concluyen que la harina de trigo puede ser reemplazada hasta en un 20 % por harina de algarrobo obteniéndose un pan de propiedades tecnológicas similares al de harina de trigo sin reemplazo, con la ventaja adicional de poseer superiores cantidades de fibra y proteínas de mayor valor biológico.

Referencias

1. Escobar, B., Estévez, A.M., Fuentes, C., & Venegas, D. (2009). Use of Algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz) flour as protein and dietary fiber source in cookies and fried chips manufacture. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59, 191–198.
2. Meyer, D. (1984). *Processing, Utilization and Economics of MESQUITE pods as a Raw material for the Industry*. Tesis Doctoral. Swiss Federal Institute of Technology Zurich. *Diss. ETH* 7688
3. Roig, F.A. (1993). Aportes a la Etnobotánica del género *Prosopis*. En: *Contribuciones Mendocinas a la 5ta. Reunión Regional para América Latina y El Caribe de la red de forestación del C.H.D.* (IADIZA-CRICYT-CHD) (p. 99-119). Mendoza, Argentina.
4. Sciammaro, L., Ferrero, C., & Puppo, M.C. (2015). Chemical and nutritional properties of different fractions of *Prosopis alba* pods and seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10, 103-112. doi:10.1007/s11694-015-9282-z
5. Schmeda-Hirschmann, G., Quispe, C., Soriano, M., Theoduloz, C., Jiménez-Aspée, F., Pérez, M.J., Cuello, A.S., & Isla, M.I. (2015). Chilean *Prosopis* Mesocarp Flour: Phenolic Profiling and Antioxidant Activity. *Molecules*, 20, 7017-7033.
6. Martí, J.T., y Battle Caravaca, I. (1990). *El Algarrobo*. Madrid. Mundiprensa.
7. Carbas, B., Salinas, M.V., Serrano, C., Passarinho, J., Puppo, M., Ricardo, C.P., & Brites, C. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of commercial flours from *Ceratonia siliqua* and *Prosopis* spp. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 305-311.
8. Cardozo, M.L., Ordoñez, R.M., Zampini, I.C., Cuello, A.S., Dibenedetto, G., & Isla, M.I. (2010). Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non-conventional foods: *Prosopis* flour. *Food Research International*, 43, 1505–1510.
9. Figueiredo, A. (1983). Extração, identificação e características do plissacarídeo da semente de algarobeira (*Prosopis juliflora* DC). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 3(1): 82 - 89.
10. Cruz Alcedo, G.E. (1999). *Production and characterization of Prosopis seed galactomannan*. Dissertation Swiss Federal Institute of Technology Zurich for Doctor of Technical Sciences. Zurich.
11. Arenas, P. (2003). *Etnografía y alimentación entre los Toba-Ñachilamolekek y Wichí-Lhukútas del Chaco Central (Argentina)*. La Plata. ProBiota. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
12. 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.
13. Barba de la Rosa, A.P., Frias-Hernández, J.T., Olalde-Portugal, V., & González Castañeda, J. (2006). Processing, Nutritional evaluation, and utilization of whole mesquite flour (*Prosopis laevigata*). *Journal of Food Science*, 71(4), S315–S320.
14. Hefnawy, T., El-Shourbagy, G.A., & Ramadan, M.F. (2012). Impact of adding chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour to wheat flour on the rheological properties of toast bread. *International Food Research Journal*, 19(2), 521–525.
15. Bravo, L., Grados, N., & Saura-calixto, F. (1998). Characterization of syrups and dietary fiber obtained from mesquite pods (*Prosopis pallida* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1727-1733.
16. Felker, P., Takeoka, G., & Dao, L. (2013). Pod Mesocarp flour of north and south American species of leguminous tree *Prosopis* (mesquite): composition and food applications. *Food Reviews International*, 29(1), 49–66.
17. Batalla, L.D., Hernández-Urbe, J.P., Román-Gutiérrez, A.D., Cariño-Cortés, R., Castro-Rosas, J., Téllez-Jurado, A., & Gómez-Aldapa, C.A. (2018). Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans. *CYTA – Journal of food*, 16(1), 444–451.
18. Rozycki, V.R. (2007). *Evaluación de las características reométricas de hidrocoloides obtenidos de semillas de Prosopis sp (algarrobos)*. Tesis Magister en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Instituto de Tecnología de Alimento. Facultad de Ingeniería Química. Universidad nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.
19. Bouzouita, N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M.M., & Thonart, P. (2007). The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Food Chemistry*, 101, 1508-1515.
20. López Hernández, J., Adris, J., Fernández de Rank, E., y Monserrat, S. (1985). Obtención de mucílago a partir de algarrobo (*Prosopis alba*). *La Alimentación Latinoamericana*, 155, 62-64.
21. Amerine, M.A., Pangborn, R.M., & Roessler, E.B. (1965). Principles of sensory evaluation of food. Chapter 10. (p. 451). New York. Academic Press

22. Sánchez, H.D., Mancuello, J.C., & Fabre, H.C. (1983). Essai de panification pour le pain français. *Industries des Céréales*, 25, 29-32.
23. Bernardi, C., Sánchez, H., Freyre, M., & Osella, C. (2010). Gluten-free bread formulated with *Prosopis ruscifolia* (vinal) seed and corn flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(3), 245–255
24. Correa, M.J., Salinas, M.V., Carbas, B., Ferrero, C., Brites, C., & Puppo, M. (2017). Technological quality of dough and breads from commercial algarroba–wheat flour blends. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 2104-2114.

Capítulo 15

Extrusión para el desarrollo de alimentos innovadores: caso de productos a base de maíz

Guido Rolandelli^{1,2*}, Santiago García-Pinilla³, Mario Alberto Cueto^{1,2}, Abel Farroni⁴, Gustavo Fidel Gutiérrez-López³, María del Pilar Buera^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias y Departamento de Química Orgánica. Argentina

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad de Buenos Aires. Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Argentina

³Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Campus Zacatenco. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Lab. de Bioingeniería y Estructuras Alimentarias. México

⁴Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Argentina
*rolandelliguido@gmail.com

Resumen

El proceso de extrusión ha surgido como una alternativa para el desarrollo de alimentos que presenta ventajas particulares en comparación a los métodos tradicionales. Durante el mismo, las materias primas se someten a elevadas presiones y temperaturas, pero en un corto período de tiempo, lo cual permite la conservación de nutrientes y otros compuestos valiosos. El maíz es uno de los cereales más utilizados en esta tecnología, pero presenta limitaciones a nivel nutricional, particularmente en el perfil de aminoácidos esenciales. La necesidad de complementar dicho perfil, sin modificar características físicas, químicas y mecánicas deseadas que hacen a la aceptabilidad de los consumidores ha llevado al estudio de otras harinas y materiales para el enriquecimiento e incorporación de propiedades funcionales. La utilización de extractos vegetales y subproductos agroindustriales supone la doble ventaja de aprovechamiento de materiales naturales como reemplazo de aditivos sintéticos y la disminución del daño ecológico que implica su descarte habitual. Se han estudiado una amplia variedad de nuevos ingredientes que han permitido el aumento en los niveles de proteínas, fibra y minerales, además de mejorar el contenido de compuestos bioactivos, como polifenoles y carotenoides, con demostrada actividad antioxidante, que supone efectos protectores de la salud, principalmente en lo referente a enfermedades crónicas. El correcto balance de la incorporación de estos ingredientes, junto con la combinación adecuada de los parámetros del proceso de extrusión, permiten obtener productos a base de maíz con características nutricionales y organolépticas mejoradas.

Palabras clave: Extrusión, Maíz, Cereales, Extractos Naturales, Subproductos Vegetales

1. La extrusión como proceso de elaboración de alimentos

Existen diferentes técnicas utilizadas para el desarrollo de alimentos a nivel industrial. La extrusión se destaca en la elaboración de productos listos para el consumo a base de cereales, ya que presenta ciertas ventajas frente a otros procesos: se trata de un proceso continuo, versátil y de bajo costo, con la flexibilidad suficiente para obtener alimentos con diferentes tamaños y formas, donde se preservan en gran porcentaje los compuestos termolábiles debido a que se utilizan cortos períodos de tratamiento térmico. La fácil incorporación de diferentes materias primas permite la obtención de una gran variedad de productos, que pueden satisfacer las diferentes necesidades del mercado (1,2). En ese sentido, los consumidores han incrementado la demanda de alimentos naturales, fáciles de consumir, con propiedades funcionales y que se encuentren adaptados a sus requerimientos nutricionales. Así, se han desarrollado una variedad de productos mediante el proceso de extrusión, que responden a esta demanda: cereales para el desayuno, barras energéticas, alimentos expandidos, texturizados de proteínas vegetales, análogos de carne, pastas, *snacks* y aperitivos de diferentes presentaciones, entre otros (Figura 1). La facilidad de consumo de estos productos se adapta al estilo de vida de los consumidores que

dedican poco tiempo a la preparación de sus alimentos, sin dejar de lado la necesidad de cubrir la ingesta recomendada de nutrientes. Aunque en muchos de estos alimentos los contenidos de sal y azúcares suelen ser elevados, la tendencia actual indica una reducción en la utilización de estos ingredientes y la fortificación, en cambio, con fibra, antioxidantes, proteínas de elevada digestibilidad, entre otros (3, 4).



Figura 1: Diferentes alimentos obtenidos por el proceso de extrusión (Fuente: www.jayantfood.com)

En los últimos años, el proceso de globalización y el cambio en el estilo de vida de la población han generado un incremento en el consumo de alimentos extruidos a nivel mundial, con la aparición de mercados crecientes que demandan productos adaptados a sus necesidades. Deportistas de alto rendimiento, niños en etapa de crecimiento, mujeres embarazadas y personas de la tercera edad son algunos de los grupos con requerimientos nutricionales específicos, cuyas actividades y metabolismo exigen el consumo de alimentos de manera sencilla, saludables, con poca preparación y con un completo y adecuado perfil nutricional y densidad calórica (5).

La cocción por extrusión consiste en el calentamiento de los ingredientes, acompañado de mezclado y cizallamiento, utilizando elevadas presiones (hasta 20 MPa) y temperaturas (hasta 200°C), con las consecuentes modificaciones fisicoquímicas del material y su calidad (6). En la Tabla 1 se resumen las condiciones típicas de extrusión de harinas de maíz con sus variables características, y los cambios físicos y químicos que tienen lugar. Es interesante comparar las condiciones en las que se efectúa la extrusión de maíz para la preparación de hojuelas, con respecto las del método tradicional. Este último consiste en la cocción de los *grits* en exceso de agua a 121 °C y 230 KPa por 2h aproximadamente, luego se realizan las etapas de temperado (que puede llegar hasta 24h), laminado y tostado. La extrusión se desarrolla a temperaturas y presiones mucho más elevadas, y en tiempos muy cortos, de 1,5 minutos, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de elaboración características del proceso de extrusión de harinas de maíz

Etapa	Temperatura	Contenido de agua	Transformaciones físicas	Reacciones químicas
1ra sección del extrusor	60 °C	14 %	Transición vítrea	
2da sección del extrusor	100 °C – 130 °C		Dstrucción de cuerpos proteicos	Pardeamiento
3ra sección del extrusor	160 °C	2-3 %	Gelatinización parcial del almidón	Desarrollo de aroma
	Tiempo de residencia: 1.5 min			Dextrinización parcial del almidón
Laminado, Tostado (opcional)				Hidrólisis de azúcar
Almacenamiento	25 °C (oscuridad, N ₂)	2-3 %		Oxidación lipídica

Se han desarrollado diferentes tipos de extrusores, de simple y doble tornillo, con longitudes y diámetros de tornillo variables, en configuraciones de co-ó contra-rotación. Durante el proceso, se realiza la alimentación mecánica o manual de la mezcla de ingredientes hacia un tubo que está sometido a calentamiento, esta alimentación puede estar forzada por un pistón. En el interior del tubo del extrusor se encuentran uno o dos tornillos que producen la mezcla y cizallamiento del material

incrementando la presión y aplicando energía mecánica. Finalmente, el material a presión y caliente atraviesa una boquilla de diámetro muy pequeño para salir del extrusor. La boquilla de salida puede estar acompañada de accesorios y cuchillas para generar los distintos tamaños y formas de los productos (Figura 2). Como consecuencia de la diferencia de presión entre el interior del extrusor y la presión ambiental, y ayudada por el vapor de agua generado durante el calentamiento, se produce la expansión del producto a la salida del equipo. La cabina de calentamiento suele estar dividida en secciones, con sus respectivos controles de temperatura. Del mismo modo, pueden controlarse las revoluciones del o los tornillos para generar diferentes velocidades de rotación. La combinación de los distintos parámetros del proceso determina las propiedades del producto final. Las variables que normalmente se modifican durante la extrusión son la humedad inicial de la mezcla de harinas, la temperatura de las distintas zonas de calentamiento, la velocidad de rotación del o los tornillos, la presión o el torque ejercidos, entre otras. Será necesario ajustar las condiciones de cada una de estas variables para obtener las características deseadas en el extruido (7).

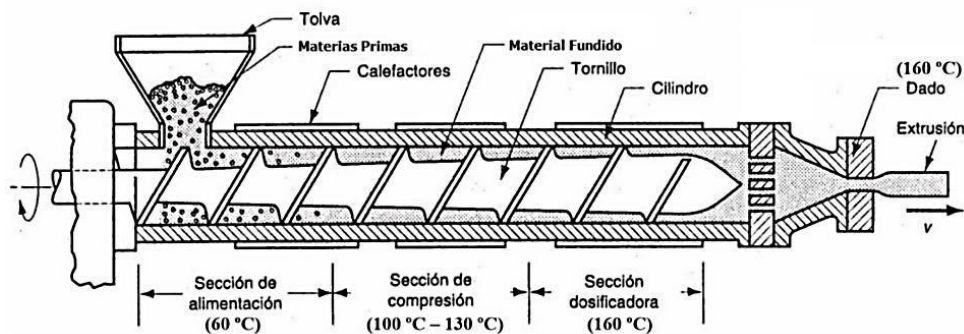


Figura 2. Esquema de extrusor de simple tornillo (Fuente: www.fido.palermo.edu, con modificaciones)

Durante el calentamiento y cizallamiento del material, ocurren diversos procesos físicos y químicos, con consecuencias a nivel mecánico y estructural, tales como la gelatinización del almidón, desnaturalización de proteínas, cambios de coloración por pardeamiento y caramelización o destrucción de pigmentos, inactivación de compuestos anti-nutricionales, entre otros, según lo indicado en la Tabla 1. Algunos de los cambios más importantes involucran al almidón, como la ruptura de gránulos, la fusión de cristales, la degradación molecular o despolimerización, atravesando un estado fundido homogéneo, normalmente llamado "termoplástico". Estos procesos generan la estructura del material en formación. Estas transformaciones se asocian tanto a componentes térmicos como mecánicos: cuando la temperatura es superior a la temperatura de gelatinización del almidón (T_m), ocurre la fusión de las zonas cristalinas, sin embargo, la degradación molecular ocurre con el aporte de la energía mecánica a través del cizallamiento que favorece la ruptura de las cadenas y dextrinización. Como consecuencia de esto último, se produce una disminución en la viscosidad de la pasta. Las elevadas temperaturas favorecen cambios moleculares en las proteínas, como ruptura de cuerpos proteicos y formación de agregaciones de distintas subunidades por enlaces covalentes (disulfuro) y no covalentes (atracciones hidrofóbicas, iónicas y puentes de hidrógeno), asociaciones y disociaciones que conllevan a la desnaturalización y formación de redes que dan forma y estructura al material en formación. Además de la temperatura, el agua juega un rol importante ya que influye en la movilidad molecular de las proteínas y su entrecruzamiento (8). Las altas temperaturas y vaporización del agua favorecen el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático, con la formación de productos de Maillard, como consecuencia de la condensación de grupos amino con azúcares reductores, y la caramelización de azúcares. Si bien estas reacciones disminuyen el valor nutricional, están asociadas a la formación de compuestos responsables del *flavor* agradable y producen el color típico. Si las temperaturas del tratamiento son muy intensas o la exposición es durante un tiempo prolongado, mayor cantidad de productos pardos se formarán; de allí que la coloración parda de un alimento extruido puede ser utilizado como indicador de la intensidad del tratamiento. De manera analítica, la furosina y el hidroximetilfurfural (HMF) son algunos de los compuestos utilizados como referencia para medir el grado de pardeamiento de los alimentos (9, 10).

Actualmente, una gran cantidad de materias primas son utilizadas como ingredientes para el desarrollo de alimentos extruidos. La versatilidad de la técnica permite la fácil incorporación de dichos materiales. Se utilizan harinas provenientes de distintos cultivos: maíz, soja, arroz, avena, amaranto, cebada, trigo, chíá, lentejas, garbanzos, frijoles, quínoa. La combinación de cereales con leguminosas ha resultado exitosa para lograr alimentos con un balance adecuado de aminoácidos esenciales. Sin embargo, también se han incorporado otras fuentes proteicas, como aislados y concentrados de suero lácteo. Cuando el objetivo es mejorar el contenido de fibra y/o el contenido de compuestos antioxidantes, las opciones aumentan ya que se ha utilizado una amplia variedad de gomas, pectinas, inulina, así como cáscaras, tallos y sub-productos o "residuos" de otras líneas de producción (11, 12, 13).

2. El maíz como ingrediente en alimentos extruidos: análisis de la materia prima y caracterización física, química y mecánica de los productos

Los granos de maíz (*Zea mays*) pueden someterse a dos tipos de molienda, a partir de la cual se obtienen diferentes productos: molienda seca y molienda húmeda. La molienda seca abarca las industrias que producen harinas y sémolas y, por otro lado, donde se elaboran productos para copetín o *snacks* y cereales para desayuno. Algunos subproductos de estas industrias son el germen para obtener aceite, el *gluten feed* y el *gluten meal* destinados para alimentación animal y el *grit* cervecero que se utiliza en la elaboración de bebidas malteadas (14). En los procesos de extrusión, la harina de maíz proveniente de la molienda seca constituye una de las materias primas más utilizadas, por su bajo costo y la cantidad de productos derivados que pueden obtenerse. La composición centesimal promedio del grano de maíz es: 73,4 % de almidón, 4,4 % de lípidos, 9,1 % de proteínas, 1,4 % de cenizas, 1,9 % de azúcares y 9,8 % de carbohidratos extraíbles. El almidón está compuesto por dos polímeros de glucosa de elevado peso molecular: amilosa (27%) y amilopectina (73%). La amilosa es un polímero mayormente lineal constituido por moléculas de glucosa unidas por enlaces α 1-4, con pocas ramificaciones dadas por enlaces α 1-6. Los enlaces α 1-4 le imparten a la amilosa un giro gradual haciendo que tome forma de hélice, con un interior hidrofóbico. La amilopectina, en cambio, está formada por cadenas más cortas de glucosa, con elevado número de ramificaciones en enlaces α 1-6. La disposición e interacción entre estos polímeros genera estructuras organizadas en capas semicristalinas y amorfas alternadas. Por otro lado, se encuentran las proteínas de almacenamiento denominadas zeínas que son del tipo prolaminas. Se dividen en tres clases, (ricas en glutamina, leucina y aminoácidos hidrofóbicos), β (ricas en metionina) y γ (con elevada concentración de prolina)(15). Su concentración está asociada a la dureza del grano (16). En cuanto a los lípidos, el maíz presenta, en promedio, la siguiente composición: 12 % de ácido palmítico, 1,9 % de ácido esteárico, 32 % de ácido oleico y 51 % de ácido linoleico (17). Los procesos térmicos y mecánicos que ocurren durante la extrusión producen modificaciones en la composición y en las características y propiedades de los productos que se generan. De la intensidad y el control que pueda ejercerse sobre estos dependerán las características finales del producto, lo cual hace del estudio de las propiedades de los extruidos un conjunto de herramientas indispensables para el desarrollo de nuevos alimentos. Algunas de las determinaciones y propiedades físicas, químicas y mecánicas que se analizan en estos tipos de productos son: índice de absorción y solubilidad en agua, grado de expansión, densidad aparente, humedad final, color, propiedades mecánicas (dureza, fracturabilidad), grado de cristalinidad (DRX) y transiciones térmicas asociadas (DSC), interacción y relación con el agua (isotermas, determinaciones poblaciones de protones por H-RMN). Otros estudios más sofisticados incluyen análisis microscópicos (SEM, CLSM), análisis espectroscópicos (FT-IR, Raman, XPS), caracterización macroscópica a través de imágenes, entre otras (Figura 3).



Figura 3. Tipos de análisis que se realizan de las diferentes propiedades y características de alimentos extruidos

2.1 Índice de absorción (IAA) y solubilidad en agua (ISA)

Dependiendo el grado de cocción y las características del almidón, se generarán distintas relaciones con el agua, asociadas a los procesos de gelatinización y dextrinización. A temperaturas más altas y mayor contenido de agua, hay una disminución en la viscosidad de la pasta, se produce la apertura de las cadenas de amilosa y amilopectina, permitiendo el ingreso e interacción entre las moléculas de glucosa con el agua, promoviendo la fusión de cristales y gelatinización del almidón. Como consecuencia, se producirá una mayor absorción de moléculas de agua, generando IAA mayores. Además del almidón, las proteínas también cumplen un rol importante, ya que pueden formar geles y retener moléculas de agua a través de sus grupos hidrofílicos, aunque esto se encuentre limitado por el estado de la molécula tras el calentamiento. Por el contrario, cuando el contenido de agua no es suficiente o la energía mecánica entregada es muy alta se favorece el proceso de dextrinización respecto de la gelatinización, en este proceso hay mayor degradación del almidón y se producen cadenas cortas de glucosa que pueden liberarse al medio acuoso, donde se solubilizarán. A diferencia del índice anterior, el ISA puede utilizarse como referencia para conocer el grado de degradación molecular del almidón (18).

2.2. Grado de expansión

En los productos extruidos la expansión puede medirse de manera longitudinal, seccional o volumétrica. La cantidad y estado de las proteínas y principalmente del almidón determinan el grado de expansión de estos alimentos. De modo general, la expansión se reduce con el aumento del contenido proteínas, que aportan rigidez a la estructura, pero se incrementa con niveles crecientes de almidón. Como en el caso del IAA, el grado de gelatinización del almidón influirá directamente en la expansión; a mayor gelatinización, mayor será la expansión. El vapor de agua también cumple un rol importante ya que, con el cambio de presión a la salida del equipo, se favorece la expansión impulsada por el vapor. Como en todas las características, no sólo la composición sino también las condiciones del proceso repercuten en esta propiedad. En particular, aquellas que promuevan la gelatinización del almidón, favorecerán la expansión. Velocidades de rotación de tornillo elevadas ejercen mayor energía mecánica y consecuente cizallamiento del material, temperaturas altas indican mayor calor entregado al sistema y mayores contenidos de humedad permiten que haya mayor cantidad de agua disponible para interactuar con el almidón, así como mayor número de burbujas formadas. Todas estas condiciones impulsan la gelatinización del almidón y, en consecuencia, promoverán la expansión del producto. Respecto al agua, sin embargo, algunos autores reportan que los incrementos en el

contenido de humedad inicial afectan de manera negativa a la expansión, aunque esto también depende en conjunto con el resto de las variables de extrusión (19).

2.3. Densidad aparente

El cálculo de la densidad se define como la relación entre la masa y el volumen del producto. De esta manera, cuanto mayor sea el volumen del extruido, menor será su densidad. Así, existe una relación inversamente proporcional entre estas propiedades físicas. Por lo tanto, un producto expandido tendrá una menor densidad aparente. Por esta razón, los factores que favorezcan la expansión (elevadas temperaturas, velocidades de rotación de tornillo y humedades iniciales), generarán valores de densidad aparente bajos. En particular para las revoluciones del tornillo, algunos autores justifican que la velocidad de rotación reduce la viscosidad e incrementa la elasticidad de la mezcla, produciendo productos con baja densidad (19).

2.4. Humedad final

La humedad final del producto se puede relacionar directamente con determinadas características mecánicas y texturales, así como también es importante para establecer la estabilidad y el período de vida útil. Los factores que determinan en mayor medida la humedad del alimento son la temperatura de extrusión y la humedad inicial de la materia prima; cuanto menor sea la temperatura de trabajo y mayor la humedad de la mezcla, la humedad final será más alta, generando un producto menos atractivo sensorialmente y más proclive al desarrollo microbiano y otras reacciones de deterioro. De esta manera, la humedad final define en gran medida la calidad del alimento extruido (19).

2.5. Color

Además de la humedad final, otro factor determinante de la calidad de los productos extruidos es el color. Este parámetro se utiliza como indicador de la intensidad del tratamiento térmico y puede relacionarse, por otro lado, con el desarrollo de productos de pardeamiento, como furosina e hidroximetilfurfural. Si bien el tiempo de exposición del material a las temperaturas elevadas es corto, la susceptibilidad de los pigmentos o la facilidad del desarrollo de reacciones de pardeamiento generan cambios en este atributo. Además, algunos de los productos de pardeamiento que se forman repercuten directamente en el *flavor* del alimento (20). El establecimiento de paneles sensoriales entrenados puede utilizarse para medir el color y da una idea directa de la percepción de los consumidores, aunque es muy difícil de ejecutar, ya que para establecer determinaciones útiles es necesario realizar el entrenamiento específico de los panelistas. Una de las formas más utilizadas para realizar una evaluación estandarizada del color de un alimento es aplicar la teoría de colorimetría de reflectancia triestímulo y expresar los resultados en el espacio de color CIE Lab que se define utilizando los parámetros L^* , a^* y b^* . El parámetro L^* se refiere a la luminosidad de la muestra y toma valores entre 0 (negro) y 100 (blanco), el parámetro a^* describe las variaciones del rojo (+120) al verde (-120) y b^* toma valores desde el amarillo (+120) al azul (-120)(21). El color puede medirse directamente en forma instrumental mediante un colorímetro o a través de imágenes obtenidas con cámaras digitales y posterior análisis en softwares (por ejemplo, Photoshop). En estas determinaciones se debe controlar el efecto de la luz ambiente o artificial, por lo que suelen utilizarse cabinas preparadas para tal fin, con condiciones de iluminación y temperaturas establecidas, además de parámetros de obtención de las imágenes, distancia al objetivo, entre otras. Se ha establecido la correlación entre ambas técnicas para evaluar el color de alimentos instrumentalmente (22). En cuanto a los efectos de la extrusión sobre estos parámetros, las elevadas temperaturas y velocidades de rotación de tornillo producen disminuciones considerables del valor L^* y mayores valores de a^* y b^* . Esto se debe a que las reacciones de pardeamiento no enzimático y de destrucción de pigmentos se favorecen con la temperatura y a que la fricción o cizallamiento permite un fraccionamiento que facilita la exposición de grupos reactivos al pardeamiento, como los grupos amino de las proteínas (23).

2.6. Propiedades mecánicas

Los texturómetros, que registran la fuerza aplicada en función del desplazamiento, son los equipos más utilizados para determinar las propiedades mecánicas de los productos extruidos. Es requisito que se use un número grande de muestras para poder tener valores adecuados que representen las verdaderas

características del producto. Además, se deben respetar las dimensiones de las muestras y las condiciones en que se realizan las determinaciones. Existe una amplia variedad de *tests* que pueden aplicarse para evaluar las diferentes propiedades. Algunos simulan los procesos de masticación, por lo que pueden correlacionarse con la percepción sensorial que experimentan los consumidores.

La celda Kramer es uno de los accesorios utilizados, donde una serie de cuchillas atraviesan a las muestras que se encuentran contenidas en una celda pequeña. La distancia entre las cuchillas y las muestras, así como la velocidad del test se definen experimentalmente o siguiendo recomendaciones de otros autores para cada alimento en particular. De este *test* se obtienen gráficas de fuerza vs desplazamiento y los picos presentes se asocian a la fuerza de corte necesaria para atravesar las muestras. Cuando se comprime un alimento crujiente como los extruidos, se puede observar un aumento lineal de la fuerza aplicada hasta que ocurre el primer evento de fractura. El movimiento y reacomodación de los fragmentos que resulta en una caída de la fuerza aplicada. Este evento se propaga por el material a muy altas velocidades produciendo el clásico sonido que se asocia con la crocancia. A medida que la muestra se comprime aún más, la fuerza vuelve a aumentar hasta que ocurra el siguiente evento de fractura. Es decir, una caída de fuerza acompaña a cada evento de fractura. Los picos de fuerza observados en una curva de fuerza-deformación corresponden a cada evento de fractura y la altura del pico depende de las propiedades estructurales del material, como la distribución del tamaño de las burbujas y el grosor de la pared de la burbuja. Las diferencias en los valores resultantes y las formas de las curvas entre las muestras se deben principalmente a la composición y estado de sus componentes, así como a las condiciones en las cuales fueron elaboradas. En las muestras más expandidas, y por lo tanto de menor densidad aparente, suele requerirse menor fuerza de corte para atravesarlas y se presentan varios picos, asociadas a las distintas burbujas de aire delimitadas por paredes rígidas, con un perfil de fuerzas más ancho; en cambio, en aquellas más compactas o con mayor contenido de fibra, en general la energía requerida suele ser mayor y las gráficas son más uniformes (24). Otros tipos de *tests* incluyen el uso de distintas clases de cuchillas o guillotinas de formas variadas, así como celdas de carga de distinto tamaño y peso, con especificaciones particulares en cada caso. Algunos de ellos son *tests* de corte, de punción, de compresión, de cizallamiento, donde se analizan propiedades mecánicas como dureza, fracturabilidad, adhesividad, gomosidad, etc. (25).

Además, puede evaluarse el sonido que se genera durante el rompimiento de las muestras, a través de sensores acústicos. Es necesario realizar estas determinaciones en cabinas aisladas donde los ruidos ambientales sean descartados, además del propio sonido del equipo. Así pueden asociarse determinadas frecuencias y amplitudes de señales con características como dureza, crocancia y crujencia. A determinadas frecuencias, amplitudes mayores se asocian a texturas más crocantes. En relación a la expansión, los productos con mayor volumen suelen presentar mayores amplitudes en comparación con productos menos expandidos y más duros. A nivel general, los alimentos crocantes generan sonidos más fuertes y agudos a niveles de alta frecuencia que aquellos productos crujientes (26).

2.7. Isotermas de sorción de agua, transiciones térmicas y grado de cristalinidad

Como se mencionó anteriormente, el proceso de extrusión permite una mezcla, cocción y obtención de productos de baja humedad, favorecido por el uso de elevadas presiones. Esta técnica induce la fusión y vitrificación del material hacia el final del proceso, con una rápida evaporación del agua a la salida del equipo, el enfriamiento de la estructura y la formación de una espuma sólida se produce como consecuencia de la diferencia de presión y temperatura respecto a las condiciones ambientales. Luego del enfriamiento, el material obtenido es una estructura sólida amorfa y un material vítreo en un estado de no-equilibrio, que se puede modificar eliminando agua o mediante un enfriamiento rápido. El agua remanente en el material juega un rol fundamental en la calidad final, ya que influye en la temperatura de transición vítrea (T_g), que está directamente relacionada con la estabilidad. Además del agua, existen otros factores involucrados en definir el rango de temperaturas en que ocurre la transición. La T_g se define como la temperatura a la cual un material amorfo pasa de un estado vítreo a otro denominado líquido sobre enfriado. La transición vítrea implica el ablandamiento del material vítreo al aumentar el contenido de agua, pero también existen otros procesos, como el envejecimiento físico, que afectan las propiedades de la textura en el estado vítreo. En la Figura 4 se muestran las temperaturas de transición vítrea de *grits* de maíz, y de hojuelas de maíz obtenidas por extrusión o por el método tradicional, en

función de la fracción en masa de sólidos. Es interesante notar que, a pesar de su historia térmica y mecánica tan diferente, estos materiales tienen temperaturas de transición vítrea bastante similar, lo que facilita las predicciones. Además, dados los valores de T_g en condiciones ambientales normales y a bajas humedades los productos se mantienen por debajo de la curva de T_g , lo que significa que se encuentran formando un vidrio.

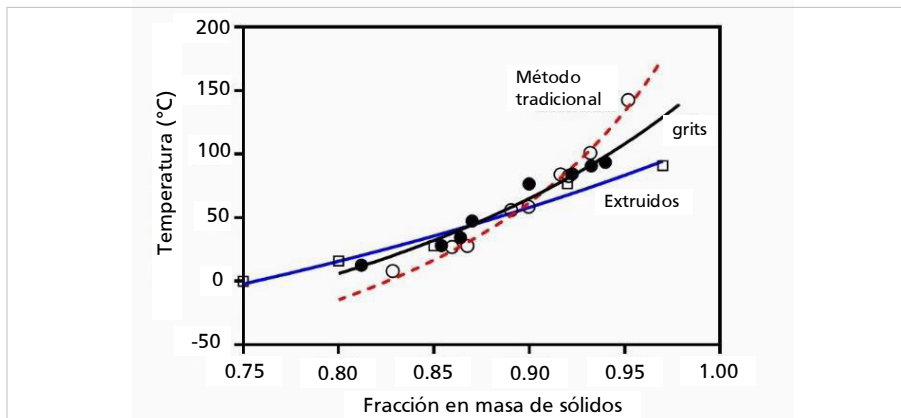


Figura 4. Temperaturas de transición vítrea (obtenidas por DSC) de *grits* de maíz y hojuelas obtenidas por extrusión o laminados

Dado que estos productos, vítreos a temperatura ambiente, no están en equilibrio termodinámico a temperaturas por debajo de su temperatura de transición vítrea, pueden sufrir cambios físicos cuando sus propiedades termodinámicas (por ejemplo, entalpía, volumen libre) disminuyen para alcanzar un estado de menor energía. Dicha evolución está asociada con un proceso de envejecimiento físico que ocurre durante el almacenamiento. El estado estructural de un material vítreo depende de la historia térmica del vidrio a partir de su procesamiento y almacenamiento por debajo de T_g . Una de las maneras más efectivas para evaluar el efecto del agua en la T_g consiste en construir una curva de variación de T_g vs contenido de agua. Como primer paso puede construirse una isoterma de sorción de agua del producto extruido. Para esto se expone el material a atmósferas de humedad controlada hasta su equilibrio (por ejemplo, con soluciones saturadas de sales específicas que imparten un determinado valor de actividad de agua (a_w)), a temperatura constante. Evaluando el contenido de agua en cada sistema se puede construir y modelar matemáticamente la isoterma de sorción, como la curva resultante de la combinación del contenido de agua versus actividad de agua. Posteriormente, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) es posible evaluar la temperatura a la cual ocurre la transición vítrea para cada sistema en equilibrio a las distintas a_w . El efecto plastificante del agua produce que a medida que aumenta el contenido de agua, disminuya el valor de la T_g . De igual manera, se puede establecer el efecto de otros ingredientes, como el contenido de azúcar, sobre este parámetro (27).

3. El proceso de extrusión en el diagrama de estado

Además de determinar la temperatura de transición vítrea, mediante DSC se pueden establecerse los rangos de temperatura donde ocurren procesos como la gelatinización de almidón, desnaturalización de proteínas, fusión de lípidos, etc.

Como se discutió en el capítulo sobre calorimetría, si la cocción durante la extrusión fue incompleta, en el termograma obtenido se verá una transición asociada a la gelatinización del almidón nativo remanente. El área bajo la curva y la entalpía del proceso permitirán cuantificar y determinar el grado de cocción. De manera similar puede conocerse el grado de retrogradación del mismo durante el almacenamiento. Estos resultados se pueden asociar con el grado de cristalinidad de la muestra, determinada mediante difracción con rayos X, donde se puede establecer la comparación entre el alimento antes y después del proceso de extrusión y así conocer el grado de cocción del almidón, además de modificaciones específicas asociadas al proceso térmico de los distintos tipos de cristales de almidón presentes en la muestra. Por espectroscopía FT-IR se pueden establecer correlaciones entre la absorbancia a ciertos números de onda y el grado de

cristalinidad del almidón. De esta manera hay una complementariedad en estas tres técnicas de análisis para conocer el estado del almidón en productos extruidos (26, 28).

La gráfica de las temperaturas características de un material, incluyendo las T_g en función de la fracción en masa de sólidos se conoce como diagrama de fases suplementado, y es muy útil para realizar interpretaciones y predicciones acerca del comportamiento de los materiales, y establecer condiciones de proceso. En la Figura 5 se muestra un diagrama de fases suplementado para las harinas de maíz, con las temperaturas de gelatinización (T_m), de transición vítrea (T_g) y la zona de reacción de las proteínas. Además, se indican las distintas etapas del proceso. La harina se encuentra inicialmente en una zona vítrea, al ingresar al extrusor se calienta y sobrepasa la T_g , llegando a una zona donde ocurre la gelatinización parcial del almidón (es parcial debido al bajo contenido de agua). En las últimas etapas de la extrusión, las altas temperaturas y presiones provocan la ruptura de cuerpos proteicos y las proteínas entran en una zona de fusión y reacción. Al salir del extrusor el material se expande por la diferencia de presión y al enfriarse queda formando una estructura vítrea. La línea gris indica la zona donde cesa el movimiento de burbujas, que es aproximadamente a una temperatura 30 °C superior a T_g . Este tipo de diagrama nos permite interpretar las observaciones que se realizan mediante microscopía electrónica, por ejemplo, que verifican la destrucción de cuerpos proteicos y la gelatinización parcial de almidón. También, establecer la zona donde el material se estabiliza porque cesan los movimientos de las burbujas, y las condiciones de contenido de agua o temperaturas necesarias para lograr el material que se desea.

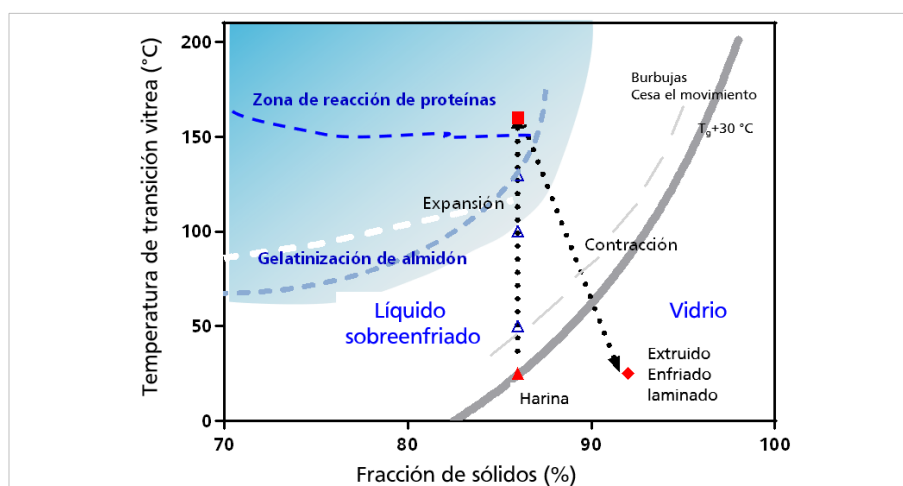


Figura 5. El proceso de extrusión de la harina de maíz en el diagrama de fases y estado

4. La incorporación de otros cereales en las formulaciones para extrusión: ventajas y desventajas

La deficiencia en aminoácidos esenciales en el maíz, la necesidad de fortificar a los extruidos con fibra, así como la búsqueda de conseguir productos más expandidos o con diferentes características físicas, ha llevado a la complementación de los productos de maíz con otras harinas para ampliar la variedad de alimentos obtenidos, con características diferenciales.

Uno de los casos más comunes y analizados en este sentido es la mezcla maíz-quínoa. En comparación con los productos hechos 100 % de maíz, la incorporación de harina de quínoa aumenta los niveles de fibra, cenizas, proteína y también de lípidos. Si bien el proceso de extrusión reduce en cierta medida los valores, por la exposición a la temperatura y dada la facilidad de que ocurran ciertas reacciones de deterioro, ya que las semillas de quínoa tienen cantidades significativas de estos nutrientes, su incorporación en las formulaciones generará mayores cantidades de ellos, incluso luego de la extrusión. En particular para el perfil de aminoácidos esenciales, la incorporación de 30 % de quínoa aumenta en un 50 % el contenido de lisina, frente a la formulación hecha únicamente con maíz. De manera

similar, los niveles de ácido aspártico, treonina, glicina, valina y arginina también resultan mayores con la incorporación de quínoa (29). Sin embargo, la incorporación de proteínas afecta las propiedades físicas, ya que se disminuye la expansión y por lo tanto aumenta la densidad, lo que resulta en una estructura más compacta. Al poseer mayor cantidad de lípidos, hay menor almidón disponible, que es el principal componente que define la expansión del producto. Los lípidos generan una masa más suave y blanda que no tiene la fuerza suficiente para expandir de manera correcta. Esto repercute también en las características mecánicas, donde un material menos expandido, más denso y compacto, presenta mayor dureza. En cuanto a la apariencia microscópica, la incorporación de quínoa genera celdas más pequeñas y compactas, algunas rotas, distribución de burbujas de aire menor uniformes, con una textura más áspera (30).

La combinación gramíneas-leguminosas o gramíneas-legumbres es la ideal para la complementación en el perfil de aminoácidos y fortificación de minerales. La incorporación de un 15 % de harina de arvejas, por ejemplo, incrementa los niveles de proteína y fibra, aunque no genera cambios significativos en cuanto a cenizas. El contenido de lípidos aumenta, pero no en gran medida. En cuanto al perfil de aminoácidos, la adición de arvejas reduce las cantidades de leucina, pero continúa por encima a los niveles sugeridos por FAO; en la lisina los niveles también aumentan, pero no se alcanzan las cantidades recomendadas, por lo que la adición debería ser mayor al 15 % para que se logre el resultado adecuado. A nivel general, los contenidos de aminoácidos aumentan con la adición de harina de arveja, en comparación a las formulaciones controles exclusivamente de maíz. Respecto a las características físicas, el porcentaje de incorporación de arveja no genera efectos significativos respecto a la expansión o densidad en comparación con el control. Tampoco se encuentran diferencias frente al control en lo referente a la digestibilidad de proteínas *in vitro* o el contenido de polifenoles (31).

Otro ejemplo de complementación con leguminosas es la combinación maíz-garbanzos. Estos son fuente de proteínas, con cantidades importantes de vitaminas del grupo B, ácidos grasos insaturados y ciertos minerales. La incorporación de 21 % de esta leguminosa a la formulación genera un producto con 20 g de proteínas, con contenidos de aminoácidos esenciales superiores a los recomendados por la FAO/OMS, salvo para el triptófano, con una digestibilidad del 84,5 %. Estas características lo hacen adecuado para el desarrollo de formulaciones alimentarias destinadas a niños en edad de crecimiento (32).

La utilización de cultivos con elevado contenido lipídico, como es el caso de la chía, también se ha reportado. Estas semillas contienen entre 25 % y 40 % de lípidos y hasta 68 % de ácido linolénico, también conocido como omega-3, que es esencial. Su contenido proteico también es importante, entre 19 % y 23 %, con un perfil de aminoácidos esenciales adecuado, en particular leucina, lisina, valina e isoleucina. Su incorporación, únicamente en un 5 %, genera productos menos expandidos, y por lo tanto con mayor densidad, en comparación a las formulaciones exclusivamente de maíz. Esto se debe a que los lípidos producen un efecto lubricante en la masa, disminuyendo la fricción y el torque del extrusor, generando una menor presión, que repercute directamente en la expansión (33). En cuanto a la dureza, la formulación con chía presenta menores valores que el control. Como la dureza se define a partir de la interacción entre biopolímeros, principalmente carbohidratos y proteínas que dan la estructura, la incorporación de lípidos pudo haber generado una disrupción entre ellos. Esto explica la menor expansión y los valores inferiores de dureza. En conjunto con esta determinación, la detección y duración de los sonidos generados durante la penetración de la cuchilla se utilizan para establecer la crocancia del producto, relacionados a la ruptura de las cavidades. Las muestras que contienen chía resultan más crocantes, donde sus cavidades se rompen de manera progresiva en comparación al control, que es más quebradizo y por lo tanto se desintegra más rápidamente (34).

Una de las combinaciones más utilizadas y estudiadas es la mezcla maíz-soja. Esta leguminosa contiene cantidades significativas de proteínas y lípidos y un porcentaje bajo de carbohidratos. La incorporación de niveles crecientes de harina de soja en las formulaciones de maíz produce mayor volumen específico, aunque de esto también depende la velocidad de rotación del tornillo y la humedad inicial de la mezcla. Respecto a la expansión, el uso de hasta un 15 % de soja, disminuye el grado de expansión, pero los niveles son máximos e incluso superiores a la formulación exclusiva de maíz con la incorporación de un 30 % de harina de soja. A pesar de esto, su incorporación disminuye significativamente la dureza de las muestras, aunque las propiedades mejoran con la adición de agua, ya que es necesaria la hidratación adecuada y suficiente de las proteínas que se incorpora para lograr la estructura del producto. Las proteínas de soja pueden actuar como emulsionantes de alta calidad entre materiales hidrofílicos e

hidrófobos, exponiendo sus grupos afines a las fases correspondientes. Como resultado, con una alta concentración de harina de soja, los poros formados en los productos extruidos después de atravesar el dado de salida del extrusor son más pequeños y más uniformes que aquellos donde la incorporación de soja es menor o nula. Al mismo tiempo, el grosor de la pared de los poros disminuye cuando aumentan los niveles de soja incorporados, de allí la disminución en los valores de dureza (35).

Algunos pseudocereales cultivados en Sudamérica que se han analizado como alternativas para la formulación de alimentos extruidos, y en búsquedas de alternativas de consumo para aquellas personas intolerantes al gluten, además de la quínoa, son el amaranto, kañiwa y kiwicha. Estos cultivos son fuente de proteínas, fibra, ácidos grasos insaturados y compuestos bioactivos. Se han hecho estudios donde se comparan los efectos de incorporación de 20 %, 35 % y hasta 50 % de amaranto y kañiwa en formulaciones a base de maíz. En cuanto a las propiedades físicas, el aumento en los niveles de sustitución con amaranto produce alimentos menos expandidos y rígidos, mientras que con kañiwa se mantienen los valores de rigidez, aunque la expansión también resulta menor. La incorporación de estos pseudocereales reduce los índices de absorción y solubilidad en agua, en ambos casos. Respecto a la porosidad, porcentajes crecientes de los pseudocereales no generan modificaciones en los valores, pero sí se reducen los tamaños de los poros, principalmente en el caso de kañiwa; es decir se producen más poros, pero de menor tamaño. Del mismo modo, las paredes de los poros se engrosan con el aumento del contenido de los pseudocereales, principalmente con kañiwa. Mediante análisis sensorial con paneles entrenados se observó que las mezclas con kañiwa son más crocantes que las que contienen amaranto, pero que esta característica disminuye con el aumento del porcentaje de sustitución. A su vez resultan más dulces los que contienen kañiwa en comparación con las formulaciones con amaranto. Los que poseen kañiwa resultan más duros y adhesivos y esta dureza aumenta con el contenido de harina sustituida (36).

5. Utilización de extractos naturales y subproductos vegetales como complemento en la formulación: agregado de compuestos bioactivos y revalorización de materiales

En el último tiempo, el interés y los hábitos de los consumidores en el campo de los alimentos se han modificado considerablemente. Hoy en día, los consumidores demandan productos que combinen una apariencia interesante, una textura crujiente altamente aceptable y un sabor atractivo, pero con ingredientes nutritivos y/o funcionales. En particular, fibra dietética, proteínas, micronutrientes o compuestos con alta actividad antioxidante, tales como los polifenoles son los más requeridos. En ese sentido, los productos extruidos a base de maíz resultan una opción viable para cubrir dicha demanda. Su producción está muy desarrollada y presentan características texturales altamente aceptadas, aunque no son ricos en compuestos bioactivos y necesitan una adecuada suplementación mediante la incorporación de ingredientes funcionales novedosos. Para tal fin se han analizado diferentes posibilidades, dentro de las cuales se destacan la incorporación de extractos provenientes de fuentes naturales, así como subproductos agroindustriales (cáscaras, semillas, tallos, etc.), con el doble objetivo de mejorar el perfil nutricional de la formulación y revalorizar estos materiales comúnmente denominados residuos y que generalmente son desechados sin aprovechar sus propiedades. Al mismo tiempo, no debe perderse de vista la necesidad de que estos alimentos resulten con características físicas, mecánicas y sensoriales adecuadas.

Un ejemplo es la incorporación de tallos de alcaucil, ricos en inulina y derivados, así como fructo-oligosacáridos y polifenoles, o la pulpa de calabaza, fuente de pectina, carotenoides y compuestos polifenólicos. En comparación con el control, la incorporación de estos materiales genera disminución en la expansión, independientemente de las condiciones de extrusión. Esto se debe a los elevados niveles de fibra de estos ingredientes, que limitan el grado de hidratación y por lo tanto gelificación del almidón y disminuyen la viscosidad de la masa, lo cual repercute directamente en el grado de expansión. Estos componentes, junto con los azúcares, son los responsables de los aumentos en los valores de los índices de absorción de agua y disminución en los de solubilidad. A nivel sensorial, la intensidad de color aumenta con la adición de estos productos, generando materiales más oscuros, en particular con la pulpa de calabaza. El color medido instrumentalmente coincide con lo determinado a través de un panel

sensorial: la adición de los ingredientes reduce el valor de la coordenada a^* , intensificándose la diferencia con el aumento de la temperatura de extrusión, e incrementa los valores de la coordenada b^* , demostrando que se tornan más amarillas. La luminosidad es mayor en las muestras controles. Estas modificaciones pueden deberse al mayor contenido de azúcares en estos materiales que promueven reacciones de pardeamiento, ligado a productos más oscuros y amarillentos y de menor homogeneidad. Los polifenoles y carotenoides incorporados pueden tener un rol importante en la modificación de estas coordenadas de color. En cuanto a la textura, la dureza es similar entre las muestras control y las adicionadas con tallos de alcauil y pulpa de calabaza, con valores aceptables de crocancia, independientemente de las condiciones de extrusión. La solubilidad de los *snacks* a nivel bucal es mayor con la adición de los tallos de alcauil, pero con la incorporación de ambos productos la adhesividad disminuye, aumentando la calidad del extruido. Respecto a los compuestos bioactivos, el contenido de polifenoles totales se incrementa considerablemente con la adición de estos ingredientes, principalmente en el caso de calabaza (entre 6 y 13 veces mayor). De manera similar, la actividad antioxidante también se incrementa significativamente en comparación con el control, aunque en mayor medida para la adición de alcauil. El aumento en la velocidad de rotación de tornillo favorece estos valores, ya que se estima que genera una mayor disrupción del material celular, promoviendo la liberación de los compuestos con propiedades antioxidantes, además de favorecer la formación de melanoidinas y otros compuestos pardos que también influyen en estas determinaciones (37).

Pequeñas cantidades de algunos ingredientes pueden generar grandes modificaciones. La incorporación de ciertos materiales puede retardar o limitar ciertas reacciones de deterioro, como lo es la oxidación lipídica, que se ve favorecida en los alimentos extruidos por ser muy porosos, con gran superficie de contacto dada por la expansión y de bajo contenido de humedad, aun cuando su contenido lipídico sea bajo. Además, los antioxidantes propios de las materias primas pueden destruirse durante el calentamiento térmico en el proceso de extrusión, aumentando las posibilidades de la ocurrencia de la oxidación. Como consecuencia se generan compuestos que afectan la calidad sensorial y organoléptica, con la formación de *off-flavors*. Se necesita, entonces, la incorporación de antioxidantes provenientes de otras fuentes para disminuir el ranciamiento. En la búsqueda de alternativas a los antioxidantes sintéticos, se propone el uso de fuentes naturales, como polvos secados por spray de extractos provenientes de ginkgo, cebolla, cáscara de papa y salvado de trigo. Con la incorporación de sólo 2 % en formulaciones a base de maíz se produce una mayor expansión en el caso del ginkgo y menor con salvado de trigo, mientras que con el resto no hay diferencias respecto al control. De manera inversa, la densidad relativa es la menor en el caso del ginkgo y máxima y sin diferencias con el control para el salvado de trigo. Respecto al color, el agregado de ginkgo y cáscara de papa genera muestras más oscuras (menor L^* y b^* y mayor a^*); el resto no presenta grandes diferencias con el control. En cuanto al contenido de polifenoles y actividad antioxidante, los productos conteniendo ginkgo presentan el mayor valor de compuestos bioactivos, pero no existen diferencias en cuanto a la actividad antioxidante con respecto al control; es decir, no hay una correlación entre ambas técnicas, lo cual puede indicar que en la determinación de actividad antioxidante existan otros compuestos que no sean polifenoles que estén interviniendo en el resultado. Sin embargo, en lo referido a la cuantificación de aldehídos provenientes de la oxidación lipídica (decanal, hexanal, nonanal, octanal) durante el almacenamiento de varias semanas se manifiesta el efecto protector de estos extractos, ya que, por ejemplo, con el salvado de trigo el contenido de aldehídos luego de 3 semanas es menor al control. Esto se mantiene luego de 6 semanas, donde además los extruidos con ginkgo, cáscara de papa y cebolla acumulan valores inferiores de aldehídos en comparación con la formulación exclusiva de maíz. El salvado de trigo protege de la oxidación lipídica en mejor medida que la formulación control hasta 11 semanas posteriores a su elaboración (38).

Además de la incorporación de propiedades funcionales, ciertos ingredientes pueden impartir colores distintivos y atractivos para los consumidores. Tal es el caso de las antocianinas, provenientes por ejemplo de frutos rojos, que aportan tonalidades rojizas o violetas, además de ser protectoras frente a la aparición de ciertas enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, entre otras. La incorporación de este tipo de frutos a formulaciones destinadas a extrusión se facilita cuando se encuentran en forma de polvos, evitando inconvenientes mecánicos debidos a las cáscaras/semillas que pueden afectar el rendimiento de los tornillos. La adición en un 1 % de polvos de arándanos, arándanos rojos, uvas y frambuesas a formulaciones a base de maíz genera grandes diferencias en sus características. Si bien el

grado de expansión y la densidad en todas las muestras es similar, el control resulta más luminoso y menos rojizo que el resto de las formulaciones, siendo la muestra con arándano la más oscura y con mayor tonalidad azulada. El contenido de fenoles solubles es mayor en todos los extruidos adicionados con polvos de frutas y esta diferencia es aún mayor en lo referido a antocianinas, con máximos en el caso del uso de arándanos. Es importante destacar que las antocianinas son compuestos muy termolábiles y que un gran porcentaje se pierde por el proceso de extrusión. A pesar de esto, no existe una relación directa con la actividad antioxidante, ya que el control presenta mayor porcentaje de inhibición del radical ABTS, aunque esto pueda deberse al desarrollo de productos de Maillard que presentan propiedades antioxidantes, y que la adición de los polvos frutales haya inhibido esta reacción, generándose menor cantidad de compuestos bioactivos. En relación a la oxidación lipídica, luego de 3, 6 y 11 semanas de almacenamiento, las muestras que contienen frambuesa y uva acumulan menor cantidad de compuestos volátiles que el control en los tres períodos de análisis. Algunos compuestos en particular se forman en menor medida en todas las muestras adicionadas con frutas en comparación al control, como es el caso del pentano y el hexanal, en todo el período de estudio (39).

A nivel industrial, uno de los residuos menos aprovechados y mayormente descartado sin considerar sus propiedades es el bagazo de la cerveza, que tiene un elevado contenido de fibra, proteínas y compuestos polifenólicos. Su utilización, además de beneficios nutricionales, supone una ventaja a nivel ecológico y la posibilidad de plantear un nuevo ingrediente en las formulaciones destinadas a alimentación humana. La incorporación del bagazo en reemplazo del maíz incrementa los niveles de proteínas, lípidos, fibras y cenizas y reduce el contenido de almidón. Estos cambios a nivel composicional repercuten directamente en las propiedades físicas. La expansión es menor a medida que se incrementa el contenido de bagazo incorporado, aunque el aumento de la velocidad del tornillo compensa en cierta medida esta diferencia, pero nunca alcanza los valores del control. Lógicamente, los valores de densidad aparente siguen de manera inversa esta tendencia. Al haber una menor cantidad de almidón disponible, el IAA disminuye con el aumento en el porcentaje de sustitución de harina de maíz por bagazo. Por otro lado, su incorporación produce alimentos más oscuros (valores de L^* más chicos), menores valores de la coordenada b^* y mayores de a^* . En relación a las propiedades químicas, la incorporación del mencionado residuo no genera modificaciones en el contenido de polifenoles ni en la actividad antioxidante, independientemente de la velocidad de rotación del tornillo. La digestibilidad de las proteínas no se modifica a pesar de que aumentan los niveles de ácido fítico, considerado un compuesto anti nutricional por su capacidad de ligar minerales y proteínas y, por lo tanto, disminuir su disponibilidad. Sin embargo, se obtienen valores significativamente mayores de almidón resistente, con propiedades funcionales, ya que promueve la formación de ácidos grasos de cadena corta a nivel hepático. Los niveles se favorecen con el uso de bajas velocidades de rotación del tornillo (40).

6. Conclusiones

La versatilidad del proceso de extrusión permite desarrollar formulaciones a base de mezclas de harinas o con la incorporación de diferentes ingredientes funcionales vehiculizados como polvos. Además, en este tipo de productos es determinante el efecto conjunto de las condiciones de elaboración y de formulación sobre las propiedades físico-químicas y mecánicas de los alimentos obtenidos. La harina de maíz, si bien requiere suplementación para mejorar su perfil nutricional, es una excelente base para el desarrollo de alimentos listos para consumir debido a que genera productos con excelentes características sensoriales. Esto, impulsa la búsqueda de nuevas fuentes de ingredientes para el desarrollo de alimentos innovadores. El estudio de harinas tradicionales y otras menos convencionales amplía la variedad de ingredientes o materias primas que pueden utilizarse para tal fin. La posibilidad de usar extractos vegetales y subproductos agroindustriales facilita el manejo ecológico de los materiales, al mismo tiempo que se incorporan nutrientes y compuestos bioactivos a las formulaciones, en reemplazo de aditivos sintéticos. Esto supone ventajas a nivel nutricional, económico, industrial y medioambiental. Si bien el agregado de aditivos o ingredientes siempre afecta las características originales de los productos, la posibilidad de modificar las variables de proceso permite su ajuste a las necesidades de la materia prima utilizada. La búsqueda continua de nuevas fuentes, así como la modernización de la tecnología disponible hacen de la extrusión una vía eficaz para el desarrollo de alimentos innovadores que responden a la demanda actual por parte de los consumidores.

Referencias

1. Boye, J.I. (2015). *Nutraceutical and Functional Food Processing Technology*. Canada. Wiley Blackwell.
2. Bisharat, G.I., Oikonomopoulou, V.P., Panagiotou, N., Krokida, M., & Maroulis, Z. (2013). Effect of extrusion conditions on the structural properties of corn extrudates enriched with dehydrated vegetables. *Food Research International*, *53*, 1-14.
3. Ackar, D., Jozinovic, A., Babic, J., Milicevic, B., Balentic, J.P., & Šubaric, D. (2018). Resolving the problem of poor expansion in corn extrudates enriched with food industry by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *47*, 517-524.
4. Morales, P., Cebadera-Miranda, L., Cámara, R.M., Reis, F., Barros, L., Berrios, J., Ferreira, I., & Cámara, M. (2015). Lentil flour formulations to develop new snack-type products by extrusion processing: Phytochemicals and antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, *19*, 537-544.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). *The future of food and agriculture: Trends and challenges*. Rome.
6. Krecisz, M., Wójtowicz, A., & Oniszczuk, A. (2015). Effect of selected parameters on process efficiency and energy consumption during the extrusion-cooking of corn-rice instant grits. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, *7*, 139-145.
7. Beck, S.M., Knoerzer, K., Foerster, M., Mayo, S.C., Philipp, C., & Arcot, J. (2018). Low moisture extrusion of pea protein and pea fibre fortified rice starch blends. *Journal of Food Engineering*, *231*, 61-71.
8. Kristiawan, M., Micard, V., Maladira, P., Alchamieh, C., Maigret, J., Réguerre, A., Emin, M., & Valle, G.D. (2018). Multi-scale structural changes of starch and proteins during pea flour extrusion. *Food research international*, *108*, 203-215
9. Durge, A.V., Sarkar, S., Survase, S., & Singhal, R. (2011). Impact of Extrusion on Red Beetroot Colour Used as Pre-extrusion Colouring of Rice Flour. *Food and Bioprocess Technology*, *6*, 570-575.
10. Masatcioglu, T.M., Ng, P., & Köksel, H. (2014). Effects of extrusion cooking conditions and chemical leavening agents on lysine loss as determined by furosine content in corn based extrudates. *Journal of Cereal Science*, *60*, 276-281.
11. Han, Y., Tran, T.T., & Le, V.V. (2018). Corn snack with high fiber content: Effects of different fiber types on the product quality. *Lwt - Food Science and Technology*, *96*, 1-6.
12. Bisharat, G.I., Oikonomopoulou, V.P., Panagiotou, N., Krokida, M., & Maroulis, Z. (2013). Effect of extrusion conditions on the structural properties of corn extrudates enriched with dehydrated vegetables. *Food Research International*, *53*, 1-14.
13. Alam, M.S., Pathania, S., & Sharma, A. (2016). Optimization of the extrusion process for development of high fibre soybean-rice ready-to-eat snacks using carrot pomace and cauliflower trimmings. *Lwt - Food Science and Technology*, *74*, 135-144.
14. Cueto, M.A. (2016). *Transformaciones físico-químicas de granos de maíz en la elaboración de laminados y extrudados para el desayuno*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
15. Robutti, J., Borrás, F., & Eyhéabide, G.H. (1997). Zein Compositions of Mechanically Separated Coarse and Fine Portions of Maize Kernels. *Cereal Chemistry*, *74*, 75-78.
16. Fox, G., & Manley, M. (2009). Hardness methods for testing maize kernels. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57* 13, 5647-5657.
17. Farroni, A.E. (2011). *Transformaciones estructurales y físico-químicas de maíces argentinos en la producción de alimentos obtenidos por proceso de gelatinización-laminación*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
18. Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Berghofer, E., & Schoenlechner, R. (2011). Extrusion cooking properties of white and coloured rice varieties with different amylose content. *Starch-starke*, *63*, 55-63.
19. Tiwari, A., & Jha, S. (2017). Extrusion cooking technology: Principal mechanism and effect on direct expanded snacks – An overview. *International Journal of Food Studies*, *6*, 113-128
20. Ilo, S., & Berghofer, E. (1999). Kinetics of colour changes during extrusion cooking of maize grits. *Journal of Food Engineering*, *39*, 73-80.
21. Caivano, J.L., & Buera, M.P. (2012). *Color in food. Technological and Psychophysical Aspects*. Boca Raton. CRC

22. Agudelo-Laverde, L.M., Schebor, C., & Buera, M. (2013). Water content effect on the chromatic attributes of dehydrated strawberries during storage, as evaluated by image analysis. *Lwt - Food Science and Technology*, *52*, 157-162.
23. Jafari, M., Koocheki, A., & Milani, E. (2017). Effect of extrusion cooking on chemical structure, morphology, crystallinity and thermal properties of sorghum flour extrudates. *Journal of Cereal Science*, *75*, 324-331.
24. Cueto, M., Farroni, A., Rodríguez, S., Schoenlechner, R., Schleining, G., & Buera, M.D. (2018). Assessing Changes in Enriched Maize Flour Formulations After Extrusion by Means of FTIR, XRD, and Chemometric Analysis. *Food and Bioprocess Technology*, *11*, 1586-1595.
25. Paula, A.M., & Conti-Silva, A.C. (2014). Texture profile and correlation between sensory and instrumental analyses on extruded snacks. *Journal of Food Engineering*, *121*, 9-14.
26. Philipp, C., Buckow, R., Silcock, P., & Oey, I. (2017). Instrumental and sensory properties of pea protein-fortified extruded rice snacks. *Food research international*, *102*, 658-665 .
27. Masavang, S., Roudaut, G., & Champion, D. (2019). Identification of complex glass transition phenomena by DSC in expanded cereal-based food extrudates: Impact of plasticization by water and sucrose. *Journal of Food Engineering*, *245*, 43-52.
28. Logié, N., Valle, G.D., Rolland-Sabaté, A., Descamps, N., & Soulestin, J. (2018). How does temperature govern mechanisms of starch changes during extrusion? *Carbohydrate polymers*, *184*, 57-65 .
29. Coulter, L.A., & Lorenz, K. (1991). Extruded corn grits-quinoa blends: I. Proximate composition, nutritional properties and sensory evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation*, *15*, 231-242.
30. Coulter, L.A., & Lorenz, K. (1991). Extruded corn grits-quinoa blends: II. Physical characteristics of extruded products. *Journal of Food Processing and Preservation*, *15*, 243-259.
31. Pastor-Cavada, E., Drago, S., González, R., Juan, R., Pastor, J.E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2013). Physical and nutritional properties of extruded products based on whole grain with the addition of wild legumes (*Vicia lutea* subsp. *lutea* var. *hirta* and *Vicia sativa* subsp. *sativa*). *International Journal of Food Science and Technology*, *48*, 1-7.
32. Milán-Carrillo, J., Valdéz-Alarcón, C., Gutiérrez-Dorado, R., Cárdenas-Valenzuela, O.G., Mora-Escobedo, R., Garzón-Tiznado, J.A., & Reyes-Moreno, C. (2007). Nutritional Properties of Quality Protein Maize and Chickpea Extruded Based Weaning Food. *Plant Foods for Human Nutrition*, *62*, 31-37.
33. Singh, S., Gamalath, S., & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, *42*, 916-929.
34. Cueto, M., Porras-Saavedra, J., Farroni, A., Alamilla-Beltrán, L., Schoenlechner, R., Schleining, G., & Buera, P. (2015). Physical and mechanical properties of maize extrudates as affected by the addition of chia and quinoa seeds and antioxidants. *Journal of Food Engineering*, *167*, 139-146.
35. Li, S., Zhang, H., Jin, Z.T., & Hsieh, F. (2005). Textural modification of soya bean/corn extrudates as affected by moisture content, screw speed and soya bean concentration. *International Journal of Food Science and Technology*, *40*, 731-741.
36. Diaz, J., Suuronen, J., Deegan, K., Serimaa, R., Tuorila, H., & Jouppila, K. (2015). Physical and sensory characteristics of corn-based extruded snacks containing amaranth, quinoa and kañiwa flour. *Lwt - Food Science and Technology*, *64*, 1047-1056.
37. Peksa, A., Kita, A., Carbonell-Barrachina, Á., Miedzianka, J., Kolniak-Ostek, J., Tajner-Czopek, A., Rytel, E., Siwek, A., Miarka, D., & Drożdż, W. (2016). Sensory attributes and physicochemical features of corn snacks as affected by different flour types and extrusion conditions. *Lwt - Food Science and Technology*, *72*, 26-36.
38. Camire, M., Dougherty, M.P., & Briggs, J. (2005). Antioxidant-rich foods retard lipid oxidation in extruded corn. *Cereal Chemistry*, *82*, 666-670.
39. Camire, M., Dougherty, M.P., & Briggs, J. (2007). Functionality of fruit powders in extruded corn breakfast cereals. *Food Chemistry*, *101*, 765-770.
40. Ainsworth, P., Ibanoglu, S., Plunkett, A., Ibanoglu, E., & Stojceska, V. (2007). Effect of brewers spent grain addition and screw speed on the selected physical and nutritional properties of an extruded snack. *Journal of Food Engineering*, *81*, 702-709.

Capítulo 16

Evaluación de cambios físicoquímicos en fibras de agave obtenidas por Organosolv asistido por microondas

Yuliana Rosas Hernandez¹, Carolina Buitrago Arias¹, Eduardo San Martín Martínez², Sandra Victoria Avila Reyes¹, Franklin Loring Younce³, Rita Martínez Velarde¹, Martha Lucia Arenas Ocampo¹, Brenda Hideliza Camacho Diaz^{1*}

¹Instituto Politécnico Nacional. CEPROBI. Yutepec, Morelos. Mexico

²Instituto Politécnico Nacional- CICATA. Col. Irrigacion, Del. M. Hidalgo. Mexico

³Washington State University, School of Food Science, Pullman, WA. Estados Unidos

*bhcamachod@yahoo.com.mx

Resumen

El estudio del bagazo de agave tiene un gran interés científico porque es una matriz lignocelulósica compuesta por: celulosa, lignina y hemicelulosa (1). La celulosa, la hemicelulosa y la lignina son de gran importancia en la industria de los alimentos, farmacéutica, papelera y de materiales para obtener productos de valor agregado como: alcoholes, ácidos orgánicos, compuestos, biocombustibles, sustrato para la obtención de hongos comestibles, piensos para el ganado (ensilaje) y en menor medida, la extracción de otros metabolitos como: enzimas, compuestos fenólicos, biopolímeros y fibras solubles e insolubles (2,3).

Desde la década de 1950, se han estudiado varios métodos de fraccionamiento de material lignocelulósico para obtener celulosa, hemicelulosa y lignina, como organosolv asistido con extracción por microondas. Estos son métodos amigables con el medio ambiente que obtienen moléculas intactas, como biopolímeros, polisacáridos y compuestos fenólicos, en menos tiempo usando solventes orgánicos que son fácilmente recuperables, lo que reduce el desperdicio (4). En organosolv asistido con microondas, la energía térmica se produce al interior del recipiente en lugar que se genere en el exterior y pase a través del recipiente, lo que permite una mejor extracción de las moléculas de la matriz lignocelulósica, en comparación con el método convencional.

1. Introducción

El género *Agave* es endémico de América, de sus aproximadamente 200 especies, 150 se encuentran en México (5), entre las cuales se encuentra el *Agave angustifolia* Haw. Taxonómicamente este agave se ubica dentro del género *Agave* de la familia Agavaceae. Gentry, 1982 (6) hizo la caracterización del *Agave angustifolia* Haw, describiéndola como una planta que contiene un tallo corto, hojas múltiples las cuales son parecidas a una espada y con una roseta radial. Sus principales usos son como alimento, fibra, en la agroindustria para producir bebidas alcohólicas (mezcal), y la obtención de macromoléculas como fructanos (inulina).

La fibra de agave está compuesta principalmente por macromoléculas como son: la celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (Figura 1), estas constituyen el material lignocelulósico del bagazo de agave y son las que le confieren propiedades como rigidez, insolubilidad en agua, entre otras (1, 7).

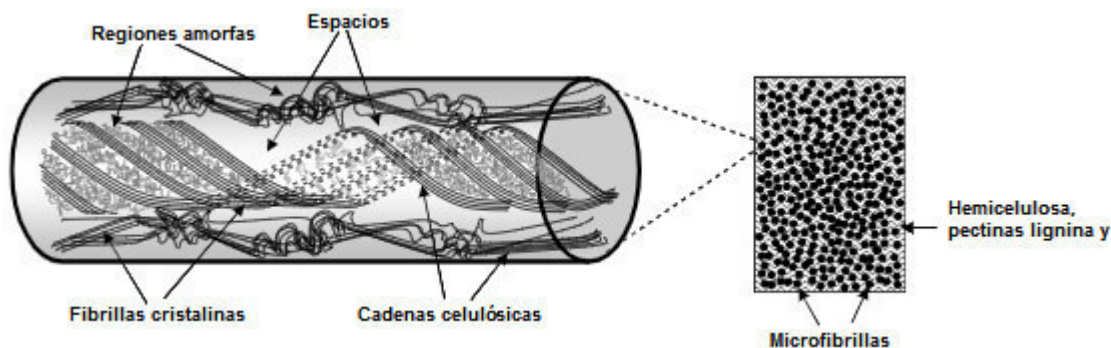


Figura 1. Diagrama esquemático de la composición macromolecular de la matriz lignocelulósica (1)

2. Composición macromolecular de fibras de agave

2.1. Celulosa

La celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_x, Es el principal componente de la matriz lignocelulósica del bagazo de agave, se trata de un polisacárido que contiene una cadena lineal de monómeros de D-glucosa los cuales están unidos por enlaces β -(1,4) (Figura 2), su conformación está dada por largas cadenas lineales nombradas microfibrillas, las cuales están unidas entre sí por puentes de hidrógeno y fuerzas intermoleculares de Van der Waals, estas forman una estructura cristalina la cual es resistente a la hidrólisis y contiene regiones amorfas que son susceptibles a la degradación por enzimas. (8).

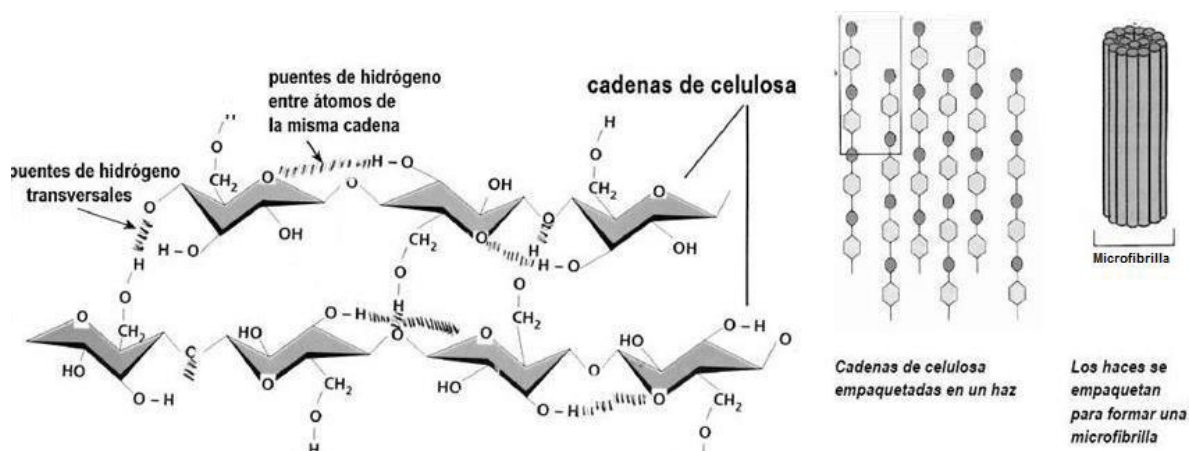


Figura 2. Representación estructural del polímero de celulosa (9)

La disposición espacial que tienen las cadenas lineales y los puentes de hidrógeno que tienen con los grupos hidroxilo de las cadenas adyacentes confieren una estructura con regiones altamente cristalinas, separadas por regiones menos ordenadas, denominadas amorfas. De esta manera, la celulosa es considerada como una sustancia paracristalina, pero nunca un cristal perfecto (10). Se estima que la celulosa presenta aproximadamente 85 % de regiones cristalinas y 15 % de regiones amorfas (11).

2.2. Lignina

La lignina es un polímero aromático que está unido a la hemicelulosa por medio de enlaces covalentes y a su vez la hemicelulosa está unida a las microfibrillas de celulosa por enlaces tipo puentes de hidrógeno (12).

La lignina es una molécula hidrofóbica, que forma una red polimérica amorfa, heterogénea, altamente ramificada y ópticamente inactiva. Esta molécula está compuesta por tres principales monolignoles: alcohol

coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumarílico. Estos monolignoles presentan reacciones de oxidación en la pared celular catalizadas por enzimas peroxidadas las cuales forman polímero de lignina (13,14).

Después de la polimerización, la lignina queda en la pared celular; la síntesis y la disposición de esta se produce en las fibras de la celulosa, donde los monómeros liberados se unen proceso de oxidación.

Existen dos tipos de ligninas, las ligninas guayacil y ligninas guayacil-siringil. Las monocotiledóneas poseen de 35-80 % de unidades de alcohol coniferil, 20-55 % de alcohol sinapil y 5-35 % de alcohol p-cumaril, por lo tanto, se puede inferir que el Agave es una planta monocotiledónea que contiene lignina de tipo guayacil (15, 16).

2.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido formado por monómeros de diferentes carbohidratos ejemplo de esto están las hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa), pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), ácidos urónicos (D-ácido glucurónico, 4-O-metil-D-ácido glucurónico) y desoxi-hexosas (L-ramnosa). Estos heteropolímeros fijan a la superficie de las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno. Esta adhesión se da por los grupos hidroxilo (OH-) que contienen los azúcares que constituyen a la celulosa y hemicelulosa, mejorando así la resistencia de la pared celular. La hemicelulosa al ser altamente ramificada y tener varios grupos polares en sus azúcares, normalmente es insoluble, pero bajo condiciones especiales puede ser parcialmente soluble en agua. También va a depender de su grado de ramificación, es decir a mayor ramificación mayor solubilidad (17).

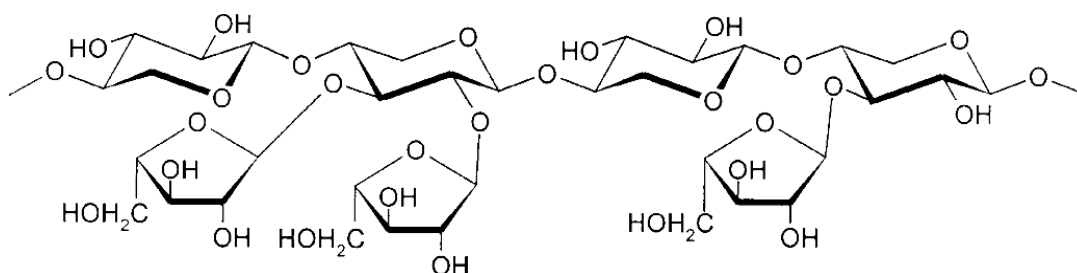


Figura 3. Ejemplo de la estructura química de una hemicelulosa, observamos el complejo formado por hexosas y pentosas: L-arabino-D-xilana (18)

2.3.1. Usos y aplicaciones del material lignocelulósico

Los compuestos principales de las fracciones químicas del material lignocelulósico del bagazo de agave son la celulosa, hemicelulosa y lignina, estos componentes son susceptibles de separarse bajo esquemas de fraccionamiento integral (19). Debido a esto sus derivados permiten obtener productos con un valor agregado como: encapsulantes, material pared, refuerzo, emulsificantes y estabilizantes

Un derivado de la celulosa es la carboximetilcelulosa la cual es utilizada en la industria alimentaria como integrador, emulsificador, desaglutinante, estabilizador o anticoagulante (20). Otro uso común son los polímeros celulósicos son utilizados en la industria papelera (21).

De los azúcares monoméricos (pentosas) que contienen las hemicelulosas se derivan medios fermentables, debido a la variedad de monómeros y oligómeros que la constituyen se pueden obtener una amplia variedad de productos químicos. Las aplicaciones en la industria alimentaria son muy amplias ejemplo de esto es el uso como estabilizante, aglutinante y para formar coloides (19).

El proceso de obtención de lignina por medio de disolventes orgánicos la hace más susceptible para ser utilizada ejemplo de esto lo encontramos en la elaboración de vainillina (22), debido a que esta se degrada menos en comparación a la lignina obtenida por el proceso Kraft.

Sin embargo, la lignina cobra cada vez más importancia por las posibilidades de ser usada en el sector de materiales y sus aplicaciones en farmacia o en alimentos funcionales, aditivos de betunes, antioxidantes, materiales poliméricos y en la elaboración de asfaltos (19).

3. Procesos para el fraccionamiento del material lignocelulósico

El principio de este proceso químico es separar los componentes mayoritarios de la pared de las células vegetales: celulosa, hemicelulosa y lignina. En la práctica existen métodos como el despulpe que se utiliza en la industria papelera; estos métodos se utilizan para eliminar una considerable parte de lignina, sin embargo, este proceso degrada una parte de celulosa lo cual afecta las fracciones resultantes debido a que no corresponde a todo el material fibroso que originalmente cuenta la planta (23). En términos químicos este proceso es complejo, debido a la insolubilidad de la lignina en la mayoría de los solventes, se deben romper los enlaces que los unen con la hemicelulosa (24). Debido a lo anterior se busca un proceso de fraccionamiento donde se pueda obtener mayor rendimiento y también se mantenga la estructura de las moléculas que conforman la matriz lignocelulósica. Ejemplo de estos procesos son Kraft o al sulfato, Organosolv (25, 26) y Organosolv asistido con microondas.

3.1. Método de Kraft

El proceso Kraft viene de la palabra alemana Kraft que significa fuerza o resistencia, al cual deriva de la notable resistencia de la pulpa comparándola con la obtenida de los procesos de pulpeo en la industria papelera. Sus rendimientos varían entre un 40 y 60 % y su ventaja es que requiere tiempos cortos de cocción. El método Kraft tradicional se caracteriza por una baja selectividad en cuanto a la deslignificación, fundamentalmente durante la etapa inicial y final del proceso (27). Sin embargo, el proceso Kraft convencional, presenta algunas desventajas como son:

- La deslignificación consume una importante cantidad de álcali.
- Se generan gases de mal olor que son derivados de compuestos de azufrados.
- La lignina residual debe eliminarse mediante un proceso llamado blanqueo el cual genera problemas de contaminación ambiental por la producción de lejías negras.

3.2. Proceso Organosolv para el fraccionamiento del material lignocelulósico

El proceso organosolv es un proceso de deslignificación con disolventes orgánicos. Este proceso es utilizado para la producción de pastas celulósicas, con el fin de individualizar las fibras contenidas en el material lignocelulósico. Este proceso es una alternativa al método Kraft, ya que ha sido desarrollado con el objetivo de hacer un uso más eficiente de la materia prima a través de la adecuada separación de sus fracciones (celulosa, hemicelulosa y lignina), y la posibilidad de recuperar y reutilizar sus disolventes (26).

El proceso organosolv, se fundamenta en el fraccionamiento de la matriz lignocelulósica con mezclas de agua y disolventes orgánicos que tengan un bajo punto de ebullición (acetona, metanol, acetato de etilo, etanol, etc.) (Figura 4). Estos disolventes pueden ser fácilmente recuperados por destilación, además también puede existir un ácido mineral, cuya función sea como catalizador de la reacción de deslignificación (28).

Entre la variedad de disolventes orgánicos que se encuentran en la literatura, el etanol y el ácido acético han recibido una particular atención, dada su habilidad para lograr una extensiva y selectiva deslignificación, pero el más recomendado para obtener fracciones integrales es el etanol, ya que la reacción que se genera es ligera en comparación con el ácido acético. La única desventaja del proceso de organosolv es que los tiempos de contacto son largos generando así grandes costos de energía (29).

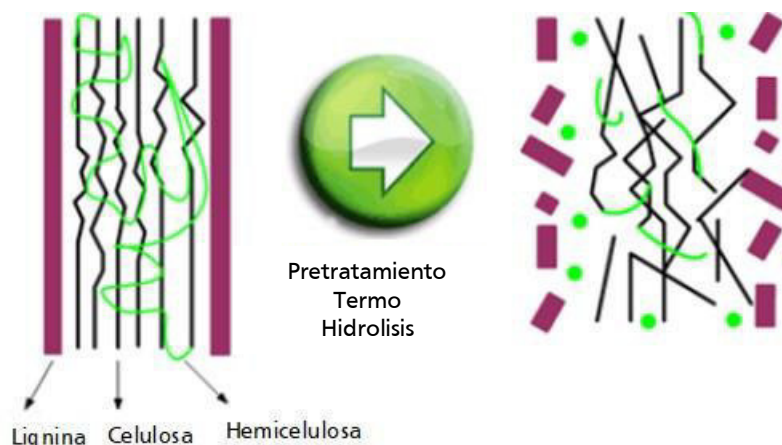


Figura 4. Representación del fraccionamiento del material lignocelulósico por el proceso de organosolv (28)

3.3. Proceso organosolv asistido con microondas

En los últimos años se busca nuevas técnicas de extracción que cumplan con los siguientes puntos: que sean amigables con el medio ambiente, más rápidos y más eficientes que los métodos de extracción tradicionales.

Recientemente el calentamiento con microondas ha tenido una atención importante, para la extracción de componentes a base de biomasa, ya que se obtienen alta eficiencia de rendimientos con respecto a los procesos de extracción tradicionales que son a base de calentamiento eléctrico (30; 31).

La energía de microondas es no ionizante; la energía del fotón de microondas es lo suficientemente alta como para inducir etapas de reacción constructiva o destructiva (32). El principio físico detrás del proceso de extracción asistida con microondas se basa en las propiedades dieléctricas de las muestras y disolventes, y su interacción con la radiación de microondas (33, 34, 35). El calentamiento se produce por conducción iónica y polarización dipolar (36).

La extracción asistida por microondas surgió como un método eficiente para la extracción de productos nutracéuticos (37,38). Este proceso de extracción se ha utilizado para prevenir la desnaturalización de compuestos termolábiles. Por ello se recomienda usar como herramienta para una rápida y fiable preparación de muestras para la cromatografía (39). Por lo tanto, representa una alternativa al proceso de organosolv convencional, para la transferencia de energía térmica a los medios de reacción. Hay dos tipos de sistemas para la extracción asistida por microondas, sistema cerrado, que funciona a presión controlada, y sistema abierto, operando bajo condiciones atmosféricas.

4. Uso del proceso de extracción organosolv en *Agave angustifolia* Haw

El bagazo residual de *Agave angustifolia* Haw se obtuvo de la extracción acuosa de fructanos mediante un proceso modular (Patente MX/E/2015/087857). El bagazo se deshidrató, posterior a esto el tamaño de partícula disminuyó entre 3 y 1 cm. La extracción se realizó con un sistema de reactor de microondas Discover CEM modelo 908005 (CEM Corporation; Matthews, NC, S), se usó como un sistema abierto (donde se usó la presión atmosférica) y un sistema cerrado (donde se controló a un calibre de 100 Pa presión) con una potencia de microondas constante de 80W para cada uno. El solvente utilizado fue una solución de etanol hidroalcohólico al 40 % y 60 %, con tiempos de procesamiento de 1 y 2 h respectivamente

4.1. Proceso de extracción organosolv asistido con microondas (sistema abierto y cerrado)

Para los tratamientos de sistema abierto, se colocó el bagazo de agave en una solución de etanol hidroalcohólico al 40 o 60 % utilizando HCl al 0,1 % (v / v) como catalizador. La reacción se realizó en un sistema de reflujo. Se produjo una temperatura de 120 °C generada por el equipo, en función de la potencia de 80 W que se programó en el equipo, con agitación constante.

Para el sistema cerrado, se usó bagazo de agave, en una solución de etanol hidroalcohólico al 40 o 60 % y HCl al 0,1 % (v/v) en un vial bajo agitación constante. La temperatura generada en la muestra con 80 W de potencia de microondas y 100 Pa de sobrepresión fue de 150 °C como resultado del vapor sobrecalentado generado en el recipiente en comparación con el sistema abierto.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la suspensión se filtró, el material retenido se designó como fracción 1 (F1). El filtrado se pasó nuevamente a través de un papel de filtro donde se obtuvo el sedimento de fracción 2 (F2) y un sobrenadante de fracción 3 (F3). La fracción F3 se usó para la recuperación del disolvente y para la caracterización de los residuos solubles.

4.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Se analizaron celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina para las muestras de bagazo no tratado (BST), las muestras de sistema abierto asistido por microondas F1 y F2 con etanol al 40 y 60 % durante tiempos de 1 y 2 horas (F1MA401, F2MA401, F1MA602 y F2MA602) y las muestras de sistema cerrado asistido por microondas F1 y F2 con etanol al 40 y 60 % durante 1 y 2 horas (F1MC401, F2MC401, F1MC602 y F2MC602). (Figura 5).

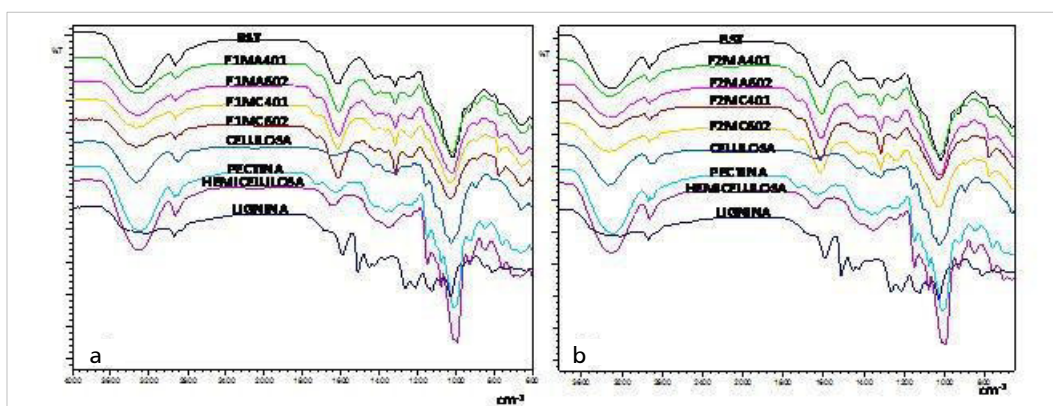


Figura 5. Espectro FTIR. Bagazo sin tratamiento (BST). A) F1 del sistema abierto (F1MA401 y F1MA602) y sistema cerrado (F1MC401 y F1MC602). B) F2 del sistema abierto (F2MA401 y F2MA602) y sistema cerrado (F2MC401 y F2MC602)

El espectro FTIR se llevó a cabo para caracterizar la estructura química para identificar los grupos funcionales presentes en cada muestra, así como su comparación con los estándares de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Estos se muestran en las Figuras 1A y 1B que corresponden a F1 y F2, que se obtuvieron mediante el método organosolv asistido con microondas en un sistema abierto y cerrado, respectivamente. Se encontró la señal de 1620 cm^{-1} que normalmente se atribuye a la vibración del OH del agua absorbida por la celulosa. En la región entre 1200-900 cm^{-1} se encuentran los grupos C-OH, C-O y el enlace glucósido C-H de la celulosa. Lojewska *et al.* 2005 (40), observaron que la señal a 1620 cm^{-1} todavía estaba presente incluso después de que la muestra se secó, ya que la interacción celulosa-agua es muy fuerte y difícil de romper. Se observó la presencia de heteropolímeros (hemicelulosa y pectina) en las fracciones lignocelulósicas obtenidas en base a la señal de 3332 cm^{-1} que se atribuye a la vibración de alargamiento del enlace de hidrógeno del OH de los polisacáridos. Las señales a 924 y 2862 cm^{-1} se muestran debido a la presencia de grupos metilos (CH_3) y metilenos (CH_2). En 1724 cm^{-1} se presenta un hombro característico de la vibración de los grupos C = O de grupos acetilo y ésteres urónicos de pectina, hemicelulosa (41).

Por otro lado, se observó la presencia de lignina en las fracciones lignocelulósicas bajo la señal de 1724 cm^{-1} , ya que presentaba un hombro característico de la vibración de los grupos C = O que también podía atribuirse a los enlaces de los ésteres alifáticos de los grupos carboxilo. en ácidos ferúlico y p-cumarico de lignina (41). Además, la presencia de ácido ferúlico puede corroborarse con los resultados de la cromatografía en capa fina de alta resolución. La señal observada a 1500 y 1427 cm^{-1} , que es muy

levemente notable, se atribuyó a la vibración característica de enlaces C = C que tienen los anillos aromáticos de lignina (41, 31,42).

Los F1 y F2 presumiblemente tenían la misma composición macromolecular (celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina), por lo que con este análisis fue posible afirmar que la estructura de las moléculas no se vio afectada por los sistemas de fraccionamiento utilizados.

4.3. Calorimetría diferencial de barrido

Los resultados de los estudios de calorimetría mostraron concordancia con los obtenidos por espectroscopía infrarroja, porque se observó que las fracciones lignocelulósicas están compuestas de celulosa, hemicelulosa y lignina. La Figura 2 muestra los termogramas de patrones de celulosa (108.15 °C, entalpía = 570.77 cal/g), hemicelulosa (122 °C, entalpía = 111.94 cal/g) y lignina (121.31 °C, entalpía = 88.86 cal/g). La BST utilizada como control mostró una exotermia a 142,51 °C con una entalpía = 43,10 cal/g y una endoterma a 221,16 °C con entalpía = -19,64 cal/g correspondiente a reacciones derivadas de la degradación térmica, como la evaporación del agua y la cristalización de polisacáridos como hemicelulosas, pectinas y residuos de fructanos que están presentes (43).

De manera similar, el comportamiento de la fracción F1MA602 (Tp = 105.32 °C y Entalpía = 95.31 cal/g) (Figura 6A) muestra que en el rango de temperaturas exotérmicas presentado por F1; Están inmersas las exotermas de las tres macromoléculas principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina. Esto confirma los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja de que los principales componentes lignocelulósicos todavía están presentes en las fracciones lignocelulósicas. Es de destacar que en la muestra F1MA401 (Figura 6A) se generó una exotermia con una entalpía mucho mayor con respecto al resto de las muestras. Este comportamiento podría deberse a la presencia de oligos o polímeros contenidos en esta muestra, según Naranjo *et al.*, (2016) (43), donde mencionaron que cuando la entalpía disminuye se debe a la ruptura de las cadenas de azúcar.

El comportamiento de F1MC401 con Tp = 109.82 °C y entalpía = 140.57 cal/g y F1MC602 con Tp = 144.18 °C y entalpía = 151.03 cal/g (Figura 6B) mostró exotermas que confirmaron que la composición de la F1 era celulosa, hemicelulosa y lignina. Por otro lado, se observó que el F1MC602 tenía un perfil similar a la lignina.

La presencia de lignina en F1MC602 podría verse influenciada por las reacciones de sustancias derivadas de la degradación de compuestos extraíbles como las pectinas. Los azúcares, entre otros compuestos termolábiles que forman la matriz lignocelulósica de las paredes celulares de los diferentes tejidos que constituyen el bagazo de agave, se descomponen térmicamente a temperaturas inferiores a 200 °C, lo que permite la exposición de la lignina.

La Figura 6C muestra los termogramas de las muestras de sistema abierto: F2MA401 y F2MA602 con Tp = 114.64 °C y ΔH = 130.09 cal/g, F2MA602 con Tp = 99.349 °C y ΔH = 113.39 cal/g. La figura 6D muestra los termogramas de muestras de sistemas cerrados: F2MC401 con Tp = 117.003 °C y ΔH = 106.47 cal/g y F2MC602 Tp = 109 °C y ΔH = 122.23 cal/g.

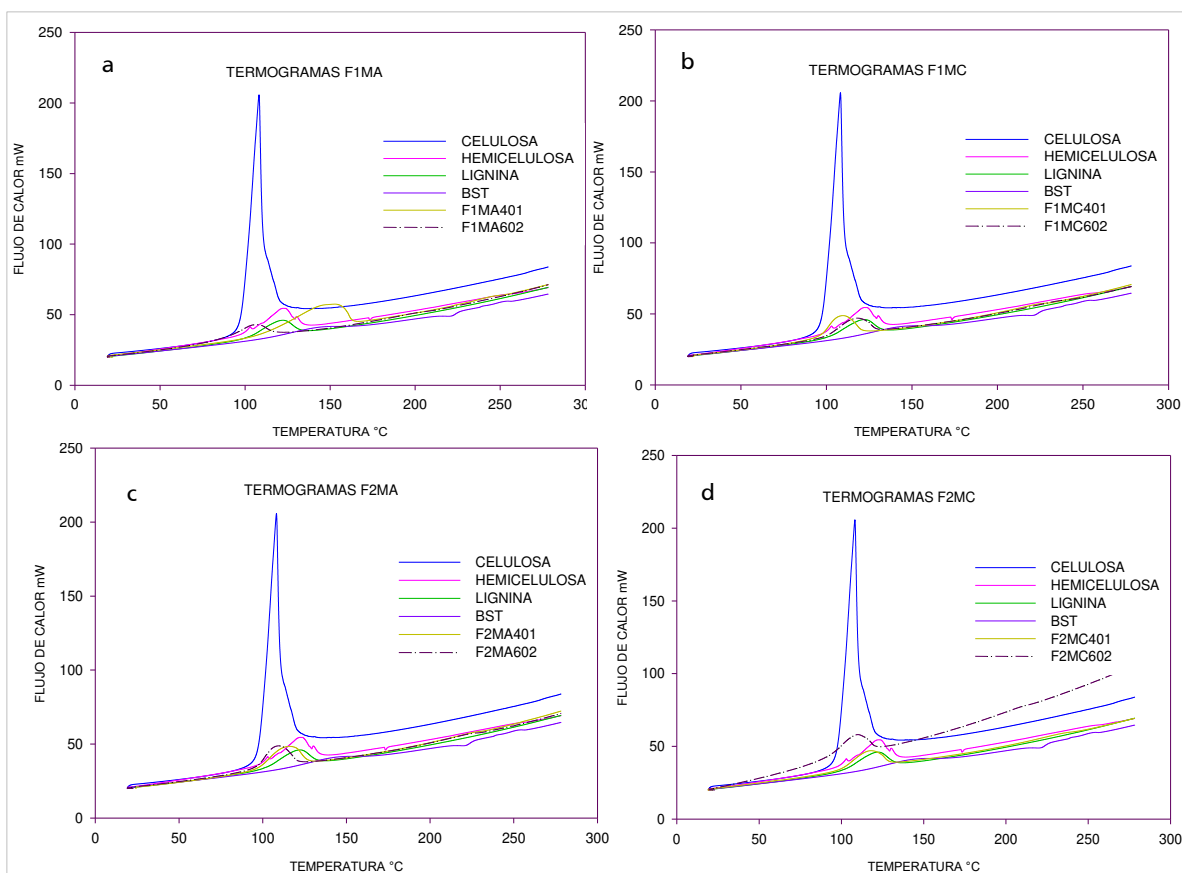


Figura 6. Termogramas de F1 y F2 de la extracción asistida con microondas en: a) Sistema abierto de F1; b) Sistema cerrado de F1; c) Sistema abierto de F2 y d) Sistema cerrado de F2

Según los termogramas, se puede observar que el F2 obtenido en las condiciones más bajas del sistema abierto y cerrado contiene los tres compuestos (celulosa, hemicelulosa y lignina), pero la mayoría de ellos podrían ser heteropolímeros como hemicelulosas y compuestos pécticos. La presencia de lignina puede deberse a la luz y al tipo de celulosa que puede ser amorfa porque es más reactiva y tiene una estructura desordenada, en comparación con la estructura cristalina que es inactiva y muy organizada para formar microfibrillas.

4.4. Difracción de rayos X

Se obtuvieron patrones de difracción de rayos X de BST, F1MA401, F1MA602, F1MC401 y F1MC602. Todos los difractogramas mostraron picos característicos de oxalato de calcio ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a $2\theta = 15$, 24.5 y 30.5 (Figuras 7). Por otro lado, había dos signos sobresalientes, según Hidalgo *et al.*, 2015 (44), podría corresponder a la parte orgánica del bagazo de agave, con señales que están en $2\theta = 16.5$ y un pico muy pronunciado en $2\theta = 21.9$. Con el primero correspondiente a un compuesto complejo amorfo tal como: celulosa amorfa, hemicelulosa y pectina. Y el segundo indica la cristalinidad de la celulosa. El oxalato de calcio ya ha sido reportado por Pérez *et al.*, 2015 (45), en el bagazo Agave Tequilana Weber.

En BST, una meseta de $2\theta = 16$ a 20 se observó que la meseta disminuía a medida que los tratamientos avanzaban para formar un valle. Otras diferencias fueron que F1MC401 fue el que mostró la mayor intensidad en el pico de $2\theta = 21.9$, que fue la celulosa cristalina y la parte amorfa ($2\theta = 16$). Por otro lado, se generó un efecto en el oxalato de calcio, ya que los picos característicos disminuyeron su intensidad y un pico muy notorio en $2\theta = 23.8$ desaparece por completo con respecto a BST y F1MA401.

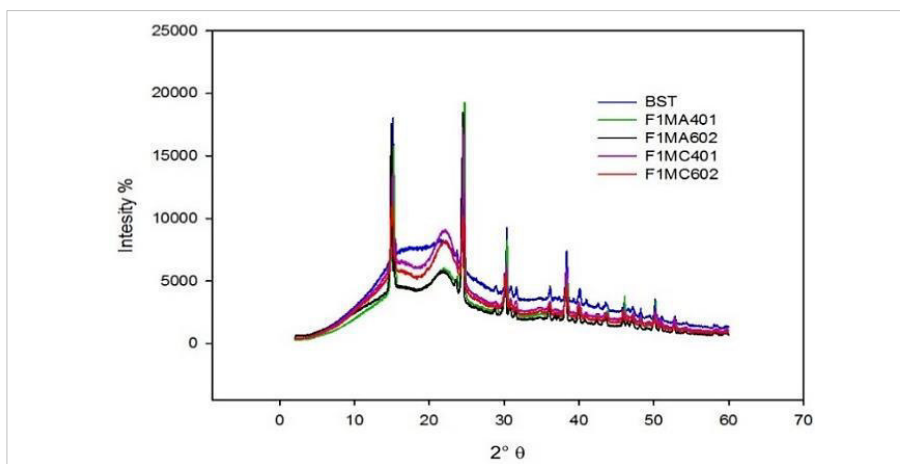


Figura 7. Difractogramas de F1. Bagazo sin tratamiento (BST); Extracción asistida por microondas en sistema abierto con etanol al 40 % durante 1 h (F1MA401); Extracción asistida por microondas en sistema abierto con etanol al 60 % durante 2 h (F1MA602); Extracción asistida por microondas en sistema cerrado con etanol al 40 % durante 1 h (F1MC401); Extracción asistida por microondas en sistema cerrado con etanol al 60 % durante 2 h (F1MC602)

En F1MC602, el pico de celulosa cristalina fue más intenso en el sistema cerrado que en el sistema abierto (F1MA602). Los picos característicos del oxalato de calcio y el de la parte amorfa disminuyeron su intensidad. Este comportamiento se debió a la energía térmica generada en el sistema cerrado, que es mucho mayor, lo que permite la hidrólisis de polisacáridos no celulósicos y la exposición a un mayor grado de celulosa cristalina. Los picos de oxalato de calcio fueron menos intensos ya que se pudo llevar a cabo una disolución de estas sales. Chen *et al.*, 2011 (46), informaron que después del tratamiento se eliminó gran parte de la hemicelulosa y la lignina, lo que permitió la visibilidad de la parte cristalina de la celulosa. Mencionaron que había mayor cristalinidad en el bagazo tratado que en el no tratado, lo que se asoció con la gran resistencia de la celulosa.

4.5. Identificación de azúcar y compuestos fenólicos por cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC)

La fracción 3 (F3) se usó para la identificación de los azúcares y fenoles residuales a través de un método de cromatografía de capa fina (HPTLC) de alto rendimiento. Se analizaron 5 μ L de cada tratamiento de muestra F3: F3 de organosolv asistido con proceso de microondas en el sistema abierto a 40 y 60 % durante 1 y 2 horas respectivamente (F3MA401 y F3MA602) y en el sistema cerrado a 40 y 60 % para 1 y 2 horas (F3MC401 y F3MC602).

La Figura 8A se presenta la placa para el análisis de compuestos fenólicos. En la muestra F3MC602, la presencia de una estela que corresponde a compuestos fenólicos de cadena corta, se percibió con mayor intensidad en comparación con el resto de los procesos. Además, se observó la presencia de dos monolignols con $R_f = 0.58$ y $R_f = 0.66$ que podrían corresponder al ácido ferúlico y la vainillina. Este comportamiento se debió a la hidrólisis parcial de la estructura de lignina.

La Figura 8B mostró la placa del análisis de azúcar, donde se observó una estela marrón rojiza. A medida que el tratamiento se volvió más drástico, la estela se volvió menos presente, hasta alcanzar las condiciones máximas donde desapareció por completo. Este comportamiento sugiere la presencia de oligosacáridos en las muestras F3MA401 y F3MA602, debido a la hidrólisis parcial de oligo y polímeros de carbohidratos atrapados en el bagazo de agave, como los fructanos y aquellos como la hemicelulosa que forman las paredes celulares de diferentes tejidos.

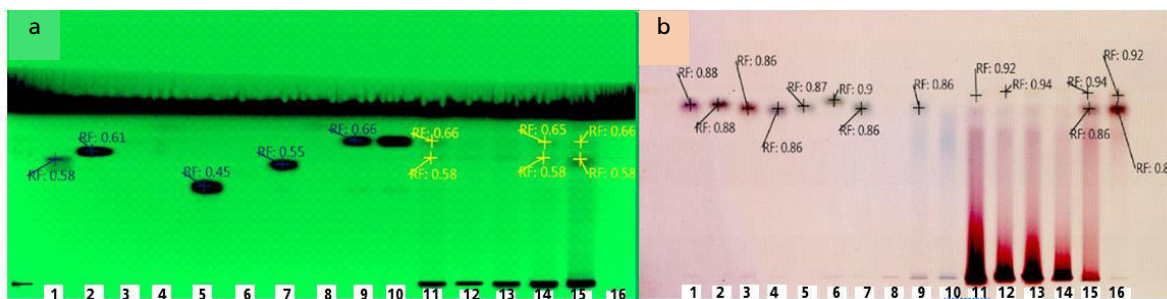


Figura 8. Cromatoplasas. a) Análisis de compuestos fenólicos: 1) Lignina, 2) Ac. Ferúlico, 3) p-hidroxibenzaldehído, 4) 2-feniletanol, 5) guayacol, 6) Ac. P-hidroxilo, 7) alcohol vanilínico, 8) Ac. Vainillinico, 9) Cresol, 10) Vanillina, 11) F3OC602, 12) F3MA401, 13) F3MA602, 14) F3MC401 y 15) F3MC602. b) Análisis de azúcares: 1) Sacarosa, 2) glucosa, 3) fructosa, 4) galactosa, 5) arabinosa, 6) xilosa, 7) ribosa, 8) Ac. Ácido poligalacturónico, 9) pectina, 10) hemicelulosa, 11) fructanos, 12) F3OC602, 13) F3MA401, 14) F3MA602, 15) F3MA401 y 16) F3MC602

En la muestra F3MC401, la estela de oligosacárido tendió a desaparecer y estaban presentes dos bandas de $R_f = 0,86$ y $0,94$. Estas mismas bandas fueron más intensas en la muestra de F3MC602, donde la estela de oligosacáridos desapareció por completo. Estas bandas son monosacáridos correspondientes a fructosa $R_f = 0,86$, debido a su coloración rojiza y xilosa marrón $R_f = 0,9$. Este análisis corrobora la reacción de hidrólisis de los polisacáridos contenidos en el bagazo de agave, como los fructanos y la hemicelulosa.

En este estudio, se encontraron moléculas más pequeñas en F3 que los monómeros de glucosa y fructosa. De acuerdo con Bon *et al.*, 1988 (47), estos podrían ser productos generados por designificación parcial. Paillat *et al.*, 2010 (44), informaron que lograron separar los compuestos fenólicos p-hidroxibenzaldehído, vainilla y ácido vanilínico que se encuentran en sus extractos. Con este informe fue posible inferir que las bandas encontradas correspondían a compuestos fenólicos derivados del fraccionamiento parcial de la lignina.

5. Conclusiones

La técnica de extracción asistida por microondas aplicada a residuos lignocelulósicos de Agave permitió preservar parte de las estructuras químicas de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina independientemente de la concentración de solventes de extracción y el tiempo de exposición. Las muestras sometidas a un sistema de extracción cerrado presentaron la mayor cristalinidad de la celulosa en comparación con el sistema abierto. Además, de la hidrólisis completa de los azúcares solubles del material lignocelulósico cuantificados como fructosa y xilosaresidual.

Agradecimientos

Proyectos de la Secretaría de investigación y Posgrado SIP 2014-1416; SIP 2015-1185, 2016-0103 y CONACYT 639318.

Referencias

1. Bessadok, A., Langevin, D., Gouanvé, F., Chappey, C., Roudesli, S., & Marais, S. (2009). Study of water sorption on modified agave fibers. *Carbohydrate Polymers*, 76, 74–85.
2. Piqué, T.M., & Vázquez, A. (2012). Uso de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y cemento. Investigación y desarrollo*, 3(2), 62-71.
3. González, G.Y., González, R.O., & Nungaray, A.J. (2005). Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis*, 3, 1-18.
4. Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M., & Mesnard, F. (2007). Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochemical análisis: PCA*, 18, 275-82.

5. Garcia-Mendoza, A.G., & Galván, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, 7-24.
6. Gentry, H.S. (1972). The Agave family in Sonora. Agricultural Research Service, USDA. *Agriculture Handbook* 399, 195-210.
7. Borroso, C.M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*. Tesis de licenciatura. Universidad politécnica de Madrid.
8. Ovando-Chacón, S.L., & Waliszewski, K.N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21, 111-120.
9. Sullivan, A.C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4, 173-207.
10. Atalla, R., & Vanderhart, D.L. (1984). Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Science*, 223, 283 - 285.
11. Larrea, C.M. (2003). *Estudio experimental para la elaboración de galletas tipo "cookie" con adición de fibra de pulpa de madera pre tratada con peróxido de hidrogeno alcalino (H₂O₂)*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.
12. Evert, R.F., & Esau K. (2008). *Esau: anatomía vegetal. Meristemas, células y tejidos de las plantas: su estructura, función y desarrollo* (No. 581.4 ESA).
13. Chiang, V. (2006). Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 143-146.
14. Liu, C., Miao, Y., & Zhang, K. (2011). Sequestration and Transport of Lignin Monomeric Precursors. *Molecules*, 16, 710-727.
15. Weinstock, I.A., Atalla, R.H., Reiner, R.S., Moen, M.A., Hammel, K.E., Houtman, C.J., Hill, C.L., & Harrup, M.K. (1997). A new environmentally benign technology for transforming wood pulp into paper. Engineering polyoxometalates as catalysts for multiple processes. *Journal of molecular catalysis. A, Chemical*, 116, 59-84
16. Pandey, K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 71, 1969-1975.
17. Segura, S.F., Echeverri, R.F., Patiño, LIA.C., & Mejía, G.A. (2007). Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *Vitae*, 14, 72-81.
18. Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze T. (2005) Hemicellulose. In: *Polysaccharides I*. (p. 1-67). Berlin. Springer.
19. López, F., García, J.C., Feria, M.J., Zamundio, M.A., & Pérez A. (2010). Biorrefinería de materiales lignocelulósicos. *Eucalyptusglobulus*. *Boletín del CIDEU*, 8(9), 75-82.
20. Barba, C. (2002). *Síntesis de carbametilcelulosa (CMC) a partir de pastas de plantas anuales*. Tesis doctoral. Universitat Rovira I Virgili. Escuela Técnica superior de Ingeniería Química. España, Tarragona.
21. Maddem, K.N., & French, J. (1995). The potential application of non-wood fibres in papermaking: an Australian perspective. *Appita Journal*, 48, 191-196.
22. Espinosa, J.A., Martínez, P.N., & Toro, P.C. (2011). Obtención de Vainillina a Partir de la Lignina de la Guadua. *Scientia et technica*, 2(48), 305-309.
23. Michelin, M., Ruiz, H.A., Silva, D.P., Ruzene, D.S., Teixeira, J.A., & Polizeli, M.L.T.M. (2014). Cellulose from Lignocellulosic Waste. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) *Polysaccharides*. Springer, Cham.
24. Chávez-Sifontes, M., & Domine, M.E. (2013) Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
25. El-Mansouri, N.E., & Salvadó, J. (2006). Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Industrial Crops and Products*, 24, 8-16.
26. Zhao, X., Cheng, K., & Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 815-827.
27. Quintana, V.M. (2011). *Aprovechamiento integral del bagazo de la piña de Agave tequilana Weber: Caracterización de fracciones lignocelulósicas obtenidas por un proceso organosolv*. Tesis de maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN. México.
28. Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729.

29. Lu, Q., Liu, W., Yang, L., Zu, Y., Zu, B., Zhu, M., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, R., Sun, Z., Huang, J., Zhang, X., & Li, W. (2012). Investigation of the effects of different organosolv pulping methods on antioxidant capacity and extraction efficiency of lignin. *Food Chemistry*, *131*, 313-317.
30. Badamali, S.K., Clark, J., & Breeden, S.W. (2008). Microwave assisted selective oxidation of lignin model phenolic monomer over SBA-15. *Catalysis Communications*, *9*, 2168-2170.
31. Xiao, B., Sun, X.F., & Sun, R. (2001). Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability*, *74*, 307-319.
32. Kappe, C.O. (2004). Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie*, *43* 46, 6250-84 .
33. Liao, X., Raghavan, G.S.V., Meda, V., & Yaylayan, V.A. (2001). Dielectric properties of supersaturated alpha-D-glucose aqueous solutions at 2450 MHz. *The Journal of microwave power and electromagnetic energy*, *36*, 131-138.
34. Liao, X., Raghavan, G.S.V., & Yaylayan, V.A. (2002). Dielectric properties of aqueous solutions of -D-glucose at 915 MHz. *Journal of Molecular Liquids*, *100*, 199-205.
35. Liao, X., Raghavan, G.S.V., Dai, J., & Yaylayan, V. (2003). Dielectric properties of α -D-glucose aqueous solutions at 2450 MHz. *Food Research International*, *36*, 485-490.
36. Venkatesh, M.S., & Raghavan, G.S.V. (2004). An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials. *Biosystems Engineering*, *88*, 1-18.
37. Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis : PCA*, *13*, 105-113 .
38. Wang, L., & Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, *17*, 300-312.
39. Ganzler, K., & Salgó, A. (1987). Microwave-extraction -a new method superseding traditional Soxhlet extraction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, *184*, 274-276.
40. Łojewska, J., Mikowiec, P., Łojewski, T. & Proniewicz, L.M. (2005) Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. *Polymer Degradation and Stability*, *88* (3), 512-520.
41. Sain, M., & Panthapulakkal, S. (2006). Bioprocess preparation of wheat straw fibres and their characterization. *Industrial Crops and Products*, *23* (1), 1-8.
42. Xu, F., Liu, C.F., Geng, Z., Sun, J.X., & Sun, R.C. (2006). Characterisation of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw. *Polymer Degradation and Stability*, *91*, 1880-1886.
43. Naranjo, C. de D., Alamilla, B.L., Gutiérrez, L.F., Solorza, F.J., Romero, V.S., Yee, M.H., Flores-Morales, A., & Mora-Escobedo, R. (2016). Isolation and characterization of cellulose obtained from Agave salmiana fibers using two acid-alkali extraction methods. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *7*(1), 31-43.
44. Hidalgo-Reyes, M., Caballero-Caballero, M., Hernández-Gómez, L.H., & Urriolagoitia-Calderón, G. (2015). Chemical and morphological characterization of Agave angustifolia bagasse fibers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, *93*, 807-817.
45. Pérez-Pimienta, J.A., Lopez-Ortega, M.G., Chávez-Carvayar, J., Varanasi-Patanjali, S.V., Cheng, G., Singh, S., & Simmons-Blake, A. (2015). Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment. *Biomass & Bioenergy*, *75*, 180-188.
46. Chen, X., Yu, J., Zhang, Z., & Lu, C. (2011). Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw. *Carbohydrate Polymers*, *85*, 245-250.
47. Bonn, G., Oefner, P., & Bobleter, O. (1988). Analytical determination of organic acids formed during hydrothermal and organosolv degradation of lignocellulosic biomass. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, *331*, 46-50.
48. Paillat, L., Périchet, C., Lavoine, S., Meierhenrich, U., & Fernandez, X. (2012). Validated High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) Method for Quantification of Vanillin β -d-Glucoside, and Four Major Phenolic Compounds in Vanilla (*Vanilla planifolia*) Fruits, Beans, and Extracts. *JPC. Journal of Planar Chromatography Modern TLC*, *25*, 295-300.

Capítulo 17

Reología y textura. Aplicación en productos lácteos

Sergio Darío Rozycki

Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ingeniería Química.
Instituto de Tecnología de Alimentos. Argentina

Resumen

Se define a la reología como la rama de la física que estudia el comportamiento de la materia al ser sometida exteriormente a un esfuerzo mecánico (compresión, estiramiento, corte, cizalla, entre otros). Su respuesta puede ser en condiciones de flujo (movimiento) o sin ruptura de la estructura interna (estudio de microestructura). Los sistemas materiales se comportan de muy distintas maneras y la forma de conocer sus modificaciones, temporales o permanentes, cuando son solicitados externamente es estudiándolos a través de ensayos objetivos que posibilitan, a través del empleo de modelos reológicos, el cálculo de parámetros, módulos y coeficientes, que permiten cuantificar sus características intrínsecas y cómo responden a sometimientos mecánicos externos. Esto permite clasificarlos de diferentes maneras, desde diversos puntos de vista. Para ello se define una propiedad "de transporte" muy importante, tanto en la parte científica como en la parte tecnológica, como la viscosidad, definida como "la resistencia interna de un fluido a moverse o fluir". Ésta depende de la temperatura y otras variables. La primera clasificación es en Fluidos Newtonianos (FN) y No Newtonianos (FNN). Los primeros son quienes poseen viscosidad constante, solo dependiente de la temperatura. Los No Newtonianos son aquellos en los cuales la viscosidad, además de la temperatura, depende del tratamiento mecánico (agitación, transporte a través de cañerías, homogeneización, atomización, etc.) al cual está siendo sometido. Algunos (la mayor parte) disminuyen su viscosidad al aumentar este tratamiento y son aquellos que se fluidifican o fluyen más fácilmente cuanto más se los acciona mecánicamente. Otros, contrariamente, aumentan su viscosidad, haciéndose más firmes y resistentes. Existen dos formas de estudiar los sistemas; la primera es sin alterar su estructura (reometría no destructiva), que sirve para analizar la microestructura existente. Se utilizan reómetros oscilatorios, de muy baja frecuencia (generalmente < 1 Hz) y muy baja deformación (generalmente < 5 %), cuantificándose parámetros específicos (módulos: elástico- G' , viscoso- G'' , complejo- G^* , etc., debiéndose trabajar dentro del Rango de Viscoelasticidad Lineal (RVL), que se determina experimentalmente para cada sistema. La otra forma es produciendo ruptura estructural (reometría destructiva) y se utiliza para cuantificar propiedades de y en flujo, por ejemplo parámetros reológicos como: Índice de consistencia- K , Índice de comportamiento- n , viscosidad- μ , Resistencia máxima inicial- A , Coeficiente de ruptura estructural- B , entre otros. Para lograrlo se utilizan modelos reológicos como: Ley de Potencia, Casson, Herschell y Bulkeley, Weltmann, Han, etc.

1. Breve historia

Hooke (1678) estudió principalmente el comportamiento de los sólidos, y fue el que estableció su ley que dice que **"cuando un sólido es expuesto a un esfuerzo, experimenta una deformación proporcional a la magnitud del esfuerzo"**.

Estableció que entre la tensión o esfuerzo de corte - τ (τ) y la deformación relativa ($D = \gamma$ = movimiento de una partícula respecto a las otras) existía una relación directa, cuya constante de proporcionalidad la denominó módulo de rigidez (G). La ecuación de estado (reológico), que se utiliza (para el estado sólido) es:

$$\tau = G \cdot D \quad (D = \gamma) \quad (1)$$

Un mayor módulo G significa una mayor resistencia del producto o sistema, a deformarse, o que, para obtener la misma deformación, debe ejercerse un EC mayor.

Newton (1687), que estudió principalmente los fluidos (gases y principalmente líquidos), estableció una relación similar entre el EC y el gradiente de deformación (GD), también denominado Gradiente de Velocidad (D'). Su ley expresa que **"cuando un fluido es expuesto a un esfuerzo, experimenta un gradiente de deformación proporcional a la magnitud del esfuerzo"**.

La ecuación de estado (reológico), que se utiliza para el estado fluido, es:

$$\tau = \mu_a \cdot D' \quad (D' = \dot{\gamma}') \quad (2)$$

En este caso la constante de proporcionalidad es la viscosidad aparente (μ_a) llamada así porque, para los FNN, no es constante y depende del GD (además del tiempo de acción mecánica).

D y D' se relacionan directamente con el trabajo mecánico ejercido sobre el producto. Cuanto mayor es éste mayores son D y D' (agitación, circulación por cañerías, homogenización, aspersión, etc.).

Weber (1835) para sólidos y Maxwell (1867) para fluidos, introdujeron el concepto de **viscoelasticidad**, que indica que la mayoría de los materiales y sustancias tienen un comportamiento intermedio entre un sólido de Hooke y un fluido de Newton, con propiedades de ambos comportamientos ideales. Aun así, fue principalmente con Bingham (1928-1929) que se considera el nacimiento de la reología (1). Como resumen:

Sólidos	⇒	Elasticidad
Fluidos	⇒	Viscosidad

2. Introducción

Para realizar un tratamiento adecuado de ciertos temas, se deben definir adecuadamente determinados vocablos, característicos del tema a abordar.

Reología: "Es la ciencia que estudia la relación entre esfuerzo y deformación en materiales capaces de fluir".

Describe cómo se deforman los cuerpos, sólidos o fluidos, cuando se someten a fuerzas externas (presión, cizallamiento, corte, etc.).

Reometría: "Es la ciencia que describe los métodos de medida y los instrumentos que permiten obtener datos reológicos de un material".

Reómetro: Instrumento que mide la historia del esfuerzo y la deformación de un material.

Viscosímetro: Es el caso especial de reómetro que mide viscosidad.

Ecuación de Estado Reológico: Es la relación matemática entre Deformación ($D = \dot{\gamma}$) y/o Gradiente de deformación ($D' = \dot{\gamma}'$) y la Tensión (τ) (o fuerza por unidad de área) (1)

3. Reometría. Tipos

Reometría Destructiva (RD): el sensor (cilindro, cono, placa, vástago, etc.) se mueve a través del material, el cual fluye destruyéndose (parcial o totalmente) su estructura interna.

Usos: medición de propiedades de flujo, como ser:

K: índice de consistencia — relacionado en forma directa a la consistencia y viscosidad.

n = índice de comportamiento — relacionado al tipo de fluido (Newtoniano, $n = 1$ y No Newtoniano, $n \neq 1$; $n > 1$ es reopéctico o dilatante y $n < 1$ es tixotrópico o pseudoplástico).

A = resistencia máxima inicial — relacionada al esfuerzo mínimo necesario para lograr que el producto se mueva / traslade.

B = Coeficiente de ruptura estructural o tixotrópica — relacionado a la velocidad con la cual se destruye la estructura interna del producto.

τ_0 = límite de fluencia — similar al parámetro A. Usado principalmente para productos untables (quesos untables, cremas para manos y cara, etc.).

μ_a = viscosidad aparente — relacionada al rozamiento interno entre las capas, partículas y/o moléculas que forman el producto.

Reometría No Destructiva (RnoD): el sistema sensor es oscilatorio de baja frecuencia, o comprime /estira (deforma) controladamente el material sin destruir la estructura interna.

Usos: medición de módulos / parámetros / propiedades microestructurales, como ser:

G' = **módulo elástico** — relacionado a las propiedad de recuperar la forma/posición inicial, luego de que ha cesado la fuerza que produjo la deformación reversible.

G'' = **módulo viscoso** — relacionado al comportamiento viscoso, por rozamiento entre los componentes internos del producto.

G^* = **módulo complejo** — relacionado a los enlaces internos entre los componentes y los aglomerados del producto (crosslinkeado).

$\text{tg } \delta = G'' / G'$ = **módulo viscoelástico** o tangente del ángulo de desfasaje, entre G' y G'' — relacionada en forma directa con la viscoelasticidad del producto.

Observaciones: Se aplica una u otra reometría según las características que se quieran estudiar en el producto o sistema. Si son condiciones de flujo (RD) el producto o sistema se tiene que mover (fluir), y si interesa la microestructura (RnoD) el sistema debe mantener su unidad estructural durante la tensión o tratamiento mecánico aplicados.

4. Esfuerzo (τ), Deformación ($D=\gamma$) y Gradiente (Velocidad) de Deformac ($D'=\gamma'$)

El esfuerzo o tensión de corte o cizalla (Shear Stress = τ) es siempre una medición de fuerza aplicada por unidad de área (F/A), su unidad es Pascal, Pa = N/m². La dirección de la fuerza respecto al área superficial sobre la cual se ejerce, determina el tipo de esfuerzo:

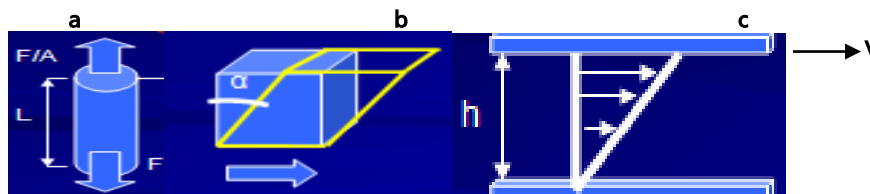


Figura 1. A = esfuerzo normal de estiramiento o compresión (ej: mascar chicle, amasar). B = esfuerzo tangencial (de corte) (ejemplo: circulación de fluido en cañería, agitar). C = Perfil de velocidad en la dirección perpendicular (h) al flujo (horizontal)

La Deformación ($D = \gamma$) mide en qué magnitud se mueven las partículas del cuerpo (α), y la Velocidad (Gradiente) de Deformación (Shear Rate = $D' = \gamma'$) es la rapidez con que ese movimiento tiene lugar, y se define matemáticamente como la variación de la velocidad en la dirección del flujo (horizontal) respecto a la dirección perpendicular a la misma (h). En la Figura 1-C, se observa que la velocidad en estudio tiene la dirección de flujo horizontal y que varía en la dirección perpendicular (vertical) desde un valor cero (placa inferior) a un valor máximo en la película de fluido adherida a la placa superior (1). O sea:

$$D' \text{ (s}^{-1}\text{)} = \gamma' \text{ (s}^{-1}\text{)} = V \text{ (m/s)} / h \text{ (m)} \quad (3)$$

5. Módulos elásticos (G''), viscoso (G'), complejo (G^*) y viscoelástico ($\text{tg } \delta$)

Estos módulos permiten cuantificar algunas propiedades relacionadas a la microestructura. Por ende, éste no debe destruir su estructura durante el ensayo. Esto se logra trabajando en condiciones experimentales dentro del "**rango de viscoelasticidad lineal**" (RVL), donde los valores de estos parámetros no varían al variar la frecuencia de oscilación (f) del sensor y/o la magnitud de la deformación ($D = \gamma$) realizada, o sea, en la gráfica que relaciona los módulos vs. f o módulos vs. D, las rectas son rectas horizontales o similar.

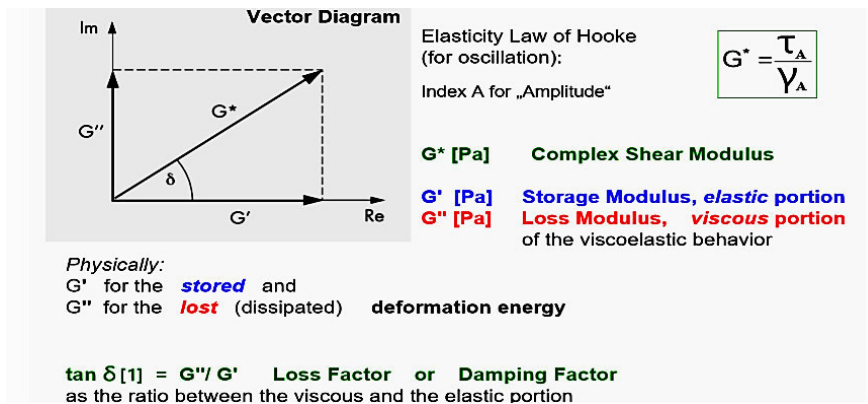


Figura 2. Relación entre parámetros microestructurales (G' , G'' , G^* , $\tan \delta$) (Anton Paar, 2010) (10)

6. Tipos de materiales

Elástico: almacena toda la energía de deformación que se le imponga y una vez liberado del estrés recupera totalmente su estado inicial. Ejemplo: banda elástica.

Viscoso: incapaz de almacenar cualquier energía de deformación. Éste es deformado irreversiblemente cuando se lo somete a cualquier esfuerzo, y no recupera su estado inicial. Ejemplo: plastilina.

Viscoelástico: Tienen propiedades viscosas y elásticas a la vez (DL, postres, yogur).

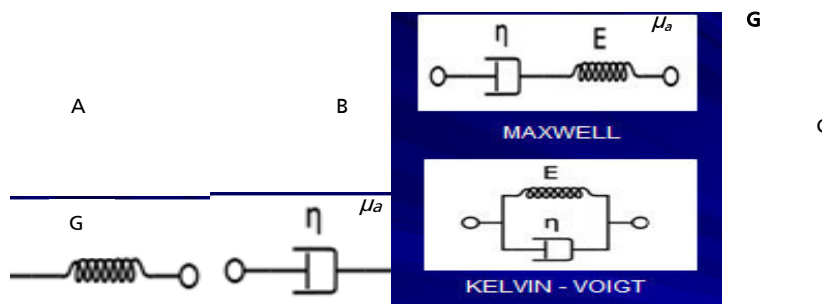


Figura 3. Representaciones esquemáticas de las leyes de Hooke (sólidos ideales, caso A), de Newton (fluidos ideales, caso B) y comportamiento Viscoelástico (caso C)

El comportamiento ideal elástico (Ley de la elasticidad de Hooke), para sólidos ideales, se rige por la ley de Hooke (A), que puede escribirse según la ecuación (1).

El comportamiento ideal viscoso (Ley de la viscosidad de Newton), para líquidos ideales, se rige por la ley de Newton (B), que puede escribirse según la ecuación (2).

El comportamiento real intermedio (mayoría de los sistemas) para líquidos viscosos con propiedades elásticas (ej: sangre coagulada) y sólidos elásticos con propiedades viscosas (ej: geles), se rige por los modelos de Maxwell (líquido viscoelástico) y de Kelvin-Voigt (sólido viscoelástico) (Figura 4).

En el modelo de Maxwell (líquido viscoelástico) se considera que la Velocidad de Deformación total se reparte entre la parte viscosa (μ_a) y la parte elástica (G) (efectos en serie) (Figura 4, figura inferior).

En el modelo de Kelvin-Voigt (sólido viscoelástico) se considera que el esfuerzo total aplicado se reparte entre la parte elástica y la parte viscosa (efectos en paralelo) (Figura 4, superior).

La $\tan \delta = G'' / G'$, representa la relación entre la porción viscosa (G'') y la porción elástica (G') de sistema o producto. Un valor igual a 1 significa que tienen la misma magnitud la parte elástica y viscosa ($G'' = G'$), un valor menor a 1 que predomina la parte elástica ($G'' < G'$), y mayor a 1 que predomina la parte viscosa.

En dulce de leche (DL) familiar el valor de $\tan \delta$ se acerca a 0,65- 0,75. Con una formulación cambiada de DL, donde se alteró la relación proteína/sacarosa (cuyo valor normal en el DL es aproximadamente 0,15), aumentándose ésta aproximadamente al doble, el valor de $\tan \delta$ fue de 0,30-0,35, la mitad del anterior, observándose que el sistema que tenía un formato cilíndrico (por haberse obtenido por coagulación térmica en un tubo de vidrio Pyrex) mostraba un comportamiento elástico muy elevado, que al presionar por su eje longitudinal y liberar la presión, recomponía su forma inicial rápidamente y sin dañarse.

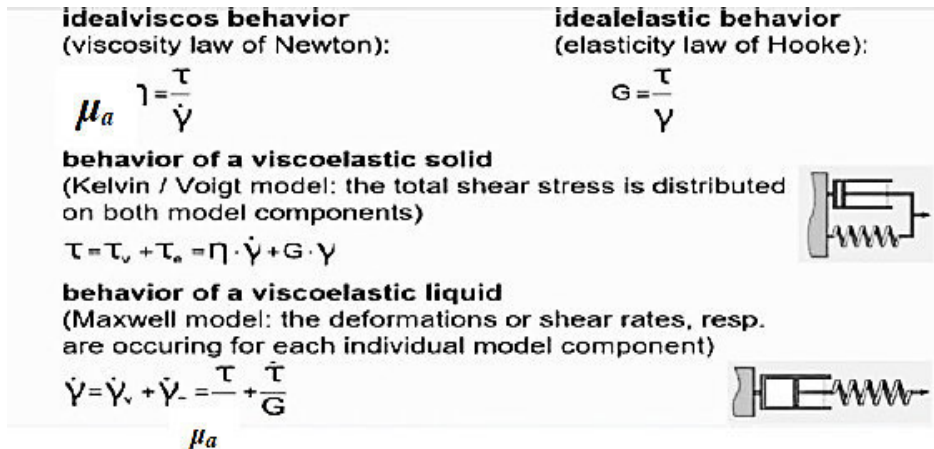


Figura 4. Representaciones esquemáticas del comportamiento Viscoelástico (modelos) (Anton Paar, 2010) (10)

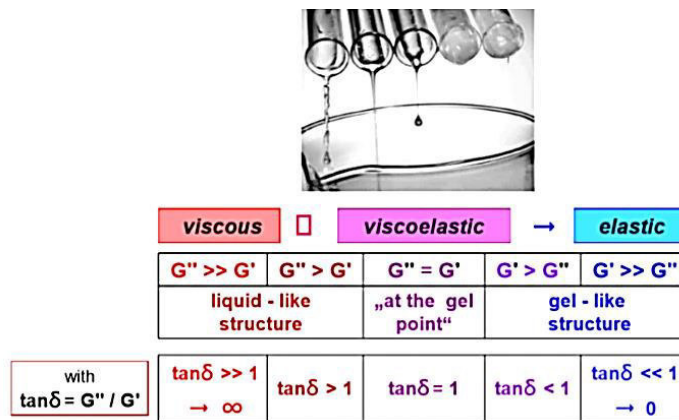


Figura 5. Representación gráfica del comportamiento de fluidos y su relación con los parámetros microestructurales (Anton Paar, 2010) (10)

Un resumen de algunos modelos estudiados en diferentes sistemas, para sólidos y fluidos, es el que se muestra en la siguiente figura (6).

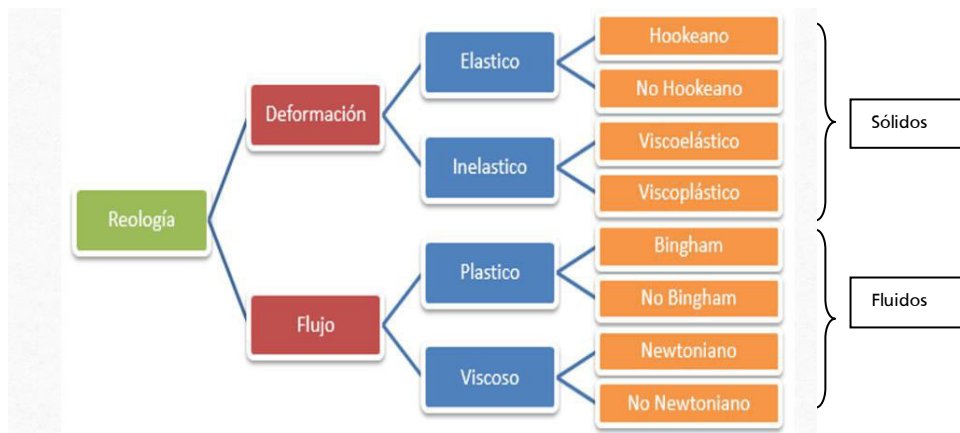


Figura 6. Representación gráfica de modelos aplicados al comportamiento de sólidos y fluidos

Algunas generalidades que se relacionan con el tema “reología”, son:

- Bombear agua, homogeneizar la leche, agitar café, circular fluido por cañerías, etc., implica que estos líquidos estén expuestos a cizalladura y deformación permanente.
- Se define velocidad de cizalladura (o Gradiente de Deformación - GD), $D' = \dot{\gamma}$ (con unidades de s^{-1}), que mide la variación de la velocidad en forma perpendicular a la dirección del movimiento (1).
- La **Viscosidad** puede definirse como “**la resistencia a fluir que tiene un material**”.
- Los **Fluidos Newtonianos (FN)** tienen **viscosidad constante** con el GD $D' = \dot{\gamma}$
- Los **Fluidos No Newtonianos (FNN)** tienen **viscosidad variable** con el GD.

7. Equipos, sensores/geometrías y rangos de medición

7.1. Equipos

Los equipos más usados son: Brookfield, Haake, Rheolab QC, etc. Los más sofisticados permiten obtener los denominados “**reogramas**”, gráficas que relacionan el Esfuerzo de Corte (EC) con el Gradiente de deformación (GD), con aceleraciones (velocidad de variación de las velocidades angulares de giro del sensor, en reometría destructiva- RD, y de la frecuencia de oscilación, en reometría no destructiva- RnoD) programadas, tanto de aumento del GD como de disminución, para llegar al valor deseado en mayor o menor tiempo.

Para fluidos, por ejemplo en RD con sensores de cilindros concéntricos, se suele obtener dicho “reograma” programando el reómetro (en este caso usado como viscosímetro), de modo que partiendo el sensor desde el reposo ($D' = \dot{\gamma} = 0 s^{-1}$) llegue hasta un valor máximo predeterminado (generalmente 200 a 300 s^{-1}), en un tiempo determinado, que define la aceleración de la velocidad angular a utilizar. Por ejemplo, si se quiere llegar desde 0 hasta 200 s^{-1} en 10 minutos, la aceleración deberá ser de 20 s^{-1} / minuto, o sea, la velocidad angular deberá crecer en 20 s^{-1} por cada minuto, para en los 10 minutos pasar de 0 a 200 s^{-1} . Cuanto mayor sea la aceleración más se desfasa la respuesta medida respecto al tiempo real (y GD) en el que se está midiendo dicha respuesta. O sea, la respuesta no corresponde exactamente a ese tiempo. Por ende, conviene que esta aceleración sea lo menor posible, principalmente para estudios de comportamiento de sistemas (investigación).

7.2. Sensores/geometrías

Los sensores más comunes utilizados, y sus usos, aparecen en las siguientes figuras:

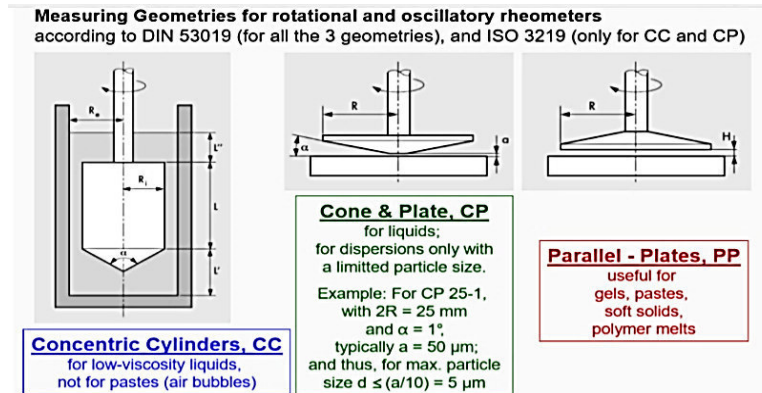


Figura 7a. Representación gráfica de las principales geometrías de medición (Anton Paar, 2010) (10)

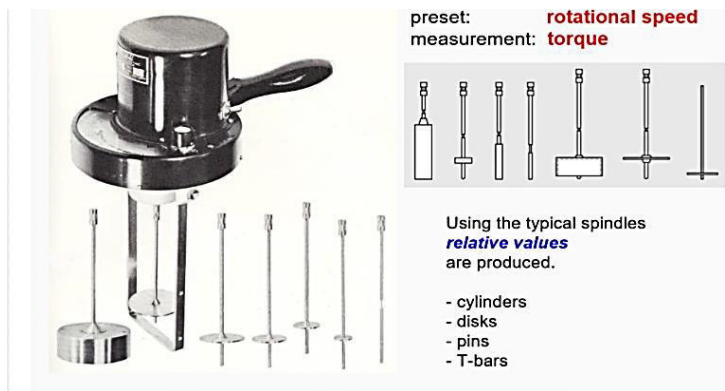


Figura 7b. Representación gráfica de otras geometrías de medición (Anton Paar, 2010) (10)

7.3. Rangos de medición

Los rangos de medición de los procesos más importantes son los de la siguiente tabla:

Tabla 1. Rangos de Gradientes de Deformación (GD) de los procesos más importantes

PROCESO	$\dot{\gamma}$ (s^{-1})	PRODUCTO
Sedimentación de polvo fino	10^{-6} - 10^{-4}	pinturas, medicamentos
Esparcimiento (tensión superf.)	10^{-2} - 10^{-1}	pinturas, tintas
Drenaje (gravedad)	10^{-1} - 10^1	pinturas, productos wc
Extrusión	10^0 - 10^2	polímeros
Masticación, deglución	10^1 - 10^2	productos alimenticios
Enducción por hundimiento	10^1 - 10^2	pinturas, confites
Agitación, mezclado	10^1 - 10^3	líquidos industriales
Bombeo, flujo en tubería	10^0 - 10^3	líquidos
Atomización, brochazo	10^3 - 10^4	pinturas, asfalto
Incorporación de pigmentos	10^3 - 10^5	pinturas, tintas
Aplicación por frotación	10^4 - 10^5	cremas, lociones
Recubrimiento de papel	10^5 - 10^6	salsas de recubrimiento
Lubricación	10^3 - 10^7	aceites

Cabe recordar que el GD de una evaluación sensorial se encuentra entre 50 y 100 s^{-1} , y en una masticación normal es cercano a 50 s^{-1} .

8. Reología. Tipos

Recordando su definición, se dedica a estudiar el comportamiento de sistemas y productos, entre otros, cuando se los solicita a esfuerzos externos de diferentes orígenes (compresión, extensión, corte, cizalla, penetración, entre otros).

8.1. Reología destructiva. Viscosimetría

Se puede definir como la parte de la ciencia física destinada a estudiar el comportamiento de los sistemas materiales en "situación de flujo", o sea, cuando componentes del sistema tienen movimientos relativos unos respecto a otros, es decir, el sistema "se está desplazando" y, por ende, se está destruyendo su estructura, total o parcialmente, en forma reversible o irreversible.

Una clasificación de los fluidos según esta característica podría ser:

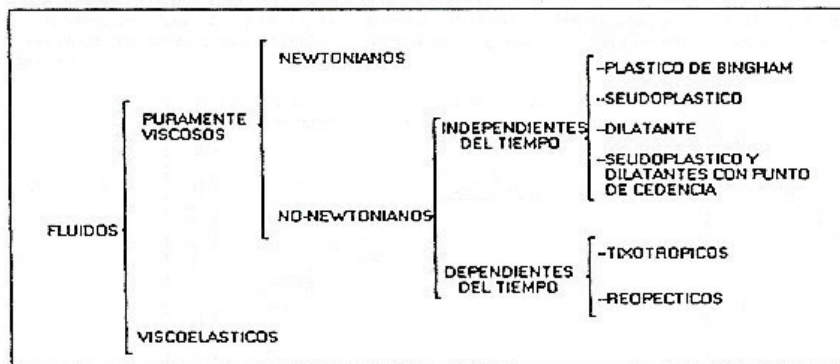


Figura 8. Representación esquemática de la clasificación de fluidos

En el ítem 6 se definió el comportamiento viscoelástico, por lo cual aquí nos dedicaremos a los fluidos puramente viscosos. Éstos se dividen en Newtonianos (FN) y No Newtonianos (FNN), también definidos en el mismo ítem. Los FNN se subdividen en Independientes del Tiempo (FNN-IT) y Dependientes del Tiempo (FNN-DT).

Los primeros son aquellos fluidos donde la viscosidad depende del Gradiente de Deformación (GD) (y obviamente de la temperatura) pero NO dependen del tiempo de cizallamiento o acción mecánica ejercido sobre la muestra, o sea, no dependen del tiempo en el cual la muestra está siendo solicitada mecánicamente (cizallada) por el sensor, dentro del recipiente que la contiene (denominada normalmente "copa").

Medir en ellos la viscosidad al principio o luego de un tiempo de cizallamiento (a un determinado GD) no influye sobre el valor de la viscosidad, ni otros parámetros reológicos.

Los FNN-DT son aquellos donde la viscosidad y otros parámetros sí dependen de este tiempo de cizalla. Uno u otro comportamiento se observa fácilmente si el equipo permite variar programadamente el GD, en forma creciente y decreciente en un mismo ensayo, como ocurre con los de última generación, mencionados.

El "reograma" o gráfica EC vs. GD, una vez realizado este ensayo descripto (utilizando GD creciente y decreciente) puede presentar la denominada "histéresis", que es la separación entre las curvas de "ascenso" y "descenso", que indica que el fluido es FNN-DT (Figura 9). Si esta separación no ocurre, el fluido es FNN-IT. Un fluido FNN-IT, al realizar el ensayo con GD creciente la curva obtenida coincide (una sobre la otra) con aquella que se realiza con GD decreciente (o sea, "va y vuelve por el mismo camino").

Mientras mayor sea la separación entre las curvas, mayor es la dependencia de la viscosidad y otros parámetros con el tiempo de cizalla (y mayor será la tixotropía o reopectia del sistema que se está ensayando) (2).

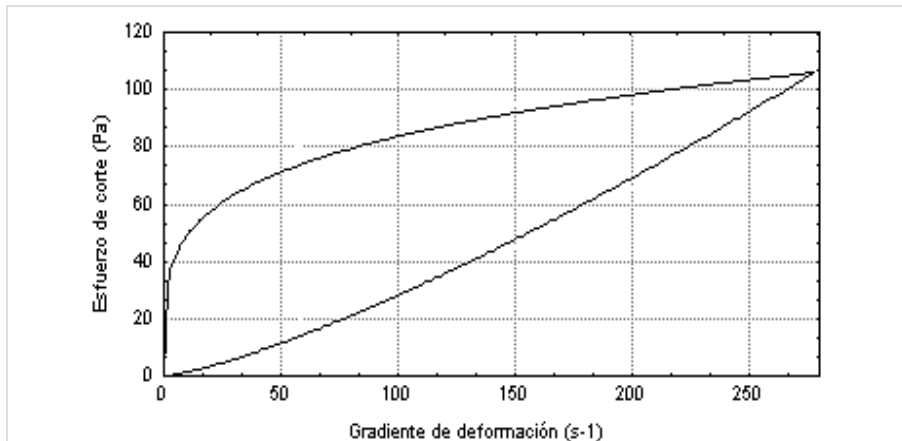


Figura 9. Reograma con “histéresis” o separación entre curvas, que cuantifica la dependencia de la viscosidad y otros parámetros reológicos con el tiempo de cizalla (y también la tixotropía o reopepsia del sistema)

8.1.1. Viscosidad. Cálculo y medición

La viscosidad se define (y calcula) en todos los casos, para cualquier tipo de fluido, como el cociente entre el EC (τ) y el GD (D'), denominándose Viscosidad Aparente (μ_a) cuando se trata de FNN, donde la viscosidad depende del valor del GD (como fue mencionado). O sea:

$$\mu_a = \tau / D' \quad (4)$$

Gráficamente, según esta definición, la viscosidad es la pendiente de la recta que contiene al segmento I, definido entre el punto (a) sobre la curva superior y el origen de coordenadas, debido a que la pendiente de una recta se define como la tangente del ángulo de inclinación (α), que en el triángulo rectángulo formado es el cociente entre el cateto vertical (τ) y el cateto horizontal (D').

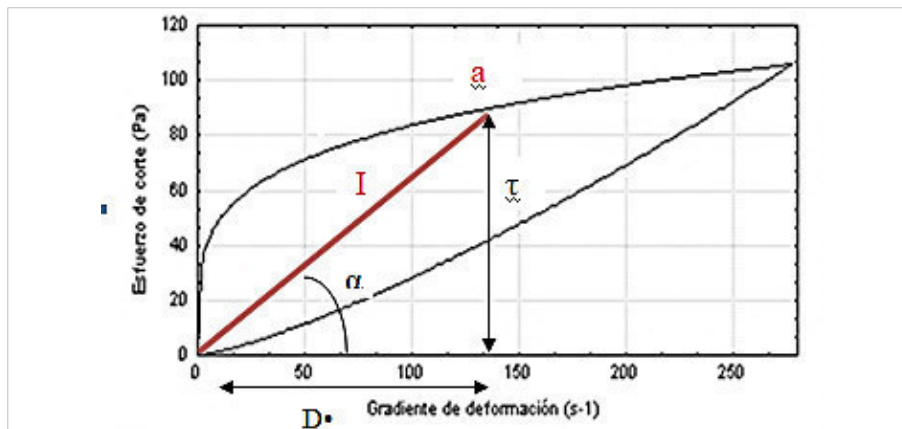


Figura 10. Forma gráfica de cuantificar la viscosidad como pendiente de la recta que contiene al segmento determinado entre un punto representativo sobre la curva (a) y el origen de coordenadas

8.1.2. Reología de fluidos independientes del tiempo de cizalla (FNN - IT)

Existen varios comportamientos que son abarcados en esta denominación, de los cuales los principales se muestran en la Figura 11.

Los fluidos plásticos (Casson o Bingham) son aquellos que presentan un EC (tratamiento mecánico) mínimo, denominado “Límite de Fluencia o Cedencia” (τ_0), que significa que el sistema o producto bajo un EC no comenzará a moverse (fluir, o sea, tener un GD) hasta que no se sobrepase ese esfuerzo mínimo.

Posteriormente la relación entre EC y GD puede ser lineal (Plástico de Bingham) o no lineal (Plástico de Casson). En ambos casos, al aumentar el GD disminuye la pendiente de la recta que une el punto representativo (sobre la curva) con el origen y, por ende, la viscosidad (observado en la figura 11 cuando se pasa del segmento I al II).

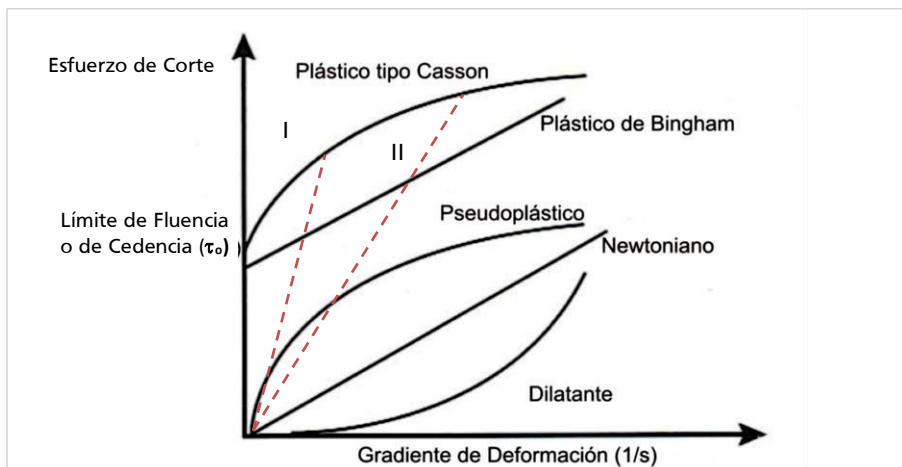


Figura 11. Relación entre EC y GD para los principales comportamientos de FNN – IT

Otros tipos de fluidos son aquellos que no tienen este EC mínimo, por lo cual apenas se les aplica un tratamiento mecánico (GD) comienzan a fluir (Newtonianos, Pseudoplásticos y Dilatantes).

Los Newtonianos tienen una relación lineal entre el EC y GD, siendo la pendiente (única) de dicha recta el valor de la viscosidad, como se describió anteriormente, por lo cual se dice que su viscosidad es constante.

Los otros dos poseen una relación no lineal entre EC y GD. El Pseudoplástico (la gran mayoría de los sistemas que son independientes del tiempo de cizalla) presenta una curvatura hacia abajo (convexa) por lo cual la viscosidad decrece al aumentar el GD. El Dilatante es al revés, aumentando esta pendiente al aumentar el GD y, por ende, la viscosidad.

Mientras mayor sea la curvatura que presenten cualquiera de estos dos últimos tipos de fluidos, mayor será la variación de la viscosidad, para igual variación del GD (2).

8.1.3. Reología de fluidos dependientes del tiempo de cizalla (FNN – DT)

En esta clasificación están los fluidos cuya viscosidad (y otros parámetros reológicos) dependen del tiempo en el cual se aplique la acción mecánica (GD). Se denominan Tixotrópicos (la mayoría de los sistemas alimentarios y dispersos) que son aquellos donde la viscosidad disminuye al aumentar el tiempo de cizalla, y Reopécticos que tienen comportamiento contrario, aumentando la viscosidad al aumentar este tiempo (Figura 12).

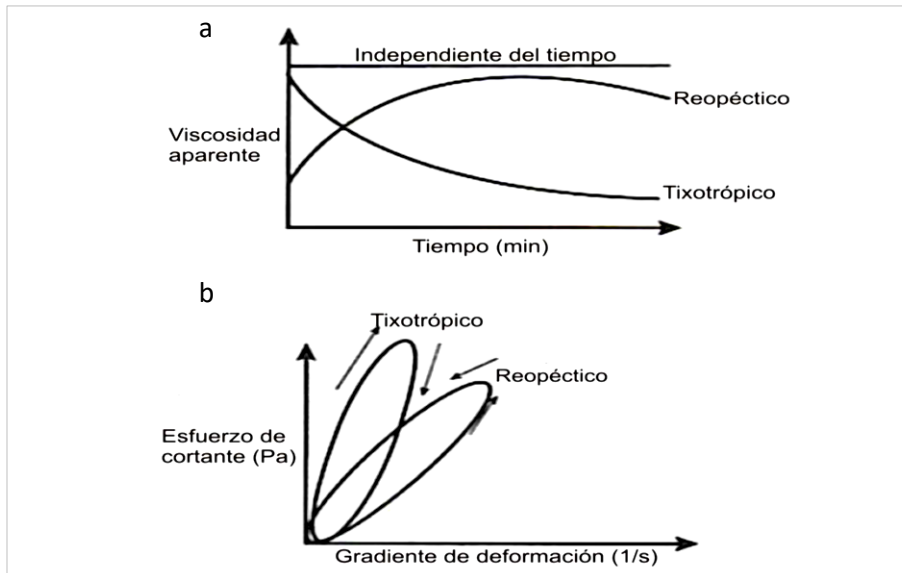


Figura 12. Relación entre EC y GD para los principales comportamientos de FNN – DT

En un ensayo donde el GD primero se aumenta y luego se disminuya (que es como conviene realizarlo), los Tixotrópicos “van por arriba” (o sea, al aumentar el GD generan la curva superior) y “vuelven por abajo” (o sea, al disminuir el GD generan la curva inferior).

Los reopécticos tienen el comportamiento contrario. Ambos presentan “histéresis” o separación entre las curvas del reograma, tal cual muestra la figura 12 (2).

Otra forma de observar la dependencia de la viscosidad con el tiempo de cizalla es analizando la siguiente gráfica:

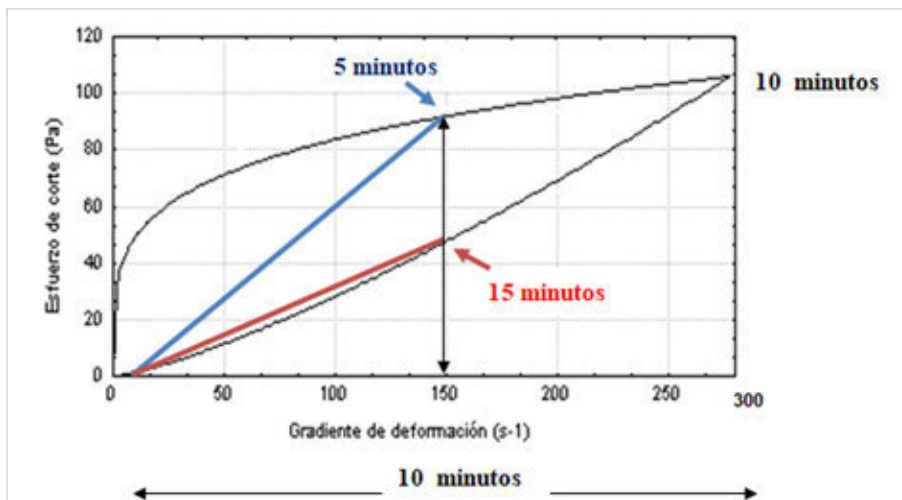


Figura 13. Valores de viscosidades a un mismo GD y distintos tiempos de cizalla (dependencia con el tiempo)

En la figura 13 se observa el efecto del tiempo de cizalla sobre la viscosidad, ya que el GD es el mismo (150 s^{-1}) para el punto de la curva superior y el punto de la curva inferior.

Para lograr este reograma el equipo se programa de modo que su aceleración sea en este caso de $30 \text{ s}^{-1}/\text{min}$, o sea, que partiendo del reposo aumente el GD de a 30 s^{-1} por cada minuto (el 1^{er} minuto llega a 30 s^{-1} , el 2^{do} minuto llega a 60 s^{-1} , y así sucesivamente hasta llegar a los 300 s^{-1} , valor máximo prefijado en el equipo).

Partiendo desde el reposo ($GD = 0$) en 5 minutos se llega a 150 s^{-1} (punto de la curva superior) al cual le corresponde un valor de viscosidad dado por la pendiente de la recta que une ese punto con el origen (recta azul). Llegar al final del reograma (300 s^{-1}) demora 10 minutos; luego viene el descenso del GD (programado con la misma aceleración del ascenso), y para llegar al punto intermedio de la gráfica (al que también le corresponde un $GD = 150 \text{ s}^{-1}$), sobre la curva inferior, se demora 5 minutos más (de descenso), o sea, 15 minutos en total. A este punto le corresponde un valor de viscosidad dado también por la pendiente de la recta que une ese punto con el origen (recta roja), siendo visiblemente menor esta pendiente, o sea, la viscosidad (3).

Por ende, ambos puntos de las curvas superior e inferior que les corresponde el mismo GD (150 s^{-1}), tienen distinta viscosidad debido al distinto tiempo de cizalla (al punto de la curva superior le corresponde 5 minutos, y al de la curva inferior 15 minutos).

8.1.4. Análisis de perfil de textura (TPA)

Este análisis es muy importante para cuantificar objetivamente parámetros reológicos que se relacionan adecuadamente con parámetros y atributos sensoriales. Consiste en un ensayo de doble penetración o doble compresión. En el primer caso la muestra debe poder ser penetrada (ejemplo: yogur, queso untado, leche condensada, dulce de leche, etc.), donde cada penetración es un ciclo en el cual el sensor (de diferentes formas, generalmente cilíndrico o cónico) se introduce en la muestra a una velocidad (generalmente entre 0,5 y 1 mm por segundo) y hasta una profundidad (generalmente entre 20 y 40 mm) predeterminadas, sensándose la fuerza ejercida por la muestra sobre el sensor (resistencia de la muestra a deformarse; principio de acción y reacción) (4, 5).

En el segundo caso (quesos: frescos, semiduros, duros) el sensor no penetra en la muestra sino que la comprime y deforma un determinado porcentaje (generalmente entre 50 y 80 %) en ambos ciclos, sin romper la estructura, obteniéndose los mismo parámetros que con doble penetración. El grado de compresión se determina experimentalmente para cada producto, siendo el límite máximo aquel que produce la ruptura del mismo.

La gráfica obtenida es como la de la figura 14.

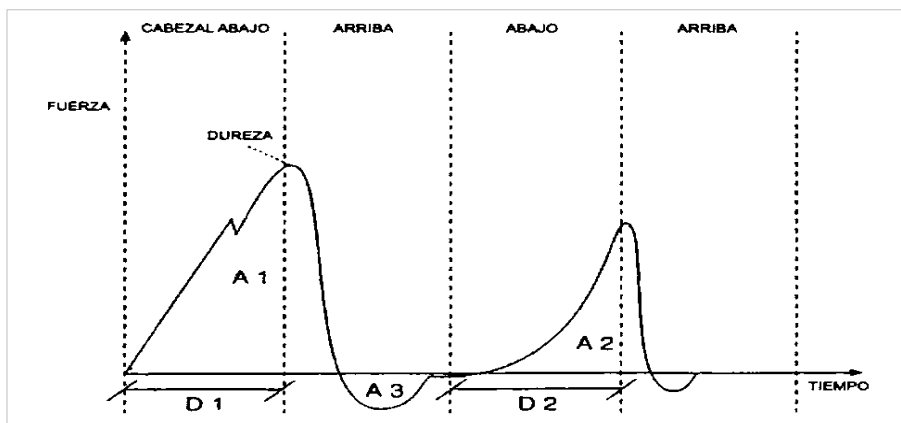


Figura 14. Ensayo de doble penetración o doble compresión (TPA)

Los parámetros que se pueden calcular son los siguientes:

Firmeza (F) / Dureza (D): Resistencia a una deformación determinada. Sensorialmente es la fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los molares (sólidos), o entre la lengua y el paladar (semisólidos). Gráficamente es el pico (máximo) del primer ciclo.

Adhesividad (A3): Fuerza necesaria para separar el sensor de la muestra al ascender el sistema sensor. Sensorialmente es la fuerza requerida para retirar el material que se adhiere al paladar, dientes y labios, durante el consumo, es decir, para superar la pegajosidad. Gráficamente es el área de la zona de fuerza negativa.

Cohesividad, C (A2/A1): Grado en que un material puede ser deformado antes de alcanzar su punto de ruptura. Sensorialmente relacionada con el grado en que una sustancia es comprimida entre los dientes o dedos antes de romperse. Visualmente se asocia al autosostén de la estructura.

Elasticidad, E (D2/D1): Grado de recuperación del alimento luego de provocarle una deformación (compresión con los molares).

Gomosidad, Go (D.C): Esfuerzo (energía) requerido para desintegrar un alimento semisólido y pasarlo a un estado listo para ser deglutido. Sensorialmente relacionada en forma directa con la densidad y viscosidad que se percibe durante la masticación.

Masticabilidad (D.C.E = Go.E): Número de masticaciones necesarias para que el producto colocado entre los molares se encuentre listo para deglutir (6, 7).

Estos parámetros generalmente pueden ser adecuadamente relacionados, incluso matemáticamente, con diversos parámetros y atributos sensoriales, como ser: consistencia sensorial (Cs), adherencia, granulosis, elasticidad, firmeza, dureza, cohesividad, masticabilidad, untabilidad, cremosidad, etc.

Se puede relacionar matemáticamente, por ejemplo, como se ha hecho en yogur y queso untable, la Cs evaluada por un panel de evaluadores entrenados, masticando adecuadamente las muestras, con la viscosidad (μ_a) denominada de Kokini, medida a un GD de 50 s^{-1} (normal en una masticación), para que las condiciones sean similares.

Se obtienen ecuaciones generalmente de tipo exponencial, de la forma:

$$Cs = a \cdot e^{b \cdot \mu_a} \quad (5)$$

Utilizando por ejemplo el programa Table Curve 2D, que testea varios miles de ecuaciones en pocos segundos, se obtienen aquellas que mejor aproximan los datos experimentales, informando el programa los valores de las constantes a y b, y sus valores estadísticos.

Esto permite predecir (calcular) un valor de consistencia (Cs) a partir de un valor objetivo (μ_a) determinado con un equipo (viscosímetro) en condiciones preestablecidas ($\text{GD} = 50 \text{ s}^{-1}$) (8).

8.1.5. Importancia del conocimiento de las propiedades reológicas de los alimentos

- Diseño de procesos y equipos en ingeniería (viscosidad aparente = μ_a): para el diseño de bombas, tuberías, homogenizadores, intercambiadores de calor, evaporadores, etc.
- Evaluación de la textura del alimento (Firmeza – *F*, Adhesividad – *Ad*, Cohesividad – *Co*, etc.), y su relación con datos sensoriales (consistencia sensorial – *Cs*, Untabilidad – *Un*, Cremosidad – *Cr*, Adherencia – *Ad*, etc.) y reológicos (viscosidad a 50 s^{-1} , o de Kokini, μ_{50} , Índice de consistencia – *K*, etc.).
- Influencia de un ingrediente y/o cambio de un aditivo (a través de la variación de los reogramas vs. $D \bullet$, y de los parámetros y módulos reológicos).
- Control de calidad (reogramas o curvas de fluidez: τ vs. $D \bullet$).
- Estudio de la microestructura (módulos: elástico – G' , viscoso – G'' , complejo – G^* , viscoelástico – $\text{tg } \delta$).
- Estudio del comportamiento reológico del alimento (tixotropía/reopepsia; plasticidad, límite de fluencia, etc.).

9. Modelos reológicos

Se utilizan modelos reológicos para poder calcular valores de parámetros y módulos reológicos, que permiten describir y cuantificar el comportamiento de los sistemas y productos en estudio.

Estos modelos pueden expresarse en función del Gradiente de deformación (GD) y del Tiempo de Cizallamiento (TC) o acción mecánica y se utilizan para FNN.

9.1. Modelos en función del Gradiente de Deformación

Algunos de los más utilizados, por ejemplo en productos lácteos, son (2):

$$\text{Ley de Potencia (Ostwal):} \quad \tau = K \cdot D^n \quad (6)$$

$$\text{Modelo de Casson-modificado:} \quad \tau^{0.5} = \tau_0^{0.5} + K_c \cdot D^{0.5} \quad (7)$$

$$\text{Modelo de Herschel-Bulkley (HB):} \quad \tau = \tau_0 + K \cdot D^n \quad (8)$$

$$\text{Modelo de Bingham:} \quad \tau = \tau_0 + K \cdot D \quad (9)$$

En algunos casos donde se obtienen reogramas con formas no comunes (figura 15, quesos untables), los modelos anteriores no ajustan adecuadamente los datos experimentales, y deben plantearse otros modelos, como en este caso uno derivado de la Ley de Potencia:

$$\tau = K \cdot D^n \rightarrow \tau = K \cdot D' \cdot D'^{n-1} \rightarrow \tau/D' = \mu_a = K \cdot D'^{n-1} \rightarrow \ln \mu_a = \ln K + (n-1) \ln D'$$

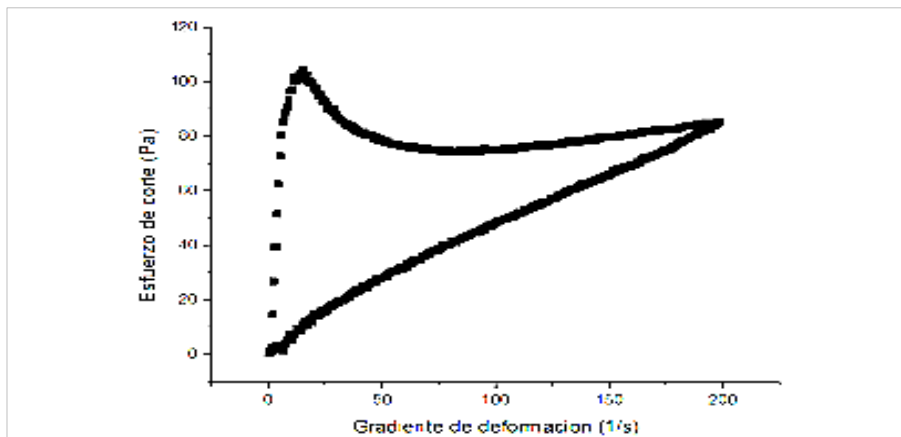


Figura 15. Reograma típico de muestra de Queso Untable formulado (sin desuerado)

Los reogramas que se utilizan para el cálculo de los parámetros reológicos mencionados suelen obtenerse trabajando hasta GD máximos de 200 – 300 s⁻¹, tanto mayor cuanto menor sea el nivel de viscosidad del material o producto.

En la siguiente tabla se observan las principales características de los fluidos que responden a los modelos mencionados.

Tabla 2. Valores límites característicos de cada modelo y comportamiento reológico.

Fluido	k	n	τ_0	Ejemplos
Herschell Bulkley (HB)	> 0	$0 < n < \infty$	> 0	Yogur, queso untable, dulce de leche, crema batida, pasta de pescado, ketchup, chocolate
Plástico de Bingham	> 0	1	> 0	Pasta de dientes, pasta de tomates, mermeladas concentradas, mayonesa, mostaza
Newtoniano	> 0	1	0	Agua, jugos de frutas, miel, aceites vegetales
Pseudo-plástico	> 0	$0 < n < 1$	0	Puré de banana, leche condensada, sopa de verduras, clara de huevo, puré de frutas
Dilatante	> 0	$0 < n < \infty$	0	Soluciones al 60 % de almidón, crema alto % MG (> 45 – 50 %)
Tixotrópico (*)	> 0	$0 < n < 1$	0	La mayoría de los alimentos, principalmente los productos lácteos

(*) Los productos tixotrópicos/ reopéticos poseen 2 valores de K y de n (curvas superior e inferior).

A los fluidos tixotrópicos/reopéticos se les aplica el modelo Casson-modificado en primera instancia, para calcular el límite de fluencia τ_0 (de la ordenada al origen en la linealización) y con este valor se calculan K y n, linealizando el modelo de HB.

9.2. Modelos en función del Tiempo de Cizallamiento

Dos modelos utilizados exitosamente en general (principalmente en productos lácteos) son:

$$\text{Modelo de Weltmann-modificado: } \mu_a = A - B \cdot \ln t \quad (10)$$

$$\text{Modelo de Han: } \ln \tau = a - b \cdot t \quad (11)$$

A/a = viscosidad o resistencia máxima, inicial (que se opone al flujo/movimiento o GD).

B/b = coeficiente de ruptura estructural o tixotrópica (que mide la velocidad con la cual se rompe la estructura al aplicar un GD).

El modelo de Weltmann generalmente ajusta mejor los valores experimentales (2).

Se observa una relación generalmente logarítmica entre el esfuerzo de corte (τ) o la viscosidad (μ_a) con el tiempo de cizallamiento (t), manteniendo constante el GD (que cuando se quieren utilizar los parámetros de estos modelos para correlacionarlos con juicios sensoriales, debe estar entre 50 y 100 s^{-1} , preferentemente 50 s^{-1}). Esto, para fluidos tixotrópicos, tiene como representación gráfica la Figura 16.

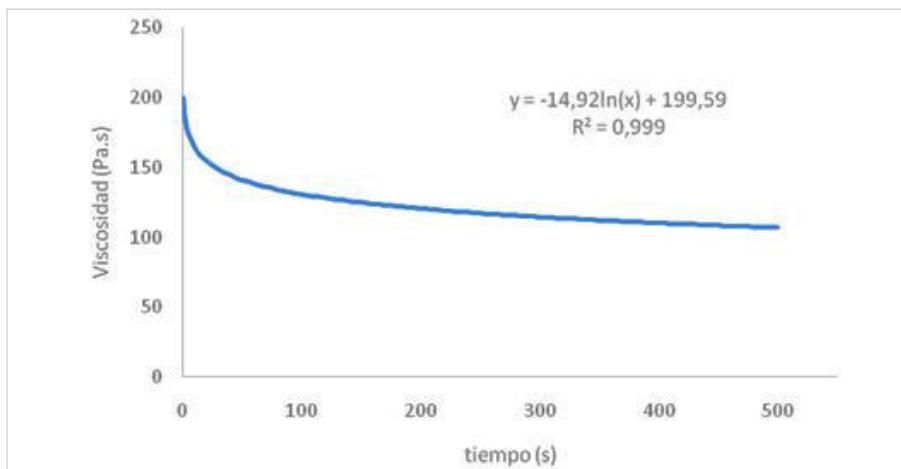


Figura 16. Reograma típico de un fluido tixotrópico donde el esfuerzo de corte y la viscosidad disminuyen con el tiempo de cizallamiento o acción mecánica (GD = constante)

10. Tixotropía

La tixotropía, estrictamente hablando, se define como la “propiedad de ciertos fluidos y geles que disminuyen su viscosidad cuando se aplica una fuerza constante y, después de reducir o eliminar esta fuerza, dicha viscosidad se recupera completamente al estado inicial en un período de tiempo apropiado” (Anton Paar, 2010). Esto explica por qué algunos productos (por ejemplo de cuidado personal, como geles para el cabello y pasta de dientes) son líquidos cuando se extraen del tubo, pero luego se recuperan hasta su estado sólido inicial.

También es una característica de la mayoría de los sistemas dispersos y emulsiones. Diversos autores sostienen que se produce por reorientaciones y reacomodamientos internos, al flujo externo impuesto por una acción mecánica (agitación, bombeo, homogeneización), de las moléculas, partículas, aglomerados y/o gotas de los sistemas, oponiendo menos resistencia al flujo y por esto disminuyendo inicialmente la viscosidad.

En polímeros (Figura 18a) las extensas y voluminosas cadenas se deforman y acomodan según la dirección del flujo, impuesto exteriormente, exponiendo menos superficie al contacto con el mismo. En partículas, aglomerados y gotas (Figura 18b), las primeras se orientan según el flujo externo, los segundos se destruyen parcial o totalmente y las terceras se deforman, de modo de oponer menor resistencia a dicho flujo y, por ende, disminuir la viscosidad.

Se sostiene que la tixotropía se corresponde con la presencia de enlaces principalmente no covalentes (de Van der Waals, electrostáticos, hidrofóbicos, etc.). Una forma gráfica de visualizarla, y cuantificarla, es el área entre las curvas de un reograma, con la cual se relaciona en forma directa. Cuanto mayor es esta área mayor es la tixotropía. Dicho área se puede calcular utilizando un método de cálculo numérico (método trapecios o Simpson).

Se puede definir matemáticamente un Índice de Tixotropía (IT) según la siguiente fórmula:

$$IT = \sum (\tau_{SUP.} - \tau_{INF.}) \cdot \Delta h \quad \begin{array}{l} \tau_{SUP.} = \text{esfuerzo de corte corresp. a la curva superior.} \\ \tau_{INF.} = \text{esfuerzo de corte corresp. a la curva inferior.} \\ \Delta h = \text{intervalo de tiempo seleccionado para calcular los } \tau. \end{array}$$

(12)

Una representación del resultado de utilizar esta fórmula aparece en la Figura 17.

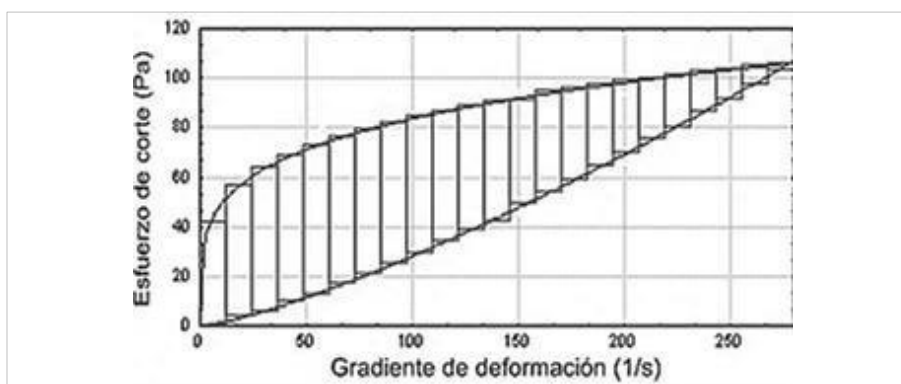


Figura 17. Reograma de un fluido tixotrópico, con elevada histéresis (área entre las curvas) y representación de las áreas calculadas con la ecuación (12)

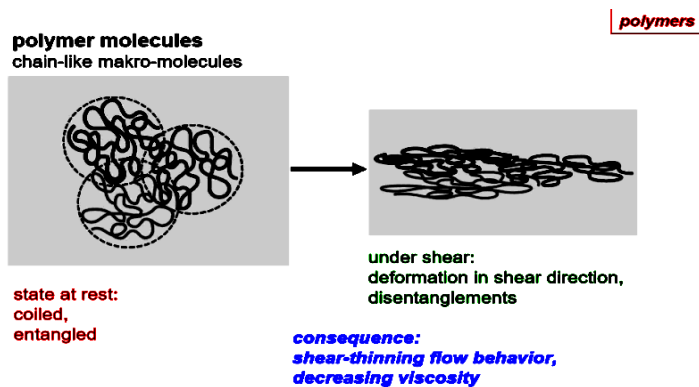


Figura 18a. Reacomodamiento al flujo, de moléculas de un polímero (tixotropía) (Anton Paar, 2010)

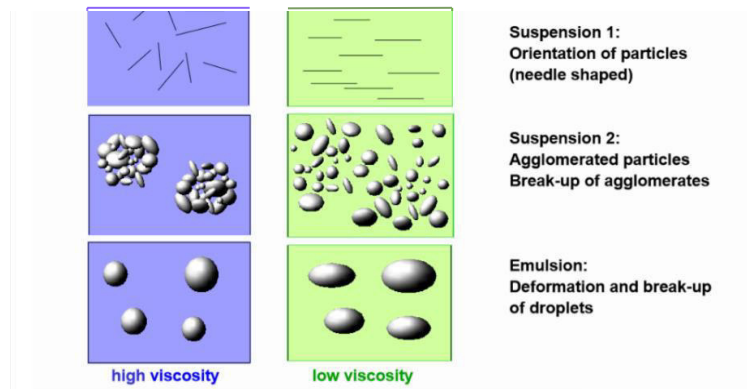


Figura 18b. Reacomodamiento al flujo, de partículas, aglomerados y gotas (tixotropía) (Anton Paar, 2010)

11. Aplicaciones

11.1. Influencia de la temperatura en leche concentrada

Los reogramas son una "radiografía" del producto o sistema analizado. Cualquier cambio que ocurra (en la formulación, de temperatura, de concentración, de tratamiento mecánico, etc.) se verá reflejado en este reograma.

En la Figura 19 se observa la influencia de la temperatura en leche concentrada antes del ingreso al secadero spray (48 % ST).

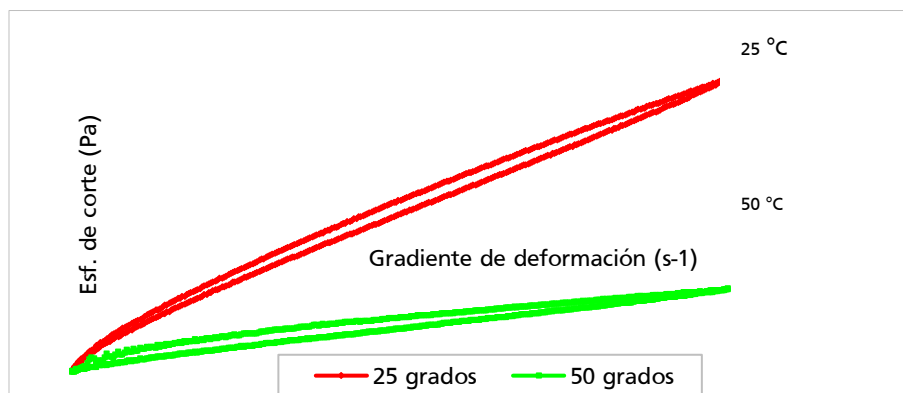


Figura 19. Disminución de la viscosidad (curva menos empinada o vertical, en verde) de leche concentrada (48 %ST) al aumentar la temperatura de 25 a 50 °C

En la Figura 20 A se observa la leve disminución del límite de fluencia (τ_0) y la marcada disminución del Índice de Consistencia (K), con la temperatura. Una mayor disminución ocurre con la viscosidad (figura 20 B), en mayor medida con la combinación de un tratamiento mecánico más energético ($GD = 200 \text{ s}^{-1}$).

11.2. Influencia de la temperatura en dulce de leche

En la Figura 21 y tabla 3 se observa la drástica caída de los parámetros reológicos con la temperatura, a menos de la mitad (70 °C) respecto a 50 °C, aun no siendo tan elevada la variación de temperatura.

Analizando las últimas 4 filas de la Tabla 21, manteniendo constante la temperatura y comparando los valores de viscosidad aparente, a 50 y 200 s^{-1} , se observa una caída brusca similar, a menos de la mitad cuando el tratamiento mecánico aumenta (de 50 a 200 s^{-1}).

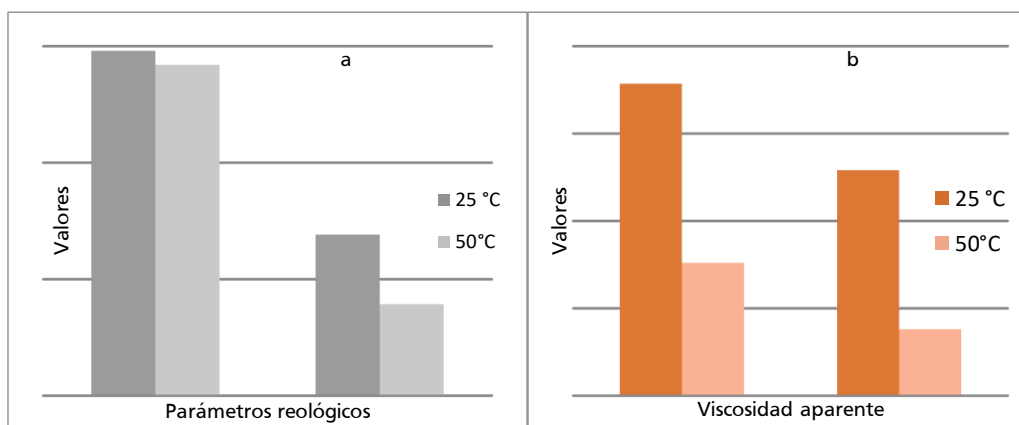


Figura 20. a. Disminución del límite de fluencia (τ_0) y el Índice de Consistencia (K) con la temperatura. 20 B. Disminución de la viscosidad aparente a $GD = 50 \text{ s}^{-1}$ (viscosidad de Kokini) y 200 s^{-1} para leche concentrada (48 %ST)

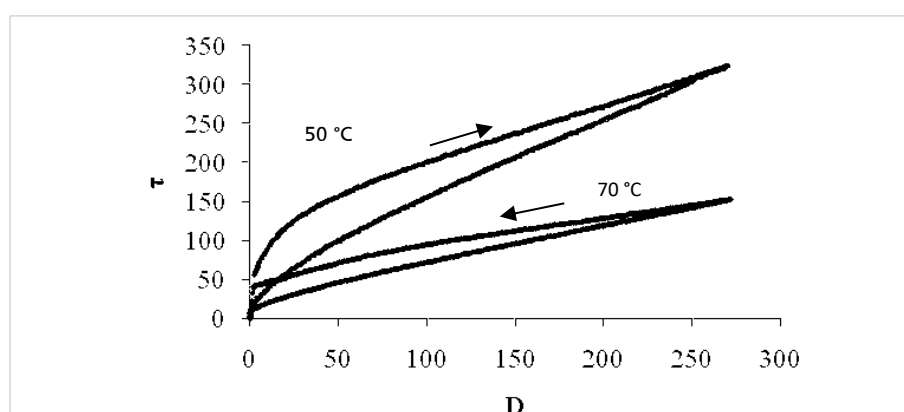


Figura 21. Influencia de la temperatura en Dulce de Leche, en un rango que involucra la temperatura normal de envasado (60-65 °C). Representación del comportamiento tixotrópico (flechas)

Tabla 3. Valores de parámetros reológicos a distintas temperaturas

Parámetros reológicos	Temperatura (°C)	
	50	70
$\tau_{0\text{sup}}$ (Pa)	66,95	30,65
K_{sup} (Pa.s ⁿ)	8,033	3,687
n sup (adim.)	0,613	0,621
$\mu_{\text{ap sup}}$ (50 s ⁻¹) (cP)	3110	1430
$\mu_{\text{ap sup}}$ (200 s ⁻¹) (cP)	1350	640
$\mu_{\text{ap inf}}$ (50 s ⁻¹) (cP)	1980	935
$\mu_{\text{ap inf}}$ (200 s ⁻¹) (cP)	1270	599

11.3 Influencia de la concentración de hidrocoloides en yogur

En la siguiente figura se observa, caso A, el reograma de un Yogur en el que se utilizó en la formulación inicial 1 % de una mezcla de Gelatina (G) y Almidón modificado (AM), para obtener una consistencia de Yogur batido/cremoso. La curva de triángulos negros está hecha a principio del almacenamiento, y la de triángulos blancos al final del almacenamiento (1 mes), observándose una leve elevación de la curva (aumento de viscosidad y consistencia), durante dicho período, posiblemente por generación de enlaces principalmente no covalentes (electrostáticos, hidrofóbicos, de Van der Waals), favorecido por la baja temperatura de almacenamiento (10 °C) (9).

El caso B corresponde a un Yogur sin agregado de hidrocoloides, observándose nuevamente una elevación de la curva (círculos blancos, correspondiente a un tiempo de almacenamiento de 1 mes), respecto a la curva correspondiente a un Yogur recién elaborado (círculos negros).

Se observa que los reogramas correspondientes a un Yogur sin y con agregado de hidrocoloides son extremadamente diferentes, pudiéndose ser detectada (y cuantificada) esta diferencia a través de dichos reogramas y los parámetros de los modelos anteriores.

Cualquier cambio en la formulación y/o proceso (variación de cantidad de hidrocoloides agregados, cambio de un tipo de ingrediente, diferente tipo de tratamiento térmico inicial, distinta temperatura de almacenamiento, etc.) puede ser detectado (y cuantificado, a través del cálculo de dichos parámetros reológicos), a través del reograma y los modelos reológicos adecuados, que contienen los parámetros mencionados.

Este tipo de gráfica sirve para realizar control de calidad de los productos, según su formulación y metodología de procesamiento. Por ejemplo si se suplanta un aditivo por otro igual pero de otra marca comercial más barato, o por otro tipo de aditivo (o sustancia), a través del reograma puede determinarse si el producto presenta similares o distintas características reológicas, como así también mediante el cálculo de los parámetros reológicos de los modelos. Mientras más parecidos sean los reogramas y parámetros, menor influencia tiene el cambio producido sobre las características reológicas del producto.

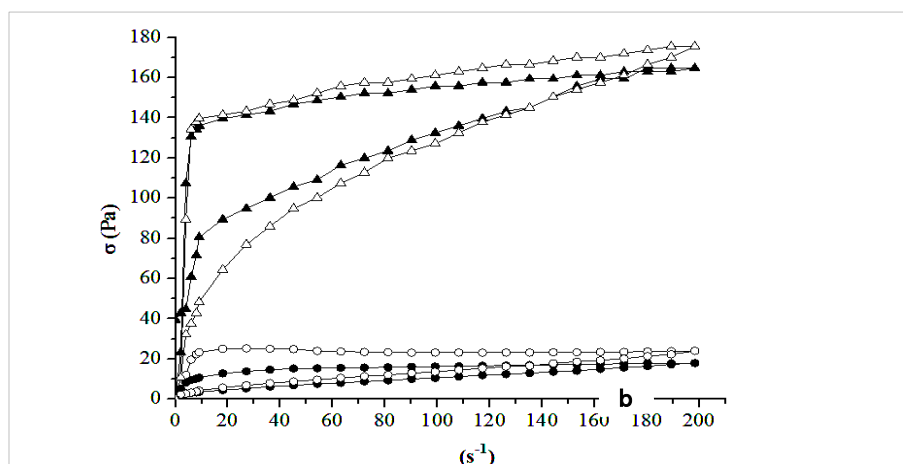


Figura 22. A. Reograma de Yogur con agregado de hidrocoloides (concentración total 1 % (G + AM)). B. Reograma de Yogur sin agregado de hidrocoloides

En la Figura 23 se observa y confirma que las 2 bacterias del fermento (*Streptococcus thermophilus* – ST y *Lactobacillus delbruekii* sp. *bulgaricus* - LB) trabajan mejor con baja tensión (concentración) de oxígeno y, por lo tanto, la coagulación empieza en el fondo del fermentador, donde hay menor concentración de aire (oxígeno) disuelto.

La curva superior (rojo, inicial tk) se refiere a una muestra extraída de la primera parte de Yogur que sale del fermentador, que corresponde a la parte inferior del fermentador, debido a que la válvula de extracción del producto está en el fondo del recipiente.

Se observa que esta gráfica es la que se encuentra más elevada, lo cual implica valores mayores de Índice de consistencia (K), de viscosidad aparente (μ_a), límite de fluencia (τ_0), y tixotropía (mayor área encerrada entre las curvas).

Las otras dos muestras, de mitad de tanque fermentador (mitad tk) y parte superior del tanque fermentador (final tk) presentan comportamientos muy parecidos y, por ende, parámetros reológicos similares entre sí.

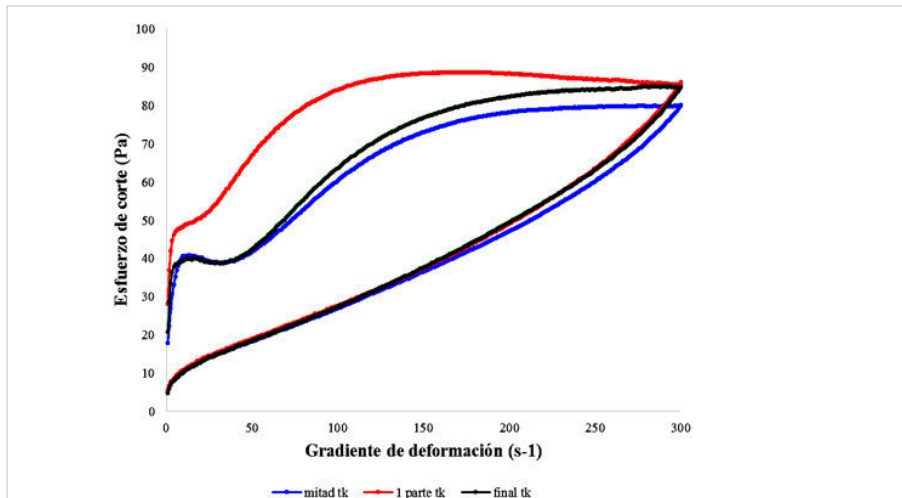


Figura 23. Reogramas de un mismo Yogur, de muestras de diferentes zonas del tanque fermentador

11.4 Determinación del punto gel

El punto gel se considera que es aquel donde el sistema deja de fluir como líquido, presentando una apariencia gelificada. Un parámetro muy importante en el estudio de la estabilidad de diferentes sistemas alimenticios es el tiempo de gelificación (tg), o sea, el tiempo donde el sistema se desestabiliza y pasa de estado de solución a gel (sol gel).

El pasaje anterior puede ser beneficioso (dulce de leche, yogur, queso untable, etc.) o perjudicial (base para helados, leche estéril, etc.).

Existe un método visual (subjetivo) de determinación del tg que es la cuantificación con un cronómetro del tiempo en que una muestra, colocada dentro de un tubo oscilante resistente a la temperatura (Pyrex), deja de fluir (moverse) dentro del tubo que se encuentra en un baño termostático a la temperatura de estudio, mantenida constante a través de un sistema automático de control de temperatura.

Se encontró que un método objetivo (más exacto) de tg puede ser la determinación del aumento rápido del módulo complejo (G^*) (figura 24). Este módulo se encuentra directamente relacionado a enlaces inter e intramoleculares de la matriz en estudio, los cuales se favorecen con el calentamiento y las concentraciones de algunos compuestos presentes, y se forman muy rápidamente en el punto gel, donde la viscosidad se dice que tiende a infinito.

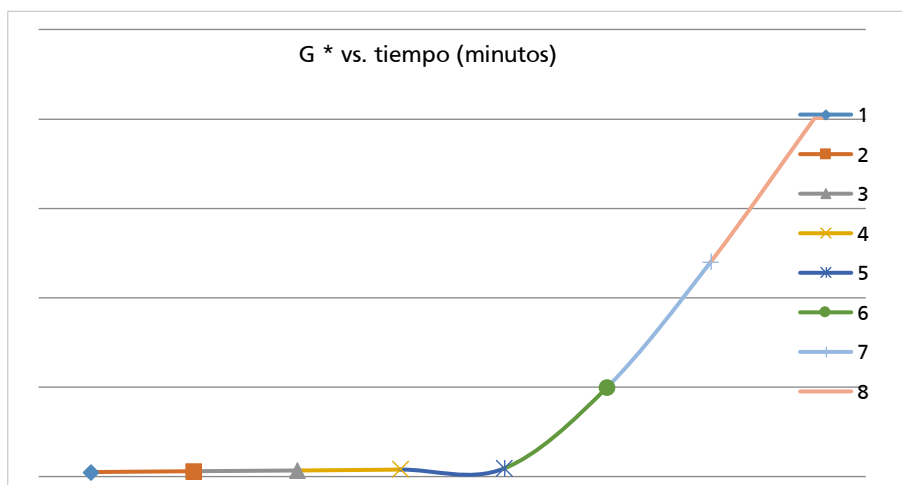


Figura 24. Variación (aumento) brusco del módulo complejo en el "punto gel"

11.5. Cuantificación de la viscosidad

Se conoce que la viscosidad es una de las principales propiedades de transporte, necesaria de conocer para el diseño de equipos (cálculos de transferencia de calor, de cantidad de movimiento, etc.), la adopción de bombas, etc.

Su cálculo se complica en el caso de Fluidos No Newtonianos (FNN), ya que como se describió su viscosidad es variable con el GD (tratamiento mecánico) al cual esté sometido el fluido, según el proceso que se esté realizando sobre el mismo (tabla 1). Este gradiente es una medida del trabajo mecánico que se está ejerciendo (agitación, bombeo, homogeneización, etc.) y debe tenerse noción de cuál es el gradiente para el cual se necesita el valor de viscosidad.

Una forma aproximada de cálculo es: $D' = \Delta V / \Delta h$

ΔV = variación de velocidad entre los dos puntos (zonas) donde se produce el GD.

Δh = distancia de separación entre los dos puntos (zonas) donde se produce el GD.

A modo de ejemplo se describe el cálculo aproximado del gradiente que se produce en un bombeo (dentro del casquete de una bomba, centrífuga en este caso, que conceptualmente coincide con lo que ocurre en la mayoría de las bombas existentes).

La figura 25 es el esquema de una bomba centrífuga, con sus características internas, como radio de giro del rodete porta-álabes (R) y distancia del extremo exterior del rodete a la pared interna de la bomba (d), junto con la velocidad angular (ω) de giro(horario) del rodete de la bomba (1/s) y la velocidad tangencial (lineal) del extremo del rodete (V_t).

Se observa que el gradiente de velocidad que se produce (V) es entre V_t y V_{PARED} (cero).

Se observa que la distancia en la cual se produce el gradiente de velocidad (GD) es $\Delta h = d$.

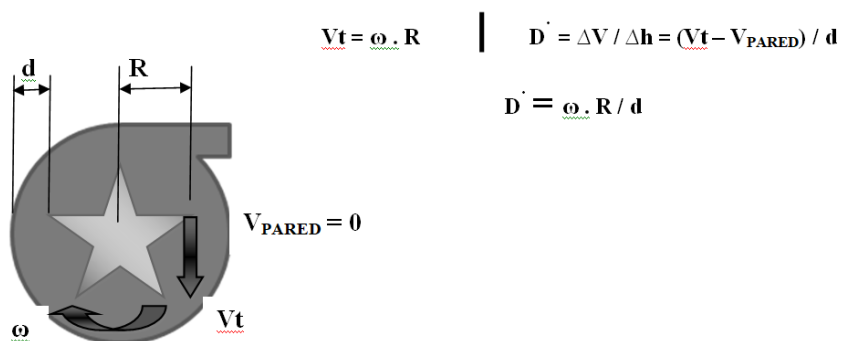


Figura 25. Esquema de una bomba centrífuga y sus dimensiones características

Como ejemplo de cálculo se proponen 2 casos, de una bomba centrífuga y de una bomba lobular o helicoidal (yogur), con características constructivas similares, pero diferentes velocidades de giro, acorde a su diseño y uso.

$$\left. \begin{array}{l} \omega = 2.400 \text{ rpm} \\ R = 20 \text{ cm Bomba} \\ D = 2 \text{ cm} \end{array} \right\} \text{centrífuga} \longrightarrow D \sim 1.250 \text{ s}^{-1}$$

$$\left. \begin{array}{l} \omega = 200 \text{ rpm} \\ R = 20 \text{ cm} \\ D = 2 \text{ cm} \end{array} \right\} \text{ Bomba centrífuga} \longrightarrow D \sim 105 \text{ s}^{-1}$$

Se observa la gran influencia del tipo y condiciones del proceso, tipo de equipo (bomba) y de producto, sobre el GD del cual depende directamente el valor de la viscosidad, para FNN.

11.6. Diseños experimentales, modelado, cuantificación y predicción

Existen muchos y variados Diseños Estadísticos Experimentales (DEE). Entre ellos, las factoriales y rotacionales centrados (que permiten estudiar dos variables, en tres o más niveles), Box-Bhenken (tres variables en tres niveles) y otros.

Estos DEE permiten estudiar espacios tecnológicos, con una base estadística necesaria para poder extraer conclusiones con adecuada exactitud, y lograr ecuaciones de modelado que permiten predecir y describir el comportamiento de un sistema en estudio.

Estas ecuaciones generalmente son polinomiales (Statgraphics, utilizando variables codificadas), con términos de hasta un grado una unidad menor que los niveles seleccionados de las variables; por ende, generalmente son polinomios de 2^{do} grado, para tres niveles de las variables (9).

Otros programas estadísticos (Table Curve 2D y 3D, Origin, etc.) testean muchas ecuaciones (exponenciales, logarítmicas, fraccionarias, entre otras) en pocos segundos, para obtener expresiones que representen adecuadamente un set de valores experimentales.

Uno de los más utilizados es el diseño factorial de dos variables en tres niveles, que propone realizar 11 experiencias, según la tabla 4, en este ejemplo aplicado a un estudio realizado sobre la "cinética de desarrollo de color en Dulce de Leche".

Las repeticiones centrales producen una disminución del error del método. Dos es el número mínimo; realizando más repeticiones se aumenta la exactitud.

Tabla 4. Dominio experimental del diseño factorial del estudio en dulce de leche

Variables	Denominación		Niveles de los factores		
	Codificada	No codificada	-1	0	1
pH de la mezcla inicial	X ₁	pH	6	NO codificado 7	8
Temperatura	X ₂	T (C)	105	122,5	140

El número de experiencias se obtiene de la siguiente fórmula: $NE = N^V + RC$, siendo:

NE = N total de experiencias. N = N de niveles de las variables en estudio (6, 7 y 8 para el pH y 105, 122,5 y 140 para la temperatura). v = N (tipo) de variables en estudio (dos: pH y T). RC = Repeticiones de la experiencia central (2).

Aquí: $NE = 3^2 + 2 = 11$

Los polinomios mencionados, por ejemplo de 2^{do} grado, tienen una expresión del tipo:

$$R = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \varepsilon$$

R es la respuesta medida en cada experiencia (color, acidez, pH, retención de agua, índice de consistencia, límite de fluencia, viscosidad, consistencia, cremosidad, adhesividad, cohesividad, firmeza, y varios otros).

X₁ y X₂ son las dos variables en estudio, codificadas, en el caso de DEE factorial entre los valores -1 y + 1 (tabla 4).

β₀ = es la constante del modelo de aproximación a los valores experimentales.

β₁ = es el coeficiente de la variable X₁.

β₂ = es el coeficiente de la variable X₂.

ε representa el error del método, y normalmente no se tiene en cuenta por estar contemplado en los estadísticos que arroja el programa, lo cual se acepta si se encuentran dentro de valores normales.

Los niveles extremos de las variables (-1 y +1) deben estar equidistantes del valor central (0), y se seleccionan según algún criterio previo, teniendo en cuenta el espacio tecnológico que se quiere investigar ((-1; +1], Tabla 4).

Las variables deben codificarse para que la influencia de sus valores numéricos absolutos, adoptados en el DEE, pasen a ser relativos y, por ende, puedan compararse entre sí y permitan ver fehacientemente qué variable influye más sobre R, y cuánto.

El uso de los valores absolutos (no codificados) de las variables puede inducir a errores cuantitativos o, incluso, a invertir lo que ocurre en la realidad respecto a cuál variable influye más sobre R, y en qué medida.

Como ejemplo puede citarse el "estudio de la cinética de desarrollo de color en Dulce de leche" (DL), utilizando como variables de estudio el pH inicial de la mezcla (X1) y la temperatura de calentamiento (X2). Se seleccionaron los intervalos de pH de 6 a 8 y de temperatura de 105 a 140 °C (tabla 4), correspondientes a valores de tratamiento térmico en paila (105 °C, un poco mayor a paila que es de 101-102 °C) y sistema continuo de producción de DL (140 °C, un poco mayor a los 135 °C usado normalmente).

Utilizando el programa Statgraphics 5.0, con los valores de las variables no codificadas, el coeficiente del término lineal correspondiente al pH (β_1) dio visiblemente mayor al correspondiente a la variable temperatura (β_2), lo cual indicaría que el pH influye más que la temperatura en el desarrollo de color en el DL. Esto claramente está en contra de lo que se visualiza en la realidad, donde claramente se demuestra lo contrario, sostenido por muchos trabajos anteriores sobre la reacción de Maillard, principal responsable del color en DL.

Utilizando las variables codificadas, en cambio, esto se invierte y se logra un modelo matemático que se ajusta a la realidad observada, donde $\beta_1 < \beta_2$.

Los coeficientes principales que deben analizarse son aquellos que representan cuantitativamente los términos lineales de las variables (β_1 y β_2 , de los términos que contienen a X1 y X2) ya que se relacionan directamente con la "inclinación" (pendiente) de la superficie de respuesta asociada a esta ecuación de modelado (Figura 24).

Aquella variable hacia donde esta superficie tenga más pendiente o inclinación (se encuentre más "empinada", o sea, presente mayor variación o caída) es la variable que más influye sobre la respuesta. Esto surge también del análisis y comparación de los valores numéricos de β_1 y β_2 . Aquel coeficiente que sea mayor indica que la variable asociada a él influye más sobre R que la otra variable, y el número de veces que es mayor indica cuantas veces más influye una variable que la otra, sobre R.

Por ejemplo si β_1 es 3 veces mayor que β_2 indica que la variable X1 influye 3 veces más que X2, sobre la respuesta medida (R).

El signo de estos coeficientes indica algo muy importante que es si las variables tienen una influencia directa o inversa, sobre R. Un signo positivo de β_1 , por ejemplo, indica que X1 influye en forma directa sobre R, por lo cual si X1 aumenta R aumenta, y viceversa.

Si el signo fuese negativo indica todo lo contrario, una relación inversa entre X1 y R.

Los términos cuadráticos (X_1^2 y X_2^2) solo producen la curvatura de la superficie de respuesta, teniendo mucha menor influencia en la relación cuantitativa entre R y las variables tecnológicas estudiadas.

El término que contiene la multiplicación de ambas variables (X1. X2) se toma como un término cuadrático, pero tiene adecuada importancia ya que cuantifica la interacción que existe entre las variables, y mide la dependencia de la influencia de una de ellas respecto al nivel (valor experimental) de la otra variable.

Si el coeficiente del término que representa esta interacción (β_{12}) es elevado y comparable con β_1 y/o β_2 indica que la influencia de una de las variables depende del valor de la otra, o sea por ejemplo, indica que el efecto del pH es mayor cuanto mayor sea el nivel de temperatura utilizado (si este coeficiente β_{12} es positivo) o lo contrario si el coeficiente es negativo.

El DEE factorial permite obtener las denominadas Superficies de Respuesta (Figura 24), las cuales pueden permitir detectar zonas de trabajo de máximos y/o mínimos, dentro del espacio tecnológico investigado.

En el caso mencionado, del DL, se buscó detectar la combinación de pH y temperatura que diera la mayor velocidad de desarrollo de color, para diseñar el equipo "coloreador" del sistema continuo de producción, para lo cual se necesita un tiempo mínimo necesario para lograr un color determinado.

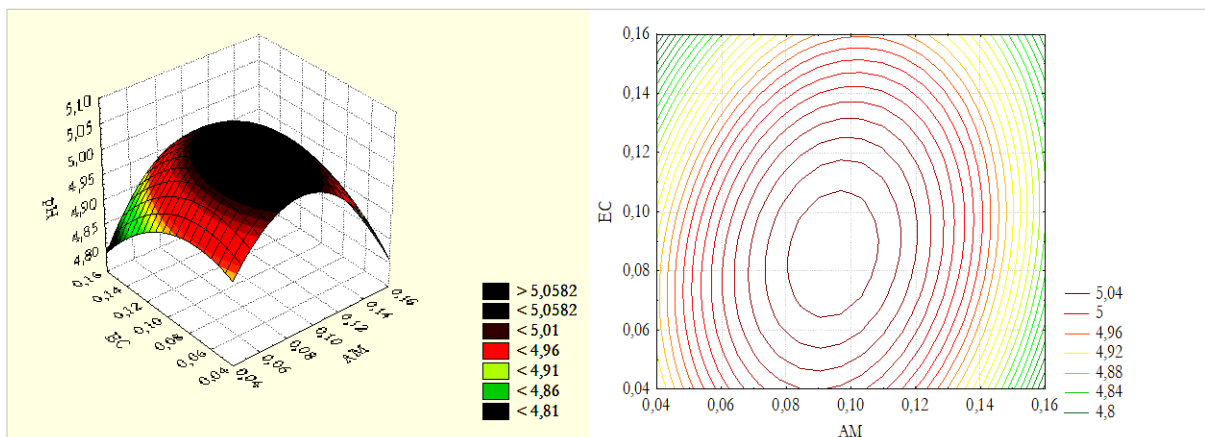


Figura 24. Superficie de respuesta y líneas de contorno, paramétricas en determinados valores de la respuesta (R) en el eje vertical (z)

12. Relación sensorial – instrumental

Esta relación es de suma importancia en el desarrollo de productos, su control de calidad, origen de los cambios debido a modificaciones en las formulaciones y estudios que relacionan la estructura interna con las características macroscópicas de un producto.

A modo de ejemplo se explicitan los resultados de una investigación sobre la influencia de dos hidrocoloides (Tabla 5), de uso normal en Yogur, sobre dos características que definen el producto: consistencia y viscosidad. Se observan los niveles de ambas variables en estudio, codificados (-1, 0, +1) y no codificados (0,2 %, 0,4 %, 0,6 %).

La consistencia se evaluó con un panel de evaluadores entrenados (Inst. de Tecnología de Alimentos-ITA, Fac. de Ingeniería Química- FIQ, Univ. Nacional del Litoral – UNL, Santa Fe, Argentina) y la viscosidad con un instrumento (viscosímetro Rheolab QC, Anton Paar), a un GD de 50 s^{-1} (Viscosidad de Kokini), similar al existente en la boca en una masticación normal.

Tabla 5. Dominio experimental del Diseño Factorial

Variables	Denominación		Niveles de factor		
	Codificada	No codificada	-1	0	1
Almidón Modificado	X1	AM	0,2 %	0,4 %	0,6 %
Gelatina	X2	G	0,2 %	0,4 %	0,6 %

Utilizando el método de Regresión Múltiple con variables codificadas, se obtuvieron los siguientes modelos matemáticos polinómicos, que permiten describir y predecir la influencia de los dos hidrocoloides sobre la viscosidad de Kokini (μ_{a50}) y la consistencia sensorial (Cs) (9).

$$Cs = 5,597 + 0,697 \cdot X1 + 1,027 \cdot X2 - 0,063 \cdot X1 \cdot X2 \quad R^2_{aj.} = 0,994$$

$$\mu_{a50} = 707,11 + 89,12 \cdot X1 + 128,33 \cdot X2 - 4,75 \cdot X1 \cdot X2 \quad R^2_{aj.} = 0,996$$

Se observa una excelente correlación entre las variables (X1 y X2) y las respuestas (Cs y μ_{a50}), analizando los valores de $R^2_{aj.} > 0,99$.

Analizando y comparando los coeficientes de los términos lineales, se observa que en el caso de la consistencia sensorial (Cs), la gelatina (G) influye aproximadamente un 50 % más que el almidón modificado (AM), lo cual se concluye a través del siguiente cociente: $1,027 / 0,697 = 1,474$. Ambos hidrocoloides influyen en forma directa por lo cual al aumentar cualquiera de ellos aumenta la Cs y viceversa.

En el caso de la viscosidad de Kokini ocurre algo similar ($128,33 / 89,12 = 1,44$).

En ambos casos se observa una interacción muy levemente negativa entre ambas variables (término X1.X2), debido al coeficiente negativo, lo cual indicaría una posible acción antagónica entre ambos hidrocoloides, pero muy poco importante debido a que sus coeficientes (0,063 y 4,75), están en una magnitud menor al 10 % respecto a los coeficientes de los términos lineales, en cada caso.

Intentado encontrar un modelado que relacione lo sensorial (subjetivo) con lo instrumental (objetivo), utilizando un programa estadístico que fitea miles de ecuaciones en pocos segundos (table curve 2D), se obtuvieron los siguientes modelos matemáticos:

$$Cs = -29,77 + 5,40 \cdot \ln(\mu_{50})$$

$$Cs = 0,00595 \cdot (\mu_{50})^{1,049}$$

$$R^2_{aj.} = 0,987$$

$$R^2_{aj.} = 0,991$$

Ambos ajustan excelentemente a los datos experimentales, y permiten predecir valores de Cs sin utilizar el panel de evaluadores entrenados, sino el valor de la viscosidad de Kokini, calculado con los datos de un reograma obtenido experimentalmente con un viscosímetro, que permita controlar y programar las variaciones del GD, en forma ascendente y descendente (9).

Referencias

1. Ciro Velázquez, H. (2006). *Reología de fluidos y su aplicación en el área de los alimentos*. Trabajo presentado a promoción como Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia- sede Medellín
2. Cárcamo Alvarado, L. (2005). *Comportamiento Reológico de Pasta de Murta (Ugni molinae Turcz) en Estado Fresco y Congelado*. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. Sede Valdivia. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Valdivia.
3. Bourne, M. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. 2nd ed. New York State Agricultural Experiment Station and Institute of Food Science Cornell University Geneva, New York. Academic Press. Elsevier.
4. Santini, Z., Alsina, D., Athaus, R., Meinardi, C., Freyre, M., Díaz, J., y González, C. (2007). Evaluación de la textura en quesos de oveja. aplicaciones del análisis factorial discriminante. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 5/6, (1-2).
5. Peleg M. (2019). The instrumental texture profile analysis revisited. *Journal of texture studies*, 50(5), 362–368. DOI: 10.1111/jtxs.12392.
6. Zuñiga Hernandez, L., Ciro velazquez, H., y Osorio Saraz, J. (2007). Estudio de la dureza del queso edam por medio de análisis de perfil de textura y penetrometría por esfera. *Revista de la Facultad Nacional de Agricultura- sede Medellín*. 60, (1), 3797-3811.
7. Tamime, A., Muir, D., Shenana, M., Kaláb, M., & Dawood, A. (1999). Processed cheese analogues incorporating fat-substitutes: 2. Rheology, sensory perception of texture and microstructure. *Lwt - Food Science and Technology*, 32, 50-59.
8. Caine, W., Aalhus, J., Best, D., Dugan, M., & Jeremiah, L. (2003). Relationship of texture profile analysis and Warner-Bratzler shear force with sensory characteristics of beef rib steaks. *Meat Science*, 64, 333-339.
9. Basiri, S., Haidary, N., Shahram, S., Shekarforoush, I., & Niakousari, M. (2019). Flaxseed mucilage: A natural stabilizer in stirred yogurt. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.049>.
10. Paroline, G. (2016). *Basics of Applied Rheology*. Manager of Technical and Professional Development. Anton Paar, Oregon State University. USA

Capítulo 18

Calorimetría diferencial de barrido para la caracterización de materiales alimentarios. Implicancias para el aprovechamiento de residuos y recursos autóctonos

María Florencia Mazzobre^{1,2*}, Juan Camilo Osorio-Arias³,
Oscar Alfonso Vega-Castro³, María del Pilar Buera^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamentos de Industrias y Departamento de Química Orgánica. Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad de Buenos Aires. Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Argentina.

³Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación BIOALI. Medellín. Colombia

* fmazzobre@yahoo.com.ar

Resumen

Un paso importante en el desarrollo de ingredientes funcionales naturales es el diseño de sistemas de estabilización de los componentes activos que facilitan además su efectiva absorción en el tracto intestinal (1). En general, los medios en que se conservan son congelados o deshidratados, habitualmente formando vidrios. Los componentes de estos sistemas se encuentran en un estado que no corresponde a su condición de estabilidad termodinámica, y exhiben muchos cambios dependientes del tiempo, que afectan significativamente la estabilidad. Su estado físico es extremadamente sensible a la humedad, la temperatura y el tiempo, y los cambios en la composición o en alguna de estas variables provocan transiciones de fase o estado. Por lo tanto, para el desarrollo adecuado de dichos ingredientes es necesario contar con datos de las características de los componentes bioactivos y excipientes y de las transformaciones dinámicas que pueden producirse durante el proceso de elaboración y/o almacenamiento.

Los principales cambios en los sistemas estabilizados se producen por cambios de estado (transición vítrea) y de fase (cristalización, fusión, gelatinización y retrogradación de almidón, desnaturalización y agregación de proteínas) y se pueden determinar mediante análisis térmico. El análisis térmico, comprende el estudio de la evolución de las propiedades de una muestra cuando se somete a cambios de temperatura a una velocidad determinada o bien a una temperatura constante durante un cierto tiempo. Se puede medir el cambio de distintas propiedades, como: masa (termogravimetría, TGA), temperatura (análisis térmico diferencial, DTA), flujo de calor (calorimetría diferencial de barrido, DSC), mecánicas (análisis termo-mecánico, DMA), el cambio de dimensiones (termodilatometría), entre otras (2,3). En este capítulo se tratarán las aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido para la caracterización y análisis de genuinidad, calidad y estabilidad de ingredientes de origen natural y de algunos biomateriales obtenidos a partir de residuos agroindustriales, obtenidos por procesos de fermentación.

Palabras clave: calorimetría, análisis térmico, transición vítrea, cristalización, estabilidad

1. Calorimetría diferencial de barrido

La técnica más utilizada para determinar las temperaturas de transiciones térmicas es la calorimetría diferencial de barrido (DSC), en la que se mide la energía (flujo de calor) absorbida (cambios endotérmicos) o liberada (cambios exotérmicos) por una muestra a medida que se somete una muestra y una referencia a un programa de temperatura controlado. El DSC es una técnica ampliamente usada para determinar temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m) y la Temperatura de cristalización (T_c), así como el flujo de calor asociado (exotérmico o endotérmico), además de los calores involucrados. En la Figura 1, se pueden ver las principales propiedades que se determinan en un DSC (3).

2. Descripción del equipo DSC

Los equipos DSC (Figura 1a), constan de un horno adiabático, con un sistema controlador de temperatura, un sistema de enfriamiento que emplea efecto peltier (hasta $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) o bien nitrógeno líquido (que permite enfriar hasta cerca de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$); además cuentan con un flujo continuo de nitrógeno gaseoso (entre 25 y 30 ml/min) se inyecta a las celdas donde se aloja la muestra con la finalidad de disminuir la humedad del ambiente en la atmósfera de trabajo y evitar condensación de agua del ambiente sobre las cápsulas. En la práctica se utilizan rampas de 5 a $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tanto para el calentamiento como para el enfriamiento, aunque pueden ser de hasta $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La muestra y la referencia se disponen en crisoles o cápsulas (Figura 1, b y c), que se pueden sellar herméticamente para evitar cambios de humedad. Los crisoles más utilizados son los de aluminio de 40 g que se pueden emplear hasta $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque también hay de acero inoxidable de 150 g, para aplicaciones a mayor temperatura. El ajuste continuo y automático de la temperatura se realiza a través de pequeños elementos calefactores, que aportan energía térmica mediante efecto Joule, y sensores de temperatura. Los crisoles de la muestra y la referencia se ubican sobre los calefactores y los sensores (Figura 2).



Figura 1. Fotografía de un equipo de DSC (a), detalle del horno con los crisoles conteniendo la muestra, S y la referencia R, posicionadas sobre los sensores (b) y colocación de las muestras en el horno (c)



Figura 2. Detalle de la ubicación de los crisoles de la muestra y la referencia sobre los sensores en el horno del DSC

En los métodos dinámicos, la muestra se calienta o enfría a una velocidad constante en la cápsula sellada, y se mide la diferencia de calor absorbido o entregado por la misma respecto de una cápsula vacía o bien que contenga un material inerte conocido que se utiliza como referencia. Se programa la velocidad de enfriamiento o calentamiento a que se debe someter la muestra y la referencia. El equipo registra la diferencia en el flujo de calor que hay que suministrar a ambas para mantenerla a la misma temperatura. Por ejemplo, si la transición en la muestra ocurre por absorción de calor (como en una fusión), para mantener la misma temperatura en la muestra y en la referencia, el equipo deberá aumentar el flujo de calor hacia la muestra, y esto se registra como una deflexión en la línea de base, que pasa por un máximo, formando un pico endotérmico (como se esquematiza en la Figura 3) (4). El criterio seguido en los termogramas, a menos que se indique lo contrario, es que los picos hacia arriba están asociados a procesos exotérmicos.

En los métodos isotérmicos se sigue la evolución del flujo de calor intercambiado entre la muestra y el sistema detector del calorímetro en función del tiempo a una temperatura constante.

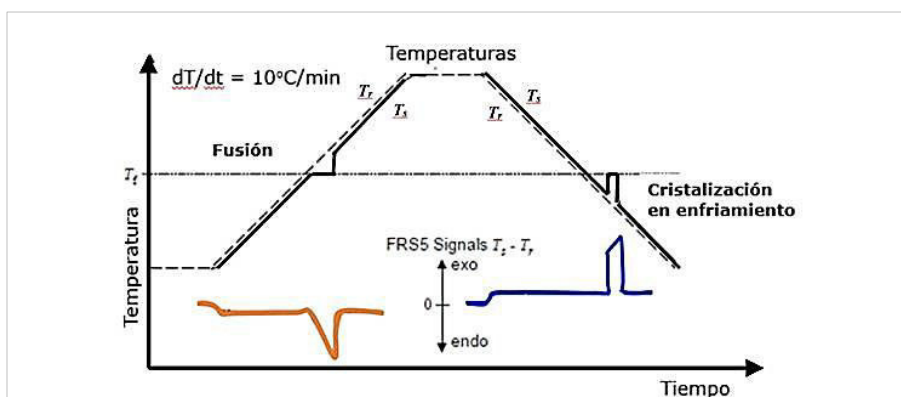


Figura 3. Esquema de las rampas de temperatura y cambios endo y exotérmicos observados en los termogramas correspondientes

3. Transiciones más frecuentes

Se pueden distinguir transiciones que ocurren sin cambio de fase, como la transición vítrea y otras en las que hay un calor involucrado que el sistema entrega o recibe del medio (5). En la Tabla 1 se resumen las aplicaciones más frecuentes de cada uno de estos métodos.

Tabla 1. Características y datos que se obtienen en los distintos tipos de análisis

Transición	Dinámico	Isotérmico
	Flujo de calor vs T Velocidad de enfriamiento/calentamiento constante	Flujo de calor vs tiempo T constante
Transición vítrea	$T_g, \Delta c_p$ (amorfo/sobre-enfriado)	-
Capacidad calorífica	c_p	-
Oxidación de lípidos	OOT	OIt
Varias reacciones químicas	ΔH y T	ΔH y tiempos
Cinética de cristalización	ΔH y T de fusión	ΔH vs. tiempo
Gelatinización/retrogradación de almidón.	ΔH y T	-
Desnaturalización de proteínas	ΔH y T	-
Polimorfismo	T	-
Congelación	ΔH y temperaturas	ΔH y tiempos
Grado de encapsulación	ΔH	-

3.1. Transición vítrea

Por DSC, se detecta la transición vítrea con base al cambio en la capacidad calorífica (Δc_p) como un cambio en la línea de base del termograma. En la Figura 4, se muestra un termograma típico (obtenido por DSC) de un vegetal deshidratado, en estado amorfo, donde se manifiesta la transición vítrea. Como puede observarse, se puede distinguir que ocurre en un rango de temperatura, y se puede informar la temperatura de inicio (onset), temperatura media (midpoint) o temperatura final (enstet) de la misma. Como es una transición reversible, se detecta nuevamente al realizar un segundo barrido, y es un indicio para su caracterización.

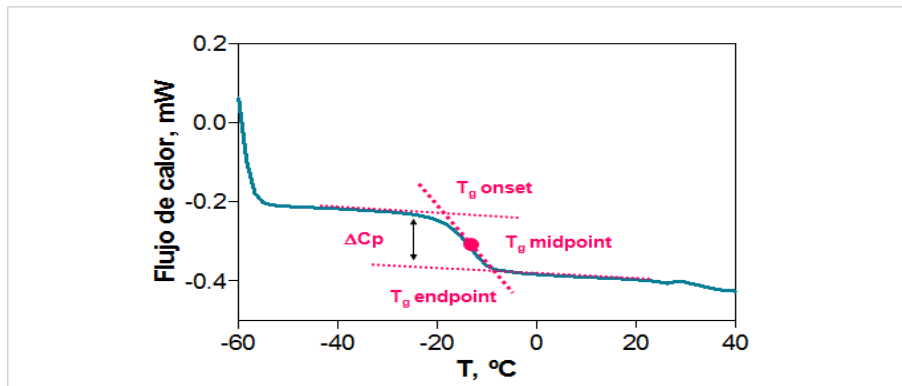


Figura 4. Termograma típico (flujo de calor vs. Temperatura) de un material amorfo (en este caso manzana deshidratada) mostrando la transición vítrea

3.2. Transiciones entálpicas

En la Figura 5 se esquematizan las características de las transiciones entálpicas más frecuentes en sistemas de alimentos o ingredientes.

Transiciones entálpicas		
Tipo	Orden → desorden	Desorden → orden
Flujo de calor	Endotérmico	Exotérmico
Gráfica		
Ejemplos	Azúcares, agua, lípidos, <u>polioles</u> → Fusión	Cristalización
	Almidón → Gelatinización	Retrogradación
	Proteínas → Desnaturalización	Agregación

Figura 5. Características de las transiciones entálpicas más comunes en ingredientes y alimentos

3.2.1 Fusión y recristalización de azúcares

Los termogramas de los azúcares amorfos muestran la característica temperatura de transición vítrea, T_g (Figura 6). A temperaturas superiores el sistema se transforma en un líquido sobre-enfriado. A medida que la temperatura aumenta, la movilidad molecular aumenta y la viscosidad disminuye, las moléculas pueden reorientarse hasta alcanzar un estado termodinámicamente más estable como lo es la estructura cristalina. Como muestra la Figura 6, aproximadamente a temperaturas 50 °C superiores a T_g se observa el pico exotérmico correspondiente a la recristalización del azúcar (1,6). Si se sigue aumentando la temperatura, finalmente se registra la fusión como un pico endotérmico. En los sistemas sencillos de azúcares las cristalizaciones se observan fácilmente. Sin embargo, en sistemas heterogéneos (como los tejidos vegetales y otros medios complejos), la presencia de biopolímeros y de otros componentes retrasa la cristalización de solutos y gran parte del material permanece amorfo (6,7,8). En estos sistemas es más difícil observar recristalizaciones en los tiempos de la realización de los termogramas.

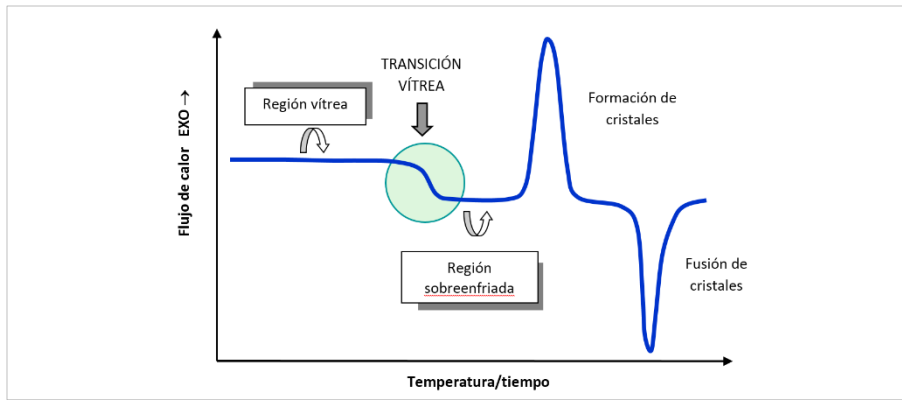


Figura 6. Termograma típico de un azúcar liofilizado (adaptado de Roos, 1992) (9)

3.2.1.1. Cálculo de la fracción cristalina

Como la medición en DSC se realiza a presión constante, como sigue en la ecuación 1:

$$\left(\frac{dq}{dt}\right)_p = \frac{dH}{dt} \quad (1)$$

La integral (área) del pico corresponde a la variación de entalpía total del proceso: El área corresponde a (H/t) (ordenada) * T (abscisa) y se normaliza respecto de la masa, por lo tanto, las unidades serán, ver ecuación 2:

$$\text{Área (H)} = \left(\frac{\text{Calor}}{\text{tiempo}}\right) \times \left(\frac{\text{Temperatura}}{\text{masa}}\right) = \left(\frac{J}{s}\right) \times \left(\frac{K}{g}\right) \quad (2)$$

y si se tiene en cuenta la velocidad de calentamiento (v , en K/s), ecuación 3:

$$\text{área}/v = \frac{\left(\frac{J}{s}\right) \times \left(\frac{K}{g}\right)}{\left(\frac{K}{s}\right)} = \left(\frac{J}{g}\right) \quad (3).$$

y por lo tanto las entalpías endo o exotérmicas tendrán unidades de J/g cuando se refiere a la masa del material que se está evaluando. Como el área de la transición es proporcional a la masa del material que se transforma, esto permite calcular fracciones cristalinas en sistemas sencillos, a través de la relación de áreas. La fracción cristalina se puede obtener de distintas formas:

a) A partir del área de fusión en corridas dinámicas.

Ya que la fusión corresponde a la fracción cristalina en la muestra (lo que funden son cristales, los amorfos no funden), el área de fusión refleja lo que ha cristalizado, ya sea por un tratamiento, proceso o almacenamiento. Según el esquema de la Figura 7, ecuación 4.

$$\alpha = \left(\frac{\Delta H_t}{\Delta H^*}\right) \quad (4)$$

Donde:

α : grado de cristalización

ΔH_t entalpía de fusión observada al tiempo t

ΔH^* entalpía de fusión del azúcar totalmente cristalino

% cristalinidad = $\alpha \times 100$

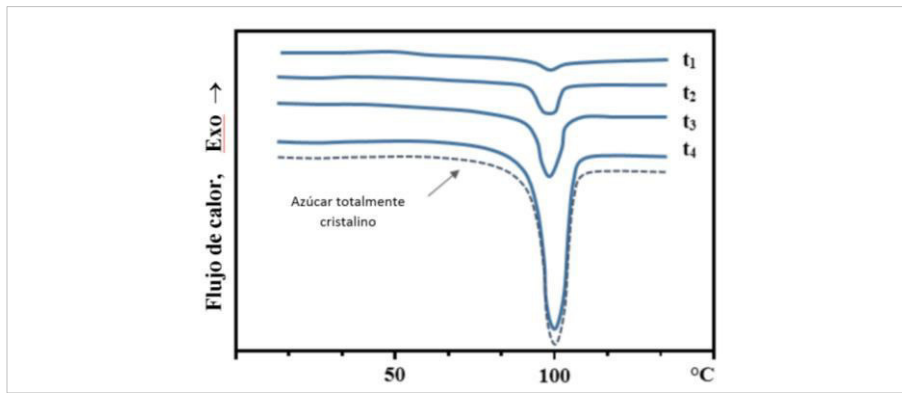


Figura 7. Termogramas obtenidos por DSC para el azúcar trehalosa liofilizado (amorfo) que se almacenó a distintos tiempos (t_1 a t_4) a 25 en un ambiente con una humedad relativa del 44 % previo a la medición en el calorímetro. Para cada tiempo se puede obtener el área del pico correspondiente, la cual normalizada respecto de la masa permite calcular la entalpía de fusión (ΔH_t , J/g)

En el caso en que en el termograma se detecte un pico de cristalización exotérmico previo a la fusión (como en la Figura 8), el área de cristalización no refleja el estado de la muestra inicial (es un evento que ocurre en el barrido). Por lo tanto, si lo que se quiere es evaluar tal cual se encuentra antes de la determinación, hay que considerar que esta área se debe restar a la de fusión.

La entalpía de fusión corresponde a la fusión de todos los cristales del sistema, se calcula según ecuación 5:

$$\Delta H_f = \Delta H_i + \Delta H_t \quad (5)$$

Donde H_f corresponde al área de fusión que se observa en el termograma, H_i corresponde a la fusión de los cristales que estaban antes del barrido y H_t es la correspondiente a la fusión de la porción de cristales que funde durante el termograma.

Como

$$\Delta H_t = \Delta H_c \quad (6)$$

Donde ΔH_c es la correspondiente a la cristalización durante el barrido, entonces, el grado de cristalización inicial se puede calcular con (7), resultando de intervenir (6) en (5):

$$\alpha = \frac{(\Delta H_f - \Delta H_c)}{\Delta H_f} \times 100 \quad (7)$$

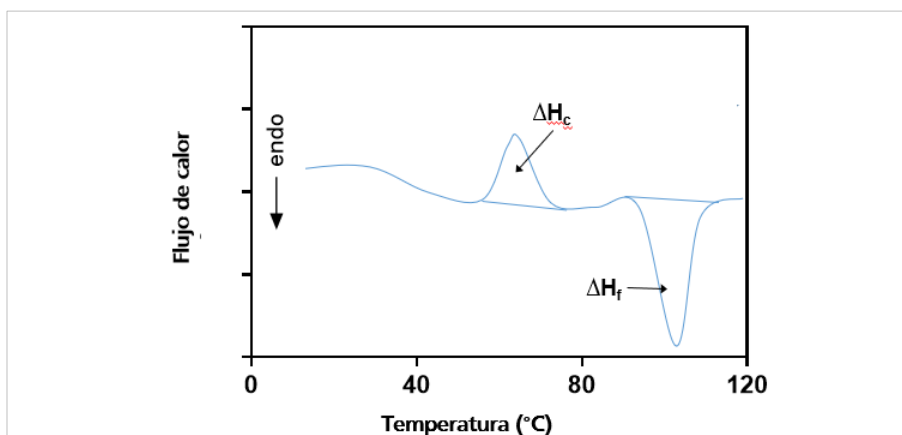


Figura 8. Termograma que muestra cristalización durante el barrido en el DSC y fusión del material previamente cristalizado sumado al que se cristalizó en el barrido

En los casos en los que el componente que cristaliza es agua, se puede realizar el mismo tipo de análisis, que por lo tanto permite estudiar sistemas congelados, la cantidad y velocidad de formación de hielo (10).

b) A partir del área de cristalización en mediciones isotérmicas (a temperatura constante):

Según la Figura 9, $\alpha = \frac{\Delta H_t}{\Delta H_{final}}$, donde ΔH_t corresponde al área calculada a un dado tiempo y ΔH_{final} , es el área de la curva completa.

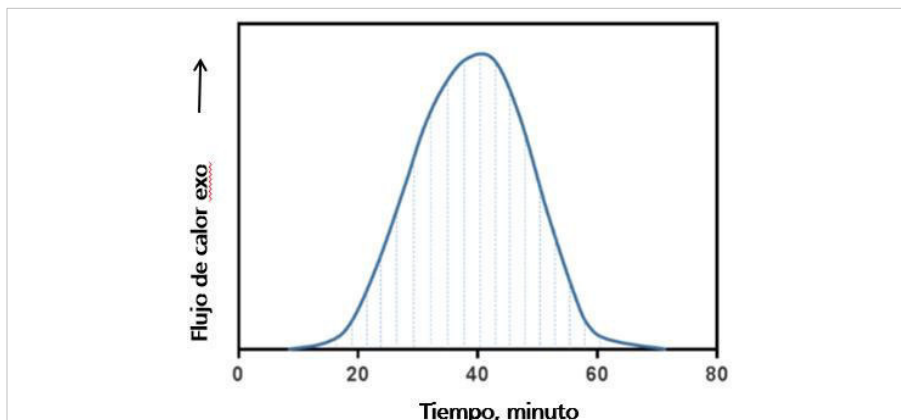


Figura 9. Termograma isotérmico obtenido para un azúcar liofilizado (amorfo). Para cada tiempo (línea punteada) se puede obtener el área bajo la curva, correspondiente a la entalpía de cristalización a dicho tiempo

3.2.1.2. Cinética de cristalización

Una vez obtenido el % de cristalización en función del tiempo, se puede realizar el estudio de la cinética, graficando en función del tiempo, como muestra la Figura 10 (10,11). Si la corrida se realizó en forma isotérmica se puede realizar la integral del área por partes, a distintos tiempos para obtener dicha curva.

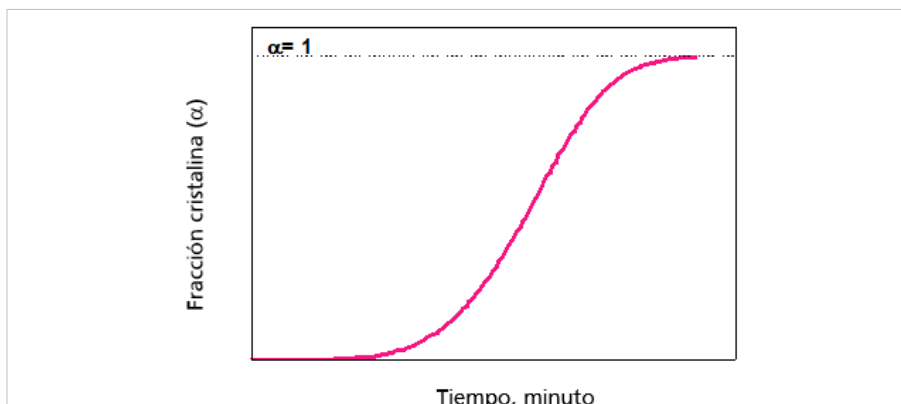


Figura 10. Evolución de la fracción cristalina (o grado de cristalización) en función del tiempo

Para el estudio de la cinética de cristalización suele emplearse la ecuación de Avramio Johnson, Mehl, Avrami, Kolmogorov (JMAK), usando la ecuación 8:

$$\alpha = 1 - e^{(-K_c t^n)} \quad (8)$$

Donde:

α es el grado de cristalinidad

K_c es la constante de velocidad o cristalinidad isotérmica

t es el tiempo

n es el índice de Avrami (nucleación y crecimiento)

En la Figura 11 se observa el buen ajuste de los datos experimentales con esta ecuación y además el efecto de la temperatura

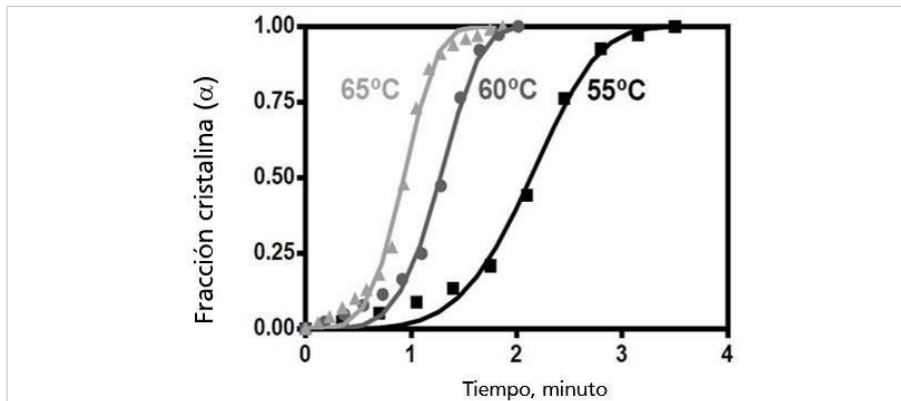


Figura 11. Representación gráfica de la fracción cristalina en función del tiempo a distintas temperaturas para un azúcar liofilizado (amorfo) modelada con la ecuación JMAK

3.2.2. Gelatinización y retrogradación de almidón

Las transiciones típicas de los almidones son la gelatinización y retrogradación. Éstas modifican o definen la estructura física de productos de semillas, tubérculos o raíces (cereales, legumbres y otros vegetales como papa y mandioca), ya sea durante el procesado o almacenamiento.

El almidón está compuesto por los polímeros de maltosa amilosa y amilopectina en proporción variable, dependiendo de la fuente. Estos polímeros se disponen formando estructuras llamadas gránulos, de forma bien definida para cada tipo de vegetal. En la amilosa las unidades de glucosa se unen por enlaces α -1-4 generando una estructura lineal, mientras que la amilopectina posee cadenas ramificadas a través de enlaces α -1-6 de las unidades de maltosa, que define la forma cristalina característica de cada tipo de almidón.

La gelatinización ocurre en presencia de una determinada proporción de agua, y a una cierta temperatura que depende de la fuente (Figura 12a). Al aumentar la temperatura, el agua penetra en los gránulos, éstos se hinchan y por eso la viscosidad de la suspensión aumenta. La amilosa migra hacia la fase acuosa y finalmente los cristales de amilopectina funden. La gelatinización se manifiesta en los termogramas, durante el calentamiento de sistemas de almidón-agua a través de uno o varios eventos endotérmicos (dependiendo de la cantidad de agua), que corresponden a la fusión de amilopectina. Cuando la proporción de agua es mayor que 70 % la gelatinización es completa y se observa un único pico endotérmico (como muestra la Figura 12a) a la temperatura de gelatinización.

A contenidos de agua intermedios, la gelatinización no es completa y se pueden observar dos o más picos endotérmicos. A contenidos de agua < 30 % generalmente se observa un pico pero corrido a mayor temperatura (12,13). Por debajo de esta proporción de agua ya no se observa la gelatinización (Figura. 12b).

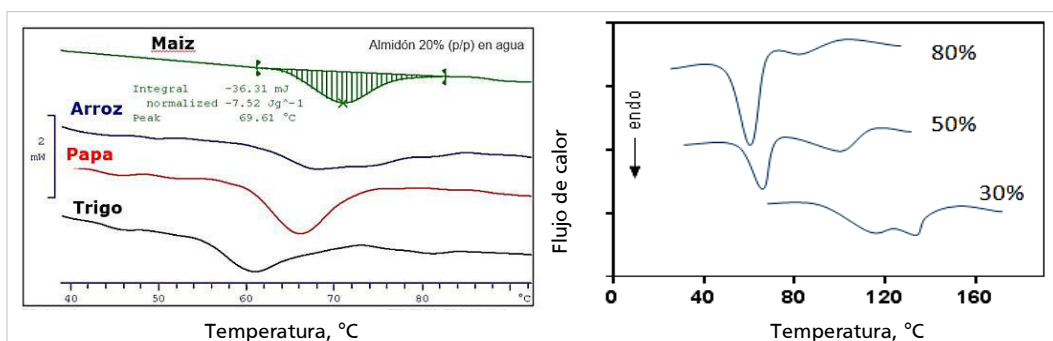


Figura 12. Termogramas de suspensiones de distintos almidones (20 % p/p en agua) que muestran la endoterma correspondiente a la gelatinización (a) y termogramas de suspensiones de almidón con distintos contenidos de agua 80, 50 y 30 % (b)

La presencia de azúcares y sales provoca aumento de la temperatura de gelatinización y disminuye los valores de la entalpía ya que se establece una competencia entre ellos y el almidón por el agua. Si se realiza un segundo barrido luego de la gelatinización, el termograma dará plano, ya que no hay en la muestra almidón cristalino. La retrogradación consiste en la recrystalización de la amilopectina y se manifiesta por la reaparición del evento endotérmico, luego de un tiempo de almacenamiento de un almidón previamente gelatinizado (Figura 13a). Por lo tanto, el aumento de la entalpía del pico endotérmico en función del tiempo permite seguir la cinética de retrogradación (Figura 13b).

El almidón retrogradado tiene temperatura de gelatinización menor que el almidón nativo (13) debido a que los cristales son más imperfectos (Figura 13a). La velocidad de retrogradación es mayor a menor temperatura (Figura 13b).

La proporción de almidón que gelatiniza indica el contenido de almidón nativo o cristalino inicial, y para estudiar el comportamiento y cinética de retrogradación se pueden aplicar las mismas ecuaciones que se discutieron en la sección 4.1.1.

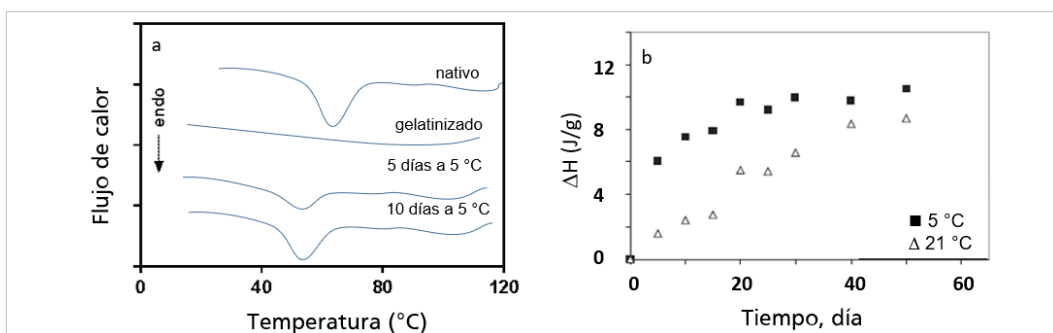


Figura 13. Termogramas obtenidos por DSC para almidón nativo, gelatinizado y gelatinizado almacenado distintos tiempos a 5 °C (a), y valores de entalpía de retrogradación en función del tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas (5 y 21 °C)

3.2.3. Desnaturalización de proteínas

Durante la desnaturalización de proteínas se produce un desdoblamiento de las cadenas polipeptídicas hacia un estado de mayor desorden, que se ve favorecido a mayor contenido de agua. La desnaturalización de las proteínas puede observarse como pico endotérmico en el calentamiento dinámico en el DSC (semejante a una fusión), la temperatura de desnaturalización es aquella en la que se ha producido un 50 % de desnaturalización, y es característica de cada proteína (Figura 14 a y b). En el caso de mezcla de proteínas con distinta estabilidad térmica, como en la clara de huevo, se pueden observar las distintas temperaturas de desnaturalización (Figura 14b). Según el grado de avance del proceso, y del tipo de proteína, podrá ser reversible o irreversible (14).

Es importante recordar que el pico de desnaturalización observado en el termograma corresponde a la fracción de proteínas que se encontraba en estado nativo en la muestra, antes de la determinación. Por lo tanto, un segundo barrido después de una desnaturalización completa dará un termograma plano. Una mayor entalpía de desnaturalización implica que una mayor fracción de proteínas permanece nativa después de un dado tratamiento. El grado de desnaturalización se puede estimar a partir de la relación entre la entalpía obtenida en una corrida y la entalpía de desnaturalización de la proteína nativa (equivalente al cálculo del grado de cristalinidad, sección 4.1.1). El desdoblamiento provoca que ciertas zonas no polares queden expuestas hacia un entorno acuoso, y por lo tanto las cadenas desdobladas tienden a acoplarse en un proceso que se denomina agregación y es exotérmico.

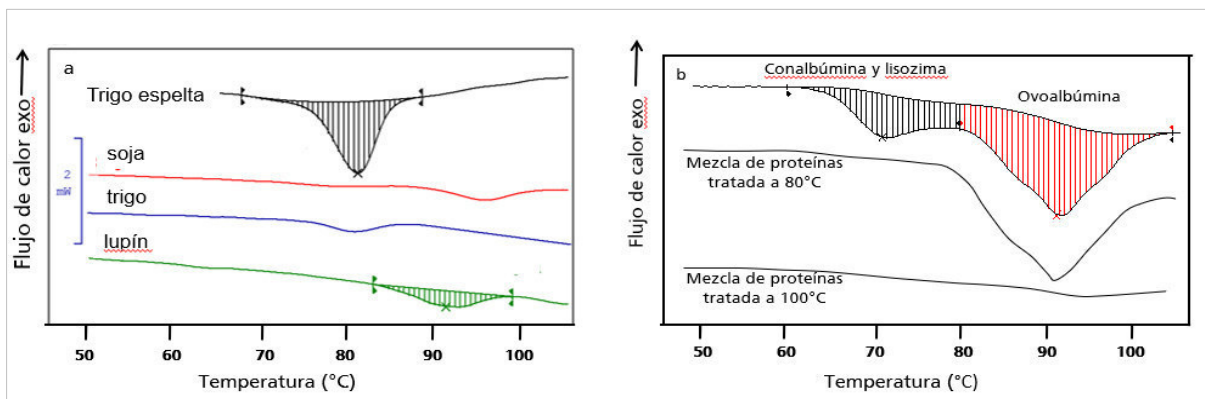


Figura 14. Termogramas que muestran los picos endotérmicos correspondientes a la desnaturalización de varias proteínas (a) y a la desnaturalización en el caso de mezcla de proteínas con distinta estabilidad térmica, como las de clara de huevo, donde se pueden observar distintas temperaturas de desnaturalización (b)

3.2.4. Transiciones de fase de los lípidos

Los lípidos presentan temperaturas de fusión y cristalización, y no suelen presentar transiciones vítreas. Los aceites son mezclas complejas de acilglicéridos y las temperaturas de fusión/cristalización que presenten dependen del grado de insaturaciones promedio de sus ácidos grasos. Debido al polimorfismo que frecuentemente exhiben los lípidos, las temperaturas de fusión y cristalización dependerán además de la historia térmica del material y de la velocidad de enfriamiento. Durante un enfriamiento rápido se generan estructuras cristalinas en forma α que es más inestable, que luego durante el calentamiento funden y dan lugar a la cristalización de la forma más estable, β . Las transformaciones entre las formas polimórficas pueden analizarse por DSC y tienen importancia para establecer la calidad de las grasas. Se puede analizar la cinética de cristalización y el polimorfismo mediante ciclos de enfriamiento y recalentamiento programados.

Luego de enfriar un aceite hasta temperaturas de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el barrido calorimétrico en función de la temperatura, se observan picos de recristalización de algunas fracciones hacia formas más estables y luego, a más altas temperaturas, los picos de fusión (Figura 15).

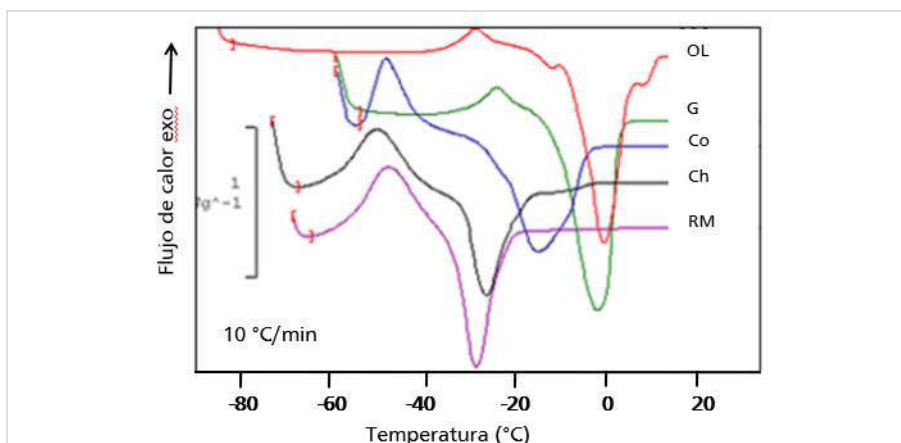


Figura 15. Termogramas dinámicos (10 °C/min) obtenidos para distintos aceites. Aceite de oliva (OL), girasol (G), colza (Co), chía (Ch) y rosa mosqueta (RM)

El punto de fusión aumenta a medida que aumenta la longitud de cadena y el grado de saturación. Por ejemplo, los aceites de rosa mosqueta y chía, con alta proporción de ácidos grasos polinsaturados muestran una temperatura de fusión promedio menor que la de otros aceites con mayor proporción de ácidos grasos saturados, como el de oliva o girasol alto oleico, como se muestra en la Figura 15.

4. Otras aplicaciones

4.1. Estabilidad oxidativa de lípidos

La estabilidad a la oxidación es un criterio importante para evaluar la vida útil y la calidad de diferentes productos. En concordancia con su menor temperatura de fusión, según se discutió en sección 4.2.4., la temperatura de oxidación es menor a mayor grado de insaturación de los ácidos grasos que componen los acilglicerolos. A través de DSC se puede obtener el tiempo de inducción (OIT) a temperatura constante (barrido isotérmico), y la temperatura de inicio de la oxidación, a una dada velocidad de calentamiento de las muestras (barrido dinámico), como se observa en la Figura 16.

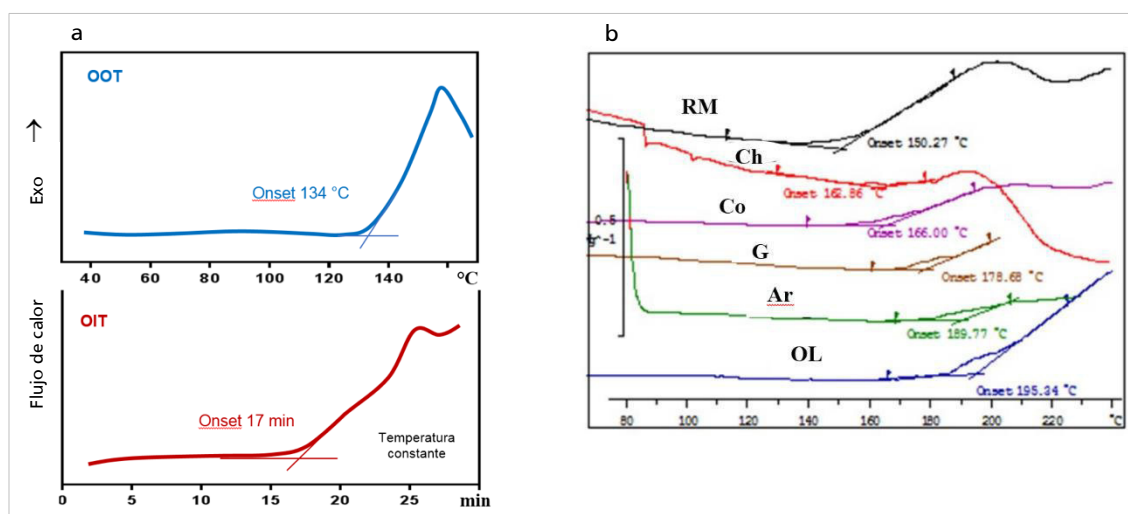


Figura 16. Termogramas típicos de DSC mostrando la determinación de la temperatura de inicio de la oxidación (OOT, barrido dinámico) y el tiempo de inicio de la oxidación (OIT, barrido isotérmico) para un aceite (a), y ejemplos de determinación de OOT para Aceite de oliva (OL), argan (Ar), girasol (G), colza (Co), chía (Ch) y rosa mosqueta (RM)

4.2. Interacciones entre componentes: caso ligando-ciclodextrina

La inclusión en ciclodextrinas es una de las formas en las que se pueden preservar, solubilizar o vehicular los compuestos bioactivos. La formación de complejos o interacciones entre componentes de un sistema se puede estudiar por DSC, evaluando corrimientos de temperatura o desaparición de las transiciones características de los componentes puros en la mezcla. En particular, el DSC ha resultado útil para evaluar la formación de complejos de compuestos de interés con ciclodextrinas (CDs), cuando los ligandos tienen una temperatura de fusión detectable y moderada, menor que las temperaturas típicas de descomposición de polímeros (<180 °C). Las CDs son oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de glucosa que poseen una superficie hidrofílica y una cavidad interna hidrofóbica de dimensiones tales que pueden incluir en ella compuestos no polares, modificando sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Estos sistemas constituyen un modelo sencillo para estudiar interacciones (15).

Utilizando el método dinámico se pueden determinar las temperaturas de fusión y los calores de fusión del ligando puro (ΔH_o) y del ligando en los complejos (ΔH_f) (Figura 17). La desaparición total o parcial de la señal de fusión del ligando indica la encapsulación completa o parcial en la CD. El porcentaje de ligando libre en el sistema (ligando que no se encapsuló inicialmente, o que se liberó durante cierto tratamiento) se puede determinar como la relación entre la entalpía de fusión del ligando en el sistema combinado y la entalpía de fusión del ligando puro, medidos en las mismas condiciones. Por lo tanto, el porcentaje de encapsulación del ligando se puede calcular según la siguiente ecuación:

$$\text{Ligando encapsulado, \%} = \left(1 - \frac{\Delta H_f}{\Delta H_o}\right) \times 100$$

donde ΔH_o (J/g de ligando) es la entalpía de fusión del ligando puro; ΔH_f (J/g de ligando) es la entalpía de fusión del ligando calculada a partir de los termogramas de los sistemas combinados con CD expresada por gramo de ligando en dichos sistemas.

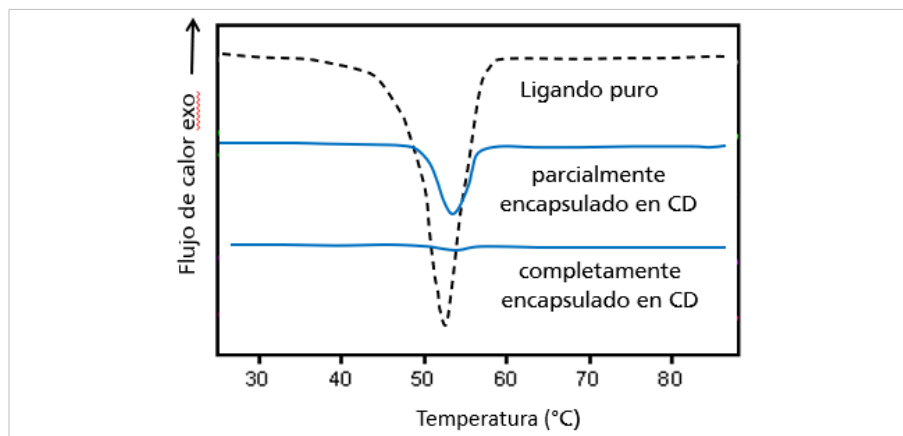


Figura 17. Termogramas obtenidos por DSC para un ligando puro comparado con los termogramas obtenidos para la mezcla ligando-CD liofilizada

4.3. Determinación de la capacidad calorífica

La capacidad calorífica de un material sirve para caracterizar el material y ajustar las variables de proceso. Se puede medir empleando DSC en forma precisa (con 3-5 % de incerteza) y rápida, sin requerimiento de módulos extra de software.

Se define:

C_p = capacidad calorífica específica a la cantidad de energía necesaria para aumentar la temperatura en 1K de 1mol de sustancia.

O bien

c_p = capacidad calorífica específica a la cantidad de energía necesaria para aumentar la temperatura en 1K de 1g de sustancia.

Se debe registrar la curva de absorción de calor en función de la temperatura para cada muestra, colocadas en cápsulas herméticas, y someterlas a un calentamiento desde 10 °C a 80 °C a 10 °C/min. Se emplea una cápsula vacía pinchada como referencia en todas las mediciones y realizando las determinaciones dinámicas en el rango de temperatura de interés. Un primer barrido se puede realizar con una capsula vacía pinchada (curva blanco) y luego se realizan los barridos de las muestras. Las mediciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno. El flujo de calor (HF) se determinó por diferencia entre el valor obtenido para la muestra y el valor correspondiente a la curva blanco, luego de haber alcanzado un equilibrio dinámico en ambos casos. El cálculo de c_p se puede realizar empleando la siguiente ecuación (16):

$$C_p = C \cdot HF / (m \cdot \beta)$$

Donde,

c_p = calor específico

C= Coeficiente de calibración de la celda (se obtiene a partir de la relación entre el valor de c_p determinado para el agua pura en el equipo de medición (3962,5 J/(Kg K) y el valor de c_p informado en bibliografía, 4186 J/(Kg K)).

HF= flujo de calor

m= masa de muestra

β = velocidad de calentamiento de la muestra

HF_M flujo de calor en la muestra – HF_B flujo en el blanco

La Figura 18 muestra un ejemplo de la medición de c_p para agua e infusiones de té durante el proceso de concentración.

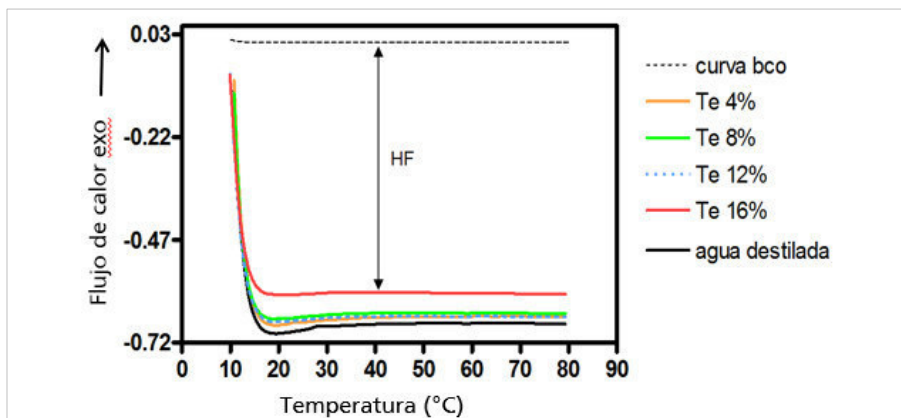


Figura 18. Termogramas correspondientes a agua e infusiones de té con distinta proporción de sólidos solubles y esquema para el cálculo de c_p

Los valores típicos de c_p en alimentos: de 0,1 a 5 J/g K. La Tabla 2 muestra los valores de c_p , del agua y de infusión de té en distintas concentraciones.

Tabla 2. Valores típicos de c_p en agua y una infusión de té en distintos grados de concentración

Muestra	c_p (J/KgK)
Té 4 % (p/v)	4067,7
Té 8 % (p/v)	4002,8
Té 10 % (p/v)	4052,9
Té 12 % (p/v)	3693,3
Agua destilada	4184,4

Se deben tomar ciertas precauciones:

- Medir en un rango amplio (c_p aumenta con T) y sin transiciones.
- Haber realizado una calibración reciente del equipo (con error menor a 1%).
- Emplear un blanco reciente, y con repetitividad menor que 2 %.

4.4. Caracterización de biopolímeros obtenidos a partir de residuos: polihidroxicanoatos

Un ejemplo sobre la utilización de residuos en forma sustentable es la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de biomasa. Los desarrollos actuales se enfocan a la sustitución de derivados del petróleo y a la formulación de materiales biodegradables con características similares a las de polímeros sintéticos (17,18,19) y propiedades funcionales específicas (20,21). Son poliésteres de ácidos hidroxicanoicos que ciertos microorganismos procarióticos acumulan intracelularmente en ambientes con exceso de carbono, y carencia de otros nutrientes esenciales (22,23). Se conocen alrededor de 150 tipos de PHAs (24), que cubren una amplia gama de propiedades y aplicaciones (25,26). Sus temperaturas de fusión y de transición vítrea y grados de cristalinidad, definen su permeabilidad al O₂ (que en general es baja) y propiedades mecánicas, (27). El peso molecular y la estructura química del polímero se controlan a través del tipo de cepa y de sustrato (28), y puede emplearse DSC para su caracterización. Como ejemplo, en la Tabla 2 se muestran las condiciones de fermentación de residuos de paja con *Ralstonia eutropha* (29).

En la Figura 19 se puede observar cómo las condiciones de fermentación influyeron sobre el material obtenido, que se manifestó en los termogramas, para los sistemas indicados en la Tabla 2. Cada sistema presentó más de una temperatura de fusión (Figura 17), lo que indica que el material está conformado por más de una cadena polimérica, de diferentes longitudes (30) y las proporciones de los distintos tipos de cadenas varía de acuerdo con las condiciones de fermentación (indicadas en la Tabla 3). Como los estudios por cromatografía indicaron que los principales PHA obtenidos fueron PHB y PHV, se incluyeron las corridas de ambos, como referencia.

Tabla 3. Condiciones de fermentación para obtención del biopolímero

Ensayo	pH	C/N	C/P	Tiempo de fermentación (h).
1	6	3	6	12
2	8	9	2	12
3	7	1	4	30
4	8	9	6	12
5	7	6	1	30
6	9	6	4	30
7	6	9	6	48
8	6	3	2	12
9	9	11	6	60

C/N y C/P son las proporciones de carbono a nitrógeno y carbono fósforo, respectivamente.

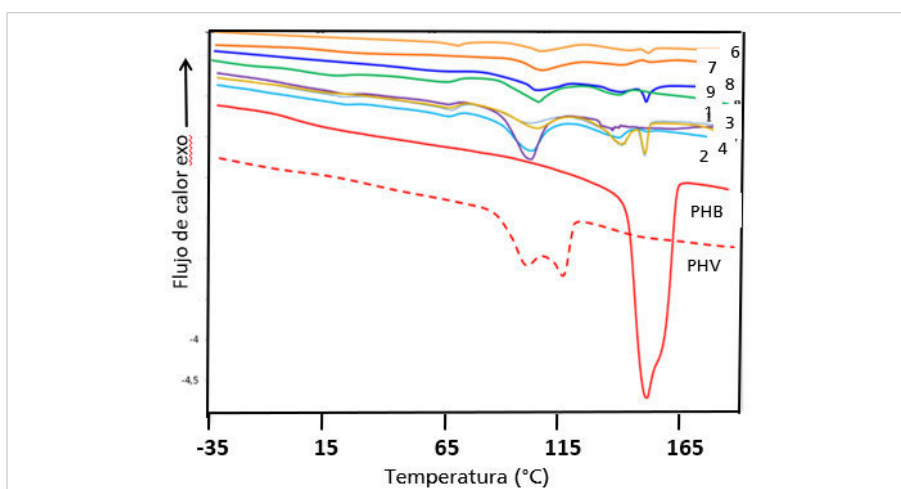


Figura 19. Se incluyen los PHA comerciales, PHB (poly β -hydroxybuty-rate) y PHV (poly β -hydroxyvalerate), como referencias. Los sistemas se numeran de 1 a 9, de acuerdo con la Tabla 3

Las temperaturas de fusión de los picos principales observados coinciden con las de las muestras PHV y PHB comerciales, que fueron 115 °C y 160.83 °C, respectivamente. Los PHAs obtenidos a partir de los residuos de piña, presentaron tres puntos de fusión: T_{m1} (71.41–109.86), T_{m2} (106.03-148.50) y T_{m3} (147.70-149.48), siendo más definidos los picos observados a T_{m2} y T_{m3} . Los valores de T_g oscilaron entre -48 y -32 °C, claramente menores que las del PHB comercial (2.47 °C), y coincidieron en muchos casos con los valores obtenidos en literatura (Tabla 4).

Tabla 4. Temperaturas y entalpías de fusión de PHA provenientes de biomasa

Sustrato	Microorganismo	PHA	Temp. y entalpías de fusión	Cita
Cascarilla de girasol, soya, aserrín, cascarilla de arroz "paddy"	<i>Ralstonia eutropha</i>	PHBs	172 °C	Oh y Saratale (2015) (31)
Delaza con torta de soya (ferm. en sustrato sólido)	<i>Cupriavidus necator</i>	PHB	170 °C	Oliveira <i>et al.</i> (2007) (32)
Diferentes medios de cultivos	<i>Ralstonia eutropha</i>	3-HB, 3-HO, 3-HD	134 °C a 151 °C ΔH_f 8 a 58 J/g	Chen <i>et al.</i> (2007) (33)
	<i>Azotobacter vinelandii</i>	PHBs	151 a 178 °C	Dominguez <i>et al.</i> (2015) (34)
Glucosa; ács. nonanoico, oleico y octanoico	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Copol. de cadena media-larga	161 a 178 °C	Ashby <i>et al.</i> (2002) (35)
Glucosa; ács. dodecanoicos	<i>Pseudomonas sp</i>	22 tipos de PHAs	42 a 146 °C	Matsusaki <i>et al.</i> (2000) (36)
Glucosa, ocatanato de sodio y el ácido 10-undecenoico	<i>Pseudomonas guezzennei</i>	varios tipos de PHAs	ΔH_f 3 a 35 J/g	Simon-Colin <i>et al.</i> (2012) (37)

En la Tabla 5 se muestran las entalpías de fusión obtenidas para los biopolímeros extraídos de los residuos agroindustriales de piña, y las muestra de PHB y PHV comerciales como referencia.

Tabla 5. Entalpías (ΔH) de fusión, para los PHAs obtenidos de los residuos de cáscaras de Piña y para PHB y PHV comerciales cristalinos

PHAs	ΔH_1 (J/g)	ΔH_2 (J/g)	ΔH_3 (J/g)
1	2.46	4.88	5.36
2	1.34	13.85	3.79
3	0.61	17.70	—
4	6.64	4.35	—
5	1.14	8.36	—
6	2.14	7.76	1.49
7	18.32	2.82	—
8	16.97	4.27	—
9	—	19.04	3.64
PHB	—	—	146
PHV	—	131	—

Los valores de entalpía de fusión de los productos de fermentación de los residuos de piña presentan fracciones de PHV y PHB cristalinos, en distinta proporción dependiendo de las condiciones de fermentación, pero están muy por debajo de los valores de las muestras comerciales, lo que indica que los mismos tienen alta proporción de fase amorfa. Se calculó entonces el porcentaje de PHV y PHA cristalinos en las muestras utilizando la ecuación 4, considerando los valores de entalpía de fusión de los polímeros completamente cristalinos, PHV= 131 J/Kg y PHB= 146 J/Kg (38, 39,34). Los valores de las fracciones cristalinas de cada biopolímero se muestran en la Tabla 6.

Con relación al porcentaje de cristalinidad, varios autores (40, 32, 34) reportan valores superiores a los informados en la Tabla 6 para diversos PHAs obtenidos con variadas cepas y sustratos. La formación de copolímeros es una causa de la presencia de fracciones amorfas y podría aumentarse si se realiza un ciclo de enfriamiento y calentamiento en la zona de cristalización, por un procedimiento conocido como *annealing* o templado (41).

Tabla 6. Fracción cristalina (α) para los PHAs obtenidos de cáscaras de piña

Muestra PHAs	α_2 (PHV)	α_3 (PHB)
1	3,73	3,67
2	10,57	2,60
3	13,51	—
4	3,32	—
5	6,38	—
6	5,92	1,02
7	2,15	—
8	3,26	—
9	14,53	2,49

Referencias

1. Onwulata, C.I. (2013). Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 510-532.
2. Roos, Y.H. (1995). Prediction of the physical state. In: *Phase Transitions in Foods* (p. 157-192). San Diego. Academic Press.
3. Cheremisinoff, N. (1996). *Polymer Characterization, Laboratory Techniques and Analysis*. Westwood, New Jersey. Noyes Publications.
4. Martínez-Navarrete, N., Andrés-Grau, A., Chiralt-Boix, A., & Fito-Maupoe, P. (1998). Transiciones de fase en alimentos. En: *Termodinámica y cinética de sistemas alimentos entorno*. Valencia. Universidad Politécnica de Valencia, 8.
5. Singh, P., Erdogdu, F., & Shafiur Rahman, M.S. (2009). Specific Heat and Enthalpy of Foods. In: Shafiur Rahman, M. (Ed.). *Food Properties Handbook*. 2nd ed. (p. 517-535). Boca Raton. CRC Press. Taylor & Francis

6. Roos, Y., & Karel, M. (2007). Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, *26*, 553-566.
7. Slade, L., & Levine, H. (1993). The glassy state phenomenon in food molecules. In: Blanshard, J.M.V. & Lillford, P.J. (eds.). *The glassy state in foods*. (p. 35-101). Nottingham. Nottingham University Press
8. Slade, L., & Levine, H. (1995). Glass transitions and water-food structure interactions. *Advances in food and nutrition research*, *38*, 103-269.
9. Roos, Y.H. (1992). Phase transitions and transformations in food systems. In: Heldman, R. and Lund, D.B. (eds.). *Handbook of Food Engineering*. (p. 145-197). New York, Marcel Dekker.
10. Jouppila, K., & Roos, Y.H. (2009). Crystallization: Measurements, Data, and Prediction. In: Shafiur Rahman, M. (ed.) *Food Properties Handbook*. 2nd ed. 10: (p. 323-346). Boca Raton. CRC Press. Taylor & Francis.
11. Mazzobre, M.F., Aguilera, J.M., & Buera, M.P. (2003). Microscopy and calorimetry as complementary techniques to analyze sugar crystallization from amorphous systems. *Carbohydrate research*, *338*, 541-548.
12. Zobel, H.F. (1988). Starch Crystal Transformations and Their Industrial Importance. *Starch-starke*, *40*, 1-7.
13. Roos Y H. (2012). Molecular mobility in dough and bread quality. *Bread Making*, *2012*, 430-446.
14. Fitzsimons, S.M., Mulvihill, D.M., & Morris, E.R. (2007). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, *21*, 638-644.
15. Dos Santos, C., Buera, M., & Mazzobre, M.F. (2012). Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. *Food Chemistry*, *132*, 2030-2036.
16. Kasprzycka-Guttman, T., Jarosz-Jarszewska, M., & Litwinienko, G. (1995). Specific heats and kinetic parameters of thermo-oxidative decomposition of peanut oil. *Thermochimica Acta*, *250*, 197-205.
17. Steinbuechel, A., & Fuchtenbusch, B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in biotechnology*, *16*, 419-427.
18. Madison, L.L., & Huisman, G. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *63*, 21-53.
19. Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, *25*, 1503-1555.
20. Frazzetto, G. (2003). White biotechnology? the application of biotechnology to industrial production holds many promises for sustainable development, but many products still have to pass the test of economic viability. *EMBO Reports*, *4*, 835-837.
21. Young, A. (2003). Biotechnology for food, energy, and industrial products new opportunities for bio-based products. *Environmental Science and Pollution Research*, *10*, 273-276.
22. Steinbuechel, A., & Lütke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, *16*, 81-96.
23. Anderson, J., & Dawes, E. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, *54*, 450-472.
24. Steinbuechel, A. (2001). Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*, *1*, 1-24.
25. Doi, Y., Kitamura, S., & Abe, H. (1995). Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, *28*, 4822-4828.
26. Jendrossek, D., & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual review of microbiology*, *56*, 403-432.
27. Steinbuechel, A., & Valentin, H. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *Fems Microbiology Letters*, *128*, 219-228.
28. Sim, S., Snell, K., Hogan, S.A., Stubbe, J., Rha, C., & Sinskey, A. (1997). PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. *Nature Biotechnology*, *15*, 63-67.
29. Vega-Castro, O., Contreras-Calderón, J., León, E., Segura, A., Arias, M., Perez, L.D., & Sobral, P.J. (2016). Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralstonia eutropha*. *Journal of biotechnology*, *231*, 232-238.

30. Srienç, F., & Kelley, A.S. (1999). Production of two phase polyhydroxyalkanoic acid granules in *Ralstonia eutropha*. *International journal of biological macromolecules*, 25 1-3, 61-67.
31. Oh, M., & Saratale, G.D (2015). Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. *International journal of biological macromolecules*, 80, 627-635.
32. Oliveira, F.C., Dias, M., Castilho, L., & Freire, D. (2007). Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource technology*, 98, 633-638.
33. Chen, J., Zhang, L., & Chen, G. (2007). Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoate Copolyesters in *Ralstonia eutropha* PHB 4 Harboring a Low-Substrate-Specificity PHA Synthase PhaC2Ps from *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15, 391-396.
34. Domínguez, M., Meneses, A., Romo, A., Peña, C., Segura, D., & Espín, G. (2015). Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly-β-hydroxybutyrate (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *European Polymer Journal*, 63, 101-112.
35. Ashby, R.D., Solaiman, D.K., & Foglia, T.A. (2002). The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanolic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 28 (3), 147–153.
36. Matsusaki, H., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*, 1(1), 17–22.
37. Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemechko, P., Schmitt, S., Senant, A., Kervarec, N., & Guezennec, J. (2012). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenneci* from alkanolates and glucose. *International journal of biological macromolecules*, 51(5), 1063–1069.
38. Bloembergen, S., Holden, D.A., & Marchessault, R.H. (1988) *Polymer Preprints*, 29, 594.
39. Pearce, R.P., & Marchessault, R.H. (1994). Melting and crystallization in bacterial poly(3-hydroxyvalerate), PHV, and blends with poly(β-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) *Macromolecules*, 27, 3869-3874.
40. López-Cortés, A., Rodríguez, O., Latisnere, H., Mejía, H., Gonzalez, G., & Lomelí, C. (2010). Characterization of polyhydroxyalkanoate and the phaC gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 109-118.
41. Müller, A., Hernández, Z., Arnal, M., & Sánchez, J.J. (1997). Successive self-nucleation/annealing (SSA): A novel technique to study molecular segregation during crystallization. *Polymer Bulletin*, 39, 465-472.

Capítulo 19

Encapsulación de compuestos bioactivos: métodos y caracterización

María Florencia Mazzobre^{1,2}, Patricio Román Santagapita^{1,3},
Fidel Villalobos Castillejos⁴, Silvia Pereyra Castro⁴, Martha Lucía Arenas Ocampo⁵,
Antonio R. Jiménez Aparicio⁵, Liliana Alamilla-Beltrán⁴,

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Deptos. de Industrias y Qca. Orgánica. Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad de Buenos Aires. Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ). Argentina.

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Universidad de Buenos Aires. Centro de Investigación en Hidratos de Carbono (CHIDECAR). Argentina.

⁴Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Campus Zacatenco. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Ciudad de México. México.

⁵Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Morelos. México

Resumen

Existe una tendencia a nivel mundial por el aprovechamiento de residuos agroindustriales, los cuales contiene gran cantidad de compuestos bioactivos, que ofrecen enormes beneficios para la salud cuando son incorporados en diversas matrices, ya sea biotecnológicas, farmacéuticas o alimentarias. Una forma de lograr su conservación y hacerlos accesibles en sitios específicos es la encapsulación. Existen varias formas de llevar a cabo la encapsulación de dichos compuestos, entre ellas se encuentra el secado por aspersión, emulsión, inclusión molecular en ciclodextrinas y la gelación ionotrópica. Es todos estos casos, es importante considerar la afinidad de los bioactivos con los materiales pared a usarse, así como con las condiciones de operación de los diversos equipos. El conocimiento del fundamento de estas técnicas, así como la interacción entre la estructura y funcionalidad del bioactivo y los materiales pared, ofrecen la posibilidad de mejorar los procesos, alcanzando mayores eficiencias de encapsulación, una mejora en la estabilidad del bioactivo y de su cápsula, así como el establecimiento de condiciones para su liberación. En este capítulo, se presenta una breve revisión de las mencionadas técnicas de encapsulación, haciendo énfasis de su importancia en la conservación de los compuestos bioactivos.

1. Introducción

La industria alimentaria es un importante consumidor de productos químicos de diferente funcionalidad ya sea como ingredientes específicos o aditivos. En los últimos años se ha presentado un incremento en la demanda de alimentos de mayor calidad, lo cual ha llevado al desarrollo de novedosos métodos de producción que utilicen aditivos naturales, manteniendo las características originales de los alimentos (1,2). Por otro lado, la diversidad de especies vegetales y animales ofrece la posibilidad de encontrar compuestos naturales con actividades específicas, beneficiosas para la salud y capaces de reemplazar ingredientes sintéticos actualmente cuestionados por el consumidor o importados. Se tiende principalmente a aprovechar recursos vegetales autóctonos y subproductos o residuos agroindustriales, que en su mayoría contienen biomoléculas con capacidad antioxidante, de alto valor nutritivo, pigmentos, entre otros.

1.1. Compuestos bioactivos

Los agentes bioactivos o compuestos bioactivos son aquellos componentes de alimentos que, al ser consumidos por el humano, provocan un efecto benéfico en su salud, debido a que pueden tener acción ya sea como antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antihipertensiva, antimicrobiana, bactericida, entre otras. Estos compuestos que actúan desde el nivel celular, a diferencia de los nutrientes básicos, los compuestos bioactivos están considerados como no esenciales para el funcionamiento del organismo y generalmente son ingeridos en alimentos. Dentro de los nutrientes básicos (proteínas, vitamina, lípidos, carbohidratos) se encuentran algunos componentes bioactivos como minerales, péptidos, probióticos, ácidos grasos poliinsaturados, polifenoles (1, 2, 3, 4).

Ácidos grasos. Se encuentran presentes tanto en aceites de origen vegetal (aceites de oliva, chía, maíz, cacahuate, almendra, girasol, moringa), como de origen animal (salmón, tiburón), teniendo acción cardioprotectora, anticáncer (antiangiogénesis), antiinflamatoria, antitrombótica. Los polifenoles (compuestos fenólicos, terpenoides y compuestos azufrados) se encuentran principalmente en frutas y vegetales (3, 4).

Compuestos fenólicos. Entre estos algunos ácidos (gálicos, cinámico, cafeico, clorogénico, etc.), así como quercetina, catequinas, flavones, antocianidinas, ligninas, taninos, isoflavonas, antraquinas, betacianinas, ligninas, taninos. Estos compuestos se encuentran en principalmente en fuentes de origen vegetal como cereales, frutas y verduras, aceite de oliva, café, té y vino; con efectos antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticos, tumorigénicos, anticáncer de próstata y de otros tipos (2, 3, 4).

Terpenoides. Como el alfa y betacaroteno, licopeno, luteína, esteroles, beta-sitosterol, están presentes en frutos de palmera, algunos cultivares de calabaza, hojas verdes, zanahoria, camote de pulpa naranja, melón, mango, albaricoque, papaya, mandarina, naranja, níspero, tomate, fruta "gac"; estos presentan acción anticáncer, anti-VIH, son relajantes vasculares, neuroprotector, antiinflamatorios e inmunomoduladores (3, 4).

Compuestos azufrados. El dialil sulfuro, alil-metil trisulfuro, se encuentran en ajo y cebollas, vegetales crucíferos (repollo, brócoli y col rizada) y presentan actividad anticancerígena y cardioprotectora (3, 4).

La necesidad de proteger, conservar, aumentar la vida útil y mejorar las características de manejo y conservación de los compuestos bioactivos, ha generado un enorme interés en el estudio y aplicación de técnicas de encapsulación, en la industria de alimentos, farmacéutica, agrícola, como en la biotecnológica. En los diferentes métodos de encapsulación, los compuestos bioactivos, ya sea puros o en mezclas, se recubren con materiales encapsulantes, también llamados materiales pared (1, 2, 5).

1.2. Encapsulación

La encapsulación se ha definido como aquella tecnología utilizada para recubrir materiales (en fase sólida, líquida o gaseosa) en cápsulas con capacidad de liberar al agente activo bajo condiciones específicas. El estudio de la encapsulación se ha dirigido hacia la integración de tres etapas, la primera de ellas es el atrapamiento del agente activo en una fase continua formada por el material encapsulante; la segunda etapa, es la de mantener integro el agente activo dentro del recubrimiento; la tercera etapa es la liberación del agente activo, en un tiempo y sitio determinado (6). Como término genérico a la partícula obtenida de un proceso de encapsulación se le denomina cápsula y en su generalidad son de forma esférica, sin embargo, las cápsulas pueden ser irregulares (con profundas cavidades y hendiduras), elipsoides, tubulares, fibras (filamentosa o en hilos) y hasta en forma de placas. En el caso de alimentos, se prefiere que estas cápsulas sean en forma esférica, lo cual facilita su manejo, la integración a diversas matrices y la liberación del compuesto bioactivo (6, 7).

La encapsulación de compuestos activos o bioactivos puede llevarse a cabo por diversos propósitos, entre los que se encuentran (5, 6, 8):

- a) Protección de la degradación de la funcionalidad del bioactivo provocada por los efectos adversos provocados por factores ambientales tales como luz, calor, humedad, oxígeno, agentes reactivos (álcalis, ácidos), etc.
- b) Mejorar el manejo del agente bioactivo, ya sea al convertirlo de su forma líquida a sólida, o mejorando sus propiedades de flujo o de rehidratación.
- c) Enmascarar sabores u olores desagradables.
- d) Establecer condiciones para la acción específica del bioactivo en sitios y tiempos específicos, a través de mecanismos de liberación controlada.
- e) La velocidad de transferencia del bioactivo desde el núcleo al exterior se reduce.

El compuesto bioactivo que queda recubierto, también se le conoce como núcleo, ingredientes, sustrato o relleno. El material encapsulante usado para el recubrimiento es denominado pared, envoltura, membrana, soporte capa, es la capa externa o capas que cubren el material del núcleo (9). La selección del material encapsulante y de las técnicas a utilizar, se realiza en función al uso final que

se le dará al material encapsulado. Para garantizar el mejor aprovechamiento y uso del agente encapsulado, es necesario considerar la etapa de liberación del agente bioactivo, la cual puede diseñarse para llevarse a cabo en sitios y tiempos específicos.

Entre los materiales más comúnmente utilizados para encapsular se encuentran (5,8, 9, 10, 11, 12): *Carbohidratos y sus derivados*: Jarabe de maíz, dextrinas (maltodextrinas, ciclodextrinas (alfa, beta y gama)), almidones modificados, inulinas, fructanos, sacarosa, alginatos (polisacárido aniónico), pectinas (heteropolisacáridos), gomas (algarrobo, gelana, guar, arábica, mezquite), carrageninas, mucílago (chía, opuntias).

Ceras, lípidos y grasa: fosfolípidos, parafinas, glicerina, ceras, ácido esteárico, cera de abeja, diglicéridos.

Celulosas: carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa. *Proteínas*: caseinatos, gluten, zeinas, albúmina, proteína de suero de leche, aislado de soya, hidrolizado de soya, gelatina, colágeno, hemoglobina, péptidos.

Otros polímeros: Polietilen glicol (PEG), polímeros fenólicos, polímeros sintéticos (alcohol polivinílico, polivinil, poliestirenos, poliamidas, poliuretanos, poliacrilatos, polietilenglicol, poliacrilamida).

Materiales inorgánicos: sulfato de calcio, arcilla, zeolitas, silicatos.

Los materiales pared son utilizados en forma individual o en mezclas, lo que impartirá propiedades específicas al producto final. Una de las principales propiedades que deben cumplir los materiales encapsulantes es no mezclarse o reaccionar con el agente bioactivo, cuando son puestos en contacto. Estos generalmente se encuentran en forma líquida cuando son aplicados y posteriormente se solidifican para dar lugar a la cápsula, ya sea por evaporación de disolventes, gelificación, congelación o por reacciones químicas. La selección de estos materiales dependerá del uso final del encapsulado, debiéndose tener en consideración características específicas como, facilidad para fluir en condiciones de alta concentración, alta capacidad emulsificante o dispersante, la no reactividad de éstos con el agente bioactivo, el sitio de liberación requerido, la matriz en la cual se depositará la cápsula, las condiciones ambientales a las que se verá expuesta, la relación costo/beneficio y el método utilizado para encapsular, entre otras. Los materiales pared, además de conservar, debe permitir la completa liberación del compuesto bioactivo, prefiriéndose los agentes que sean más económicos y de grado alimenticio (7,8).

La encapsulación puede realizarse utilizando diferentes procesos, los cuales se han clasificado en proceso físicos (tres grupos) y en químicos (emulsiones/dispersión) (6) y cuales son:

Atomización (secado por aspersión, congelación por aspersión, hilado con disco, electro asperjado, corte del jet (jet cutting)).

Cubierta por aspejado (lecho fluidizado, cubiertas con bombos, granulación).

Coextrusión (boquilla estacionaria, boquilla centrífuga, boquilla sumergida, microfluidización, asperjado electrohidrodinámico, extrusión).

Emulsiones (emulsión, coacervación (simple y compleja), polimerización in situ, polimerización interfacial, evaporación del disolvente, liposomas), inclusión molecular, gelación iónica.

Una característica importante de las cápsulas es su tamaño y su distribución. Estas pueden variar desde nanómetros hasta varios micrómetros, lo cual depende del método de encapsulación utilizado (Cuadro 1), siendo los intervalos para su clasificación: a) las nanocápsulas presentan por lo menos una dimensión dentro del orden de los nanómetros, tamaños menores a 0.2 μm ; b) las microcápsulas pueden variar desde 0.2 μm a 5000 μm ; c) macrocápsulas con tamaños mayores a las 5000 μm (6, 7, 9). El tamaño promedio de partícula y el índice de polidispersidad puede medirse por medio de diversas técnicas, entre ellos dispersión dinámica de la luz (DLS), análisis digital de imágenes (ADI) adquiridas mediante microscopía (óptica, electrónica de barrido y de transmisión); tamizado y sedimentación por gravedad (5). Estas partículas pueden desarrollar formas diversas y dependiendo de la distribución de los componentes se tienen cápsulas del tipo mononuclear (core-shell), polinuclear, tipo matriz, combinada (matriz cubierta), entre otras formas (Figura 1). Tanto la identificación de la forma como la distribución de componentes pueden evaluarse a través análisis digital de imágenes (ADI). Las imágenes pueden adquirirse mediante técnicas de microscopía, utilizando microscopio óptico, microscopio de barrido láser y microscopio confocal de barrido láser (13).

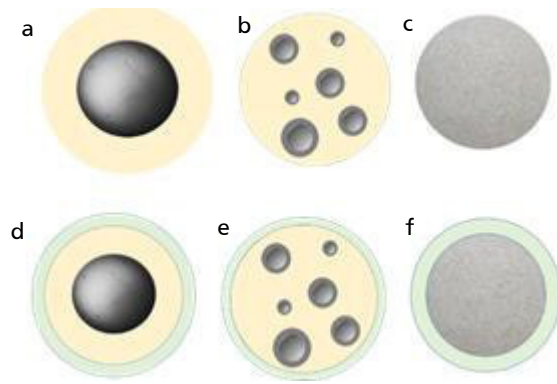


Figura 1. Esquema de diferentes tipos de cápsulas dado por la distribución del agente activo y material pared a) tipo "core-shell", agente activo en un núcleo ("core") único y recubierto ("shell") por el material pared; b) agente activo en multinúcleos dispersos en la fase continua de recubrimiento; c) cápsula tipo matriz, con el agente activo distribuido en el material pared; d), e) y f) recubiertos por otra capa de material pared

2. Métodos de encapsulación de compuestos bioactivos

2.1. Métodos de emulsificación

La encapsulación de compuestos bioactivos por emulsificación representa una alternativa viable para incrementar su biodisponibilidad, su solubilidad en medios acuosos y su estabilidad tanto en la producción de alimentos como en su almacenamiento. Esta técnica ha sido empleada con éxito en la industria farmacéutica y cosmética en la elaboración de productos con mejores características de estabilidad, distribución y liberación de compuestos bioactivos. La selección de la técnica de emulsificación, los emulsificantes y surfactantes pueden ajustarse a las características buscadas en la emulsión, favoreciendo el incremento de la estabilidad del compuesto bioactivo encapsulado.

Una emulsión se define como el sistema disperso integrados por dos líquidos inmiscibles. Uno de los líquidos (fase dispersa) se encuentra disperso en el otro (fase continua) en forma de pequeñas gotas suspendidas. Existen varias clases de emulsiones entre las cuales se distinguen las de agua en aceite (W/O), de aceite en agua (O/W) y emulsiones múltiples de agua en aceite en agua (W/O/W) o de aceite en agua en aceite (O/W/O)(14).

Actualmente, existe un incremento en el uso de emulsiones como método de encapsulación y liberación de compuestos bioactivos. La incorporación de compuestos bioactivos con baja o nula solubilidad en medios acuosos en las gotas de la emulsión, permite mejorar su solubilidad, incrementar su biodisponibilidad durante el paso gastrointestinal e incrementar su estabilidad en alimentos y/o en su almacenamiento (15). A partir del tamaño de gota, las emulsiones se han clasificado en: micro (10-100 nm), nano o mini (100-1000 nm) y macro emulsiones (0.5 – 100 μm) (16). El conocimiento de la distribución de tamaño de las gotas y sus posibles cambios, brinda información de la eficiencia del proceso de encapsulación por emulsificación, así como su estabilidad (17). Los compuestos bioactivos encapsulados por emulsificación deben ser estables desde el momento de su preparación, lo que permitirá mantener sus propiedades al momento de integrarlos en alguna matriz alimentaria o durante su almacenamiento por largos períodos de tiempo. La estabilidad de una emulsión describe su habilidad para resistir cambios en sus propiedades a través del tiempo (16). Durante su almacenamiento, las emulsiones pueden presentar fenómenos de inestabilidad, provocando el rompimiento de la emulsión y la separación de sus fases. Entre los principales fenómenos de inestabilidad presentes en las emulsiones, se encuentran la sedimentación, formación de nata, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald (14,16). Para asegurar la estabilidad de estos compuestos en las emulsiones, se necesita la determinación y control de las propiedades de las emulsiones como el tamaño de gota, viscosidad, turbidez, entre otras. Dependiendo de los materiales y proceso de elaboración empleados, los compuestos bioactivos encapsulados se pueden localizar en diferentes regiones de la emulsión, ya sea atrapado en la fase oleosa o situarse en la interfase de la emulsión. Por lo anterior, es importante el estudio y conocimiento de la localización del agente bioactivo y su influencia en la estabilidad, liberación y

biodisponibilidad (18). Debido a la inestabilidad natural de las emulsiones se necesita brindarles estabilidad mediante la incorporación de sustancias con propiedades emulsificantes y surfactantes, los cuales facilitan la deformación y la ruptura de las gotas por la disminución de la tensión en la interfase impidiendo la coalescencia o modificando la viscosidad de la fase continua, provocando una disminución en la velocidad de la separación por gravedad (19, 20, 21).

En la formación de emulsiones simples, las proteínas (del suero de leche, soya, gelatina) han sido ampliamente utilizadas en la protección contra la oxidación de aceites esenciales. Se ha demostrado que cuando se utilizan biopolímeros con propiedades tensoactivas, como la goma arábica o el almidón modificado, la estabilidad de la emulsión es mayor en comparación con las emulsiones producidas con surfactantes de tamaño molecular pequeño (ejemplo Tween 20) (16, 22). En últimas fechas, se ha incrementado la encapsulación por emulsificación con polímeros, principalmente en la industria farmacéutica, debido a su característica biodegradable, aunada a que funcionan como reserva de compuestos activos con liberación tanto inmediata como a largo plazo. Los polímeros permiten la modificación de propiedades fisicoquímicas (potencial z), propiedades de liberación del agente activo (liberación retardada) y comportamiento biológico específico (bio-adhesión). Ejemplos de estos polímeros son el poli-ácido láctico, poli-ácido glicólico (23, 24). Se han empleado materiales con capacidad emulsificante en la encapsulación de compuestos bioactivos liposolubles en sistemas de emulsiones simples o múltiples, algunos ejemplos de materiales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales empleados como emulsificantes y/o surfactantes en emulsiones

Emulsificador/ Surfactante	Tamaño de gota (nm)	Relación (compuesto-aceite)	Referencia
Goma arábica	384	1:2.5	(25)
Tween 80	<50	3:1	(26)
Rhamnolípidos	<150	1:10	(27)
Poli-ácido láctico	468	-	(28)
Pectina de alto metoxilo	< 50	1:2	(26)
Proteína de suero de leche/lecitina	150	1:9	(29)

Muchos de los compuestos bioactivos encapsulados por emulsificación son liposolubles, por lo que se necesita una fase lipídica o aceite que funcione como acarreador del bioactivo, el cual necesita ser previamente dispersado en el medio antes del proceso de emulsificación. Para llegar a formar la emulsión, se necesita el aporte de energía al sistema para aumentar la superficie de contacto entre las dos fases, vencer la tensión en la interfase y permitir la dispersión de uno de los fluidos en el otro. La energía a aportar al sistema depende de muchos factores, entre ellos se encuentran: la tensión superficial y la diferencia de densidad entre las fases, tipo de agitador, viscosidad de la fase continua, etc. (22). Los métodos de emulsificación pueden ser clasificados en métodos de baja y alta energía. En los métodos de baja energía, las emulsiones se forman debido a la transición de las fases durante el proceso de emulsificación debido a la alteración en alguna de sus condiciones de procesamiento (temperatura o composición). Los métodos de alta energía transforman los líquidos en pequeñas gotas empleando dispositivos mecánicos (30).

2.1.1. Métodos de emulsificación de baja energía

Estos métodos emplean la energía química interna del sistema para la producción de la emulsión. Estos métodos son más económicos que los métodos de alta energía, sin embargo, poseen limitaciones como el requerir grandes cantidades de surfactantes, una selección cuidadosa de la combinación de surfactante-cosurfactante, además de no ser aplicado en producciones industriales a escala grande (19).

Algunos de los métodos de baja energía más utilizados son los siguientes:

- a) Métodos de emulsificación espontánea. Involucran la formación espontánea de la emulsión a través de la difusión rápida del surfactante y/o disolvente de la fase dispersa a la fase continua propiciado por la energía química liberada durante el proceso de dilución. Las diluciones pueden realizarse con la adición al agua de una fase orgánica que contenga la fase oleosa, un surfactante hidrofílico y un disolvente miscible en agua (31).

- b) Métodos de inversión de fase. Consisten en la inducción de la inversión de fase de un sistema agua en aceite a su forma de aceite en agua o viceversa a través del cambio de temperatura (métodos de temperatura de inversión de fase) o del cambio de composición (métodos de composición de inversión de fase) (32).

2.1.1.1. Métodos de emulsificación de alta energía

Los métodos de alta energía consisten en la aplicación en una fuerza intensa de ruptura sobre la muestra. En este proceso, la ruptura de las gotas y la coalescencia de las mismas ocurren de forma simultánea, pese a ser procesos contrarios. Los tamaños de gota obtenidos dependen de factores como el diseño del equipo, las condiciones de operación (temperatura, presión, etc.), condiciones de proceso (temperatura), composición y propiedades fisicoquímicas de la mezcla (18). Los métodos de alta energía se aplican en operaciones industriales debido a que existe un control flexible del tamaño de gota y su habilidad para producir emulsiones finas a partir de una gran cantidad de materiales (33). A continuación, se presentan ejemplos de estos métodos:

- a) Ultrasonido. El sonido es un patrón de propagación de turbulencias y fluctuaciones de presión que generan la ruptura de la fase dispersa en el medio circulante en forma de pequeñas gotas. Se emplea el ultrasonido en intervalos de 16 a 100 kHz, en procesos continuos o por lote (34).
- b) Sistemas de rotor/estator. Se fundamenta en el principio de la generación de una fuerza de cizalla alta, reduciendo el diámetro de las gotas en la fase dispersa. Esta técnica se utiliza para líquidos de viscosidad media a alta (33).
- c) Sistemas de alta presión (> 200 MPa). Consisten de un generador de alta presión ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones elevadas. En cualquier tipo de válvula de homogeneización, el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula y luego se expande (35).
- d) Microfluidización. Es un método de emulsificación que consiste en el flujo de un sistema líquido-líquido a presión a través de microcanales. Las fuerzas de emulsificación generadas por esta técnica incluyen una fuerza de cizalla alta (flujo laminar), turbulencia (flujo inercial) y cavitación (implosión de burbujas de vapor), estas actúan junto a las fuerzas mecánicas para reducir el tamaño de micela en la fase dispersa. Las presiones de operación en la microfluidización pueden ir de 3.4 MPa/500 psi hasta 275 MPa/40, 000 psi. (16,33). En la Tabla 2 se observan ejemplos de compuestos bioactivos encapsulados por diferentes métodos de emulsificación.

2.1.2. Aplicaciones de los compuestos bioactivos encapsulados por emulsificación

En los últimos años se ha incrementado la demanda de compuestos bioactivos con función biológica como ayuda en la prevención de enfermedades y mejora de la salud. Muchos de estos compuestos han sido incorporados en matrices alimentarias, tanto acuosas como de origen oleoso. Entre los compuestos bioactivos de mayor relevancia se encuentran, flavonoides, fenoles, carotenoides, entre otros mencionados en la sección 1.1 de este capítulo.

En la búsqueda de un mejor aprovechamiento de estos compuestos bioactivos, se ha reportado que la encapsulación por emulsión incrementa la biodisponibilidad de éstos, la investigación de los beneficios de estas emulsiones en su incorporación en alimentos y después de su consumo aún sigue en estudio. Las emulsiones, en específico las del tipo O/W representan una excelente herramienta para la distribución de compuestos bioactivos lipofílicos, incrementando su estabilidad química, liberación y actividad biológica del compuesto. Las principales aplicaciones de las emulsiones con compuestos activos han sido desarrolladas por la industria farmacéutica, donde se han creado emulsiones que facilitan la distribución de fármacos de solubilidad limitada y se ha observado una mejora en la biodisponibilidad. En la industria de alimentos la implementación de las emulsiones se ha enfocado en compuestos bioactivos con solubilidad nula o limitada en sistemas acuosos, además su empleo representa un método eficiente para incrementar la estabilidad física de los bioactivos, protegerlos de condiciones ambientales, disminuir su volatilidad y toxicidad e incluso, administrar su liberación (41).

Tabla 2. Ejemplos de compuestos bioactivos encapsulados por diferentes métodos de emulsificación

Método de emulsificación	Compuesto bioactivo - emulsificante/ Surfactante	Características de la emulsión	Ref.
Microfluidización	β -caroteno – Goma arábica	Emulsiones con alta concentración de goma arábica permanecen estables por 60 días.	(22)
Rotor/estator	Lycopeno – Aislado proteico de suero de leche	Emulsiones con formulación óptima fueron estables a tratamientos térmicos y cambios de pH	(36)
Ultrasonido	Aceites comerciales de girasol, aceite, canola, oliva. – Tween 80	Las emulsiones fueron aplicadas sobre filetes de pescado como conservador, incrementando su vida comercial.	(37)
Altas presiones	α -tocoferol – Tween 80	Las emulsiones con tamaños de gota menores a 90 nm incrementaron la biodisponibilidad del compuesto bioactivo	(38)
Emulsión espontánea	Cinamaldehído - Quitosano	Las emulsiones permitieron la elaboración de biopelículas de quitosán uniformes y lisas	(39)
Inversión de fase	Glucocorticoide – Estereato de polioxietileno	Mejora en la liberación del agente bioactivo	(40)

2.2. Encapsulación por gelación iónotrópica

En los últimos años hubo un incremento en la demanda de productos de calidad basados en fuentes naturales, lo que impulsó el desarrollo de nuevos métodos de producción (verdes, libres de solventes), conservación y almacenamiento (1, 42, 43), sumados a una creciente necesidad de conservar el medio ambiente y mejorar el manejo de los residuos.

Entre las técnicas de encapsulación, existe una que por su simplicidad de equipamiento y condiciones de síntesis suaves sobresale sobre otras: la gelación iónotrópica. Para ello se utilizan polímeros como el alginato y la pectina, que son no tóxicos, biodegradables y biocompatibles (44, 45) y que son ampliamente utilizados en encapsulación debido a su capacidad de formar geles en presencia de algunos cationes di- y trivalentes (46,47). Estas estructuras son un gel (similares en aspecto a los de gelatina), que son arreglos tridimensionales que forman redes interconectadas capaces de soportar muchísima agua en su interior, así como los compuestos encapsulados de interés.

La Figura 2 muestra cápsulas que contienen encapsulado un extracto rico en antioxidantes y colorantes extraído de residuos de tallos (Figura 2B) y hojas (Figura 2C) de remolacha (Figura 2A). La Figura muestra el extracto posterior obtenido por maceración en agua luego de triturar el material vegetal (Figura 2D), la formación de cápsulas (Figuras 2E y 2F), las cápsulas producidas a partir de ambos residuos (Figuras 2G y 2 H) y detalles de la estructura tridimensional del gel en forma esquemática, representando el gel (Figura 2I) y el arreglo supramolecular del biopolímero gelado (Figura 2J).

Este tipo de sistema de encapsulación permite su escalado según las necesidades de la industria en cuestión, proveyendo una solución adaptable a cada necesidad. El mismo tiene varias particularidades: el sistema no requiere inversiones iniciales onerosas; es posible realizar lotes de diferentes tamaños; el sistema de inyección es variable, desde inyección manual hasta automatizada; pueden utilizarse distintos diámetros de boquillas obteniendo distintos tamaños de cápsulas resultantes, que será seleccionado de acuerdo al producto deseado. La Figura 3 muestra un ejemplo de producción en baja escala, con la utilización de una bomba peristáltica como sistema de inyección, utilizando una aguja de 0.25 mm de diámetro y 6 mm de largo.

Estructuralmente, el alginato de sodio es una cadena muy larga formada por dos unidades de azúcar repetidas (llamadas residuos M y G a modo simplificado) unidas entre sí. La cadena presenta zonas ricas en residuos M o G, y zonas mixtas de dímeros MG. Dependiendo de cuál sea la proporción M/G, se producen variaciones en la organización y estabilidad en los geles producidos (46) dado que mayoritariamente son los residuos G los que se ven involucrados en la formación del gel. Por otro lado, se pueden generar micro o macrocápsulas dependiendo del método de preparación empleado. Macrocápsulas de tamaño mayor que 1 mm de diámetro se pueden generar de un modo sencillo utilizando una jeringa y una aguja o pipeta, o empleando una bomba peristáltica (48-52), como la mostrada en la Figura 2e. Para ello, se realiza un goteo de la solución del polímero en presencia de la

biomolécula de interés aislada previamente del residuo sobre una solución de cloruro de calcio en agitación continua, obteniendo estructuras esféricas (53). El tamaño de la cápsula puede regularse ajustando la viscosidad de flujo y el diámetro de la aguja.

2.2.1. Mecanismo de gelificación y estructura del gel

El mecanismo de gelificación (químicamente es una transición sol-gel) para el alginato de calcio se inicia a partir de la formación de dímeros interconectados por uniones tipo "caja de huevo" o "egg-box" (de su nombre en inglés): las cadenas del biopolímero ricas en zonas G se disponen en forma paralela y simétrica, formando cavidades cargadas negativamente, que son coordinadas por el catión (54), como se muestra en la Figura 2J. Estas unidades básicas se autoensamblan determinando un sol particulado con forma de varilla o *rod*, que comienza a interconectarse hasta percolar, generando el hidrogel (Figuras 3I y 3J). Estas estructuras dependen tanto del alginato utilizado (especialmente de la relación M/G), así como de su concentración y la del catión entrecruzante y también del tipo de catión (si bien para alimentos solo se utiliza calcio) (55).

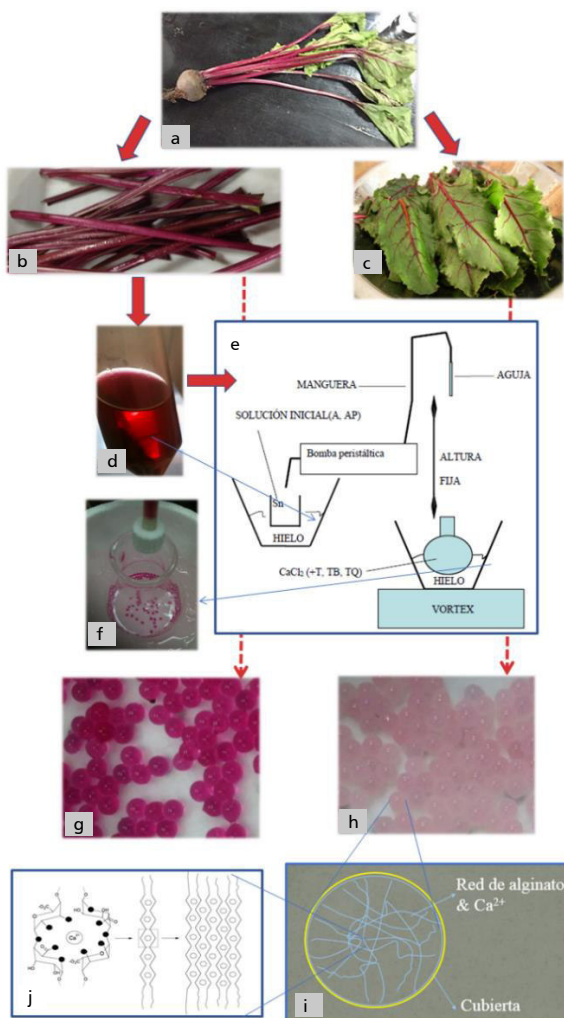


Figura 2. Detalle de la producción de las cápsulas de Ca(II)-alginato desde dos residuos de remolacha. A. Remolacha; B y C. residuo de tallos y hojas de remolacha. D. extracto acuoso de tallo. E y F. Esquema del dispositivo usado para la formación de cápsulas e imagen de una sección del; G y H. cápsulas producidas a partir de ambos residuos. I. detalle en forma de esquema de la estructura tridimensional del gel; J. arreglo supramolecular del alginato de sodio interactuando con el Ca²⁺ y entre sí

La estructura del gel determina en parte el comportamiento que tendrá el sistema a la hora de estudiar la estabilidad y la liberación del compuesto encapsulado, así como sus propiedades mecánicas (52). Existen estudios en los que participaron algunos de los autores de este trabajo en los que se demostró que la utilización de cápsulas de Ca(II)-alginato (suplementadas con otros biopolímeros y azúcares) resultaron una excelente alternativa de protección y vehiculización de distintas biomoléculas tales como: antioxidantes y colorantes naturales (licopeno, extraído de pulpa de pomelo rosado (56,57) y betacianina y polifenoles, extraídos de tallos y hojas de remolacha (63), ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (aceite de pescado) (50) y enzimas de interés industrial (invertasa y lactasa) (48-51). De este modo, se cuenta con un producto que puede incluirse en distintos tipos de alimentos, enriqueciéndolo desde el punto de vista nutricional y funcional, lo que se ajusta a las necesidades y demandas actuales del mercado argentino y mundial.

Otros de los aspectos clave de este sistema es la capacidad que tienen estas estructuras en modular la liberación. Los compuestos encapsulados en matrices de alginato generalmente se liberan mediante alguno (o varios) de estos mecanismos: i) difusión por los poros de la red; ii) degradación de la red del polímero; iii) relajación de las cadenas del polímero (48). Se observó que la difusión de moléculas pequeñas e hidrofílicas (similares al agua) como la glucosa, el etanol, etc. desde las cápsulas no es afectada por la red de alginato, mientras que la difusión de moléculas de mayor tamaño o hidrofóbicas (más similares a un aceite, y que deben ser introducidas a partir de una emulsión previa) sí son dependiente de su microestructura, afectada a su vez por el peso molecular del polímero, así como la relación entre residuos M/G (53). Estudios realizados empacando cápsulas de Ca (II)-alginato en una columna y permitiendo pasar estándares de peso molecular conocidos a través de ella mostraron que el valor máximo de poro en cápsulas secas está alrededor de 12-16 nm (59), que es mucho menor que el obtenido por microscopía electrónica (entre 5 y 200 nm (60) o entre 30 y 100 nm (48), dependiendo del tipo de secado). Esta diferencia sugiere que los poros de la superficie (observados por SEM) y el centro de la cápsula no son iguales. Estas inhomogeneidades son producto del gradiente de concentración de Ca^{2+} que se establece durante la síntesis de las cápsulas, y puede observarse en las distintas escalas, desde la macroporosidad hasta la microestructura -en nm- (61). Si bien esto es un detalle estructural, es importante señalar que influenciará el comportamiento de la liberación del compuesto encapsulado. A la hora de formular un producto conteniendo cápsulas, el pH del medio, el contenido de agua, estado de las cápsulas (si húmedas o secas) y la presencia de otros compuestos que pueden ser utilizados en su formulación impactarán en cuánto del compuesto encapsulado será liberado al medio (48, 56, 57).

2.2.2. Uso de geles en la industria

Existen algunos ejemplos de la utilización en estos geles en alimentos. La gastronomía molecular (la alianza de la gastronomía con el mundo científico) fue quien se encargó de difundir este tipo de estructuras gelificadas en una cuestión refinada y de alto valor comercial, con alimentos como el caviar molecular, la esfera de mojito carbonatado, las perlas esféricas con esencias de flores y el yogurt, la muzzarella o las aceitunas esféricas, o incluso con otros productos producidos a partir de desechos de la industria láctea -suero de leche- (62). Estos geles tienen tamaños mucho mayores al de las esferas mostradas en la Figura 3G. Esto se debe a que la mayoría de éstos son ejemplos de gelación inversa (la solución que contiene el principio de interés se mezcla con el cloruro de calcio y eso se lleva a un baño con alginato de sodio). La posibilidad de consumir directamente a este tipo de esferificaciones o de incluir las cápsulas, de tamaño variable, en distintos productos de base láctea, como yogures, helados, quesos crema y quesos blandos ofrece la posibilidad de contar con productos innovadores que además modifican el aspecto, el contenido nutricional, pudiendo además aportar una liberación intensa de sabor y proteger compuestos sensibles a tratamientos térmicos u desestabilización mecánica.

A través de esta técnica, de fácil acceso y ejecución, es posible generar estructuras que aumenten la conservación de compuestos bioactivos obtenidos de recursos vegetales autóctonos subvalorados y/o subproductos agroindustriales frente distintos tipos de estreses que podrían degradarlos, permitiendo dosificar los compuestos encapsulados, simplificando su agregado, aumentando la novedad en la presentación del producto y con características de liberación controlada (pH, tiempo, grado de hidratación, entre otros).

2.3. Encapsulación en ciclodextrinas (CDs)

Las CDs son oligosacáridos cíclicos, obtenidos industrialmente por acción enzimática sobre el almidón, que contienen seis (α -CD), siete (β -CD), u ocho (γ -CD) unidades de glucopiranososa. Pueden formar complejos con una amplia gama de compuestos gracias a su estructura especial de cono truncado, con el exterior hidrofílico y una cavidad interior lipofílica (Figura 3). Esta característica les permite encapsular total o parcialmente, moléculas de diferentes geometrías y tamaños (63,64,65). Es importante resaltar, que estos complejos de inclusión se establecen por uniones no covalentes, dando lugar a un sistema en equilibrio, en el que el ligando se libera lentamente al medio a medida que se consume o utiliza para mantener dicho equilibrio. La estabilidad de los complejos formados puede variar con la humedad ambiente y la temperatura (66,67).

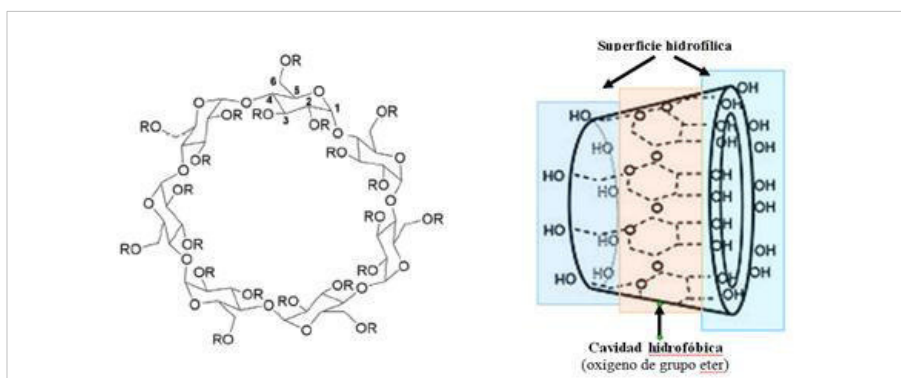


Figura 3. Representación de la estructura química y espacial de β -ciclodextrina

2.3.1. Estado regulatorio de las CDs

El estado regulatorio de las CDs en alimentos difiere entre países. En los Estados Unidos, los CDs, β y γ han sido aprobadas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras). En Japón, las CDs, β y γ se consideran productos naturales (68). En Europa, la β -ciclodextrina (BCD) está permitida en un número limitado de productos (chicle, papa, cereal, harina o bocadillos a base de almidón y en bebidas con sabor a base de agua; <1 g/kg); la α -CD se clasifica como Alimento Nuevo desde febrero de 2007. En China, se permite el uso de β -CD como agente espesante en la goma de mascar (≤ 20.0 g / kg), productos a base de arroz o harina, productos cárnicos (≤ 1.0 g / kg), bebidas y alimentos extrudados (≤ 0.5 g/kg). Las CDs β y γ se permiten en varios tipos de alimentos sin límite de uso. Entre los derivados de CD, la hidroxipropil- β -CD (HPBCD), hidroxipropil- γ -CD, metil- β -CD y sulfobutiléter- β -CD están aprobados como excipientes de medicamentos, pero aún no se han reconocido como ingredientes alimentarios (68). En Argentina, la BCD fue aprobada como aditivo, coadyuvante tecnológico y agente complejante de colesterol; en la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) existen también resoluciones particulares de medicamentos autorizados que poseen en su formulación diferentes CDs modificadas (sulfobutiléter- β -CD, HPBCD, metil- β -CD).

2.3.2. CDs como método de extracción y estabilización de compuestos naturales

La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes vegetales, es una etapa importante en la fabricación de productos enriquecidos con compuestos naturales. Se sabe que los vegetales pueden contener gran cantidad de compuestos activos, siendo sus efectos generalmente atribuidos a interacciones sinérgicas de varios componentes (69). Por lo tanto, maximizar la recuperación de estos compuestos a partir del tejido vegetal es clave para asegurar el efecto buscado (70). Si bien la extracción en agua por cocción ha sido usada tradicionalmente, el proceso es largo, muchos compuestos pierden su actividad y sólo se extraen trazas de compuestos hidrofóbicos. El uso de disolventes orgánicos, como etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, cloroformo, permiten aumentar el rendimiento y composición química de los extractos, sin embargo, su uso ha sido cuestionado ya que están asociados con problemas toxicológicos, contaminación del medio ambiente y son relativamente costosos. Esto hace indispensable la búsqueda de nuevos aditivos/solventes de extracción y el desarrollo de procedimientos seguros y no contaminantes.

Estudios recientes muestran que la encapsulación en ciclodextrinas permitiría mejorar la eficiencia de extracción de compuestos naturales del tejido vegetal, mejorando su solubilidad, estabilidad y/o biodisponibilidad (63,70,71). Su baja toxicidad y biocompatibilidad las hace especialmente atractivas para su uso como aditivos (72).

Distintos autores encontraron que la extracción de compuestos fenólicos de vegetales con soluciones acuosas de CD, resulta un método eficiente, económico y amigable con el medio ambiente (64,73). El uso de soluciones acuosas de CD como solvente surge como un método seguro, que permitiría la extracción simultánea de compuestos tanto hidrofílicos (solución acuosa) como hidrofóbicos (mediante inclusión en la cavidad de la CD) a partir de tejidos. La CD favorece principalmente la extracción de compuestos no polares, como muchos polifenoles y pigmentos, mediante la formación de complejos de inclusión. El uso de CDs como solvente abre la posibilidad de un aprovechamiento más eficiente de residuos y fuente vegetales no aprovechadas.

Además de la necesidad de optimizar la extracción de compuestos activos de fuentes vegetales, resulta indispensable para su posterior aplicación estabilizar dichos componentes durante el procesado y almacenamiento. En particular, la estabilidad es un parámetro crítico a considerar cuando se utilizan antioxidantes y colorantes en los alimentos, ya que son sensibles al pH, actividad de agua, exposición a la luz (74). La conservación de biomoléculas lábiles constituye un desafío permanente en diferentes áreas como ciencia de alimentos, biología y farmacia (75, 76). En este sentido la encapsulación en CDs es una alternativa interesante para ayudar a solucionar estos problemas.

2.3.3. Factores que afectan la extracción en soluciones acuosas de CD

Distintos factores afectan el proceso de extracción asistida por CDs, como el tipo y concentración de CD, la temperatura, el tiempo y la técnica de extracción. Estudios realizados para extraer fitoquímicos de interés a partir de distintas fuentes naturales (orujo de uva y olivo, propóleo, frutos como granada, jujuba, entre otros) usando diferentes CDs (64,77-80), permitieron concluir que la BCD y HPBCD son las CDs más utilizadas para extraer polifenoles. La BCD se ha usado también con éxito para extraer ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido trans-cinámico y resveratrol de cultivares de brotes de vid (81), derivados de luteolina, apigenina, rutina y oleuropeína de hoja de olivo (82), epigalocatequina y epicatequina de hojas de té (83). Se logró también una extracción selectiva de flavonoides a partir de alfalfa utilizando HPBCD (84).

Cuando se extraen compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales o residuos se hace difícil definir la cantidad de CD necesaria ya que no se conoce en general el contenido total del compuesto de interés en la matriz vegetal. Por lo tanto, la cantidad adecuada de CD solo puede determinarse indirectamente investigando el efecto de la concentración de CD sobre la eficiencia de extracción. En general, a mayores concentraciones de ciclodextrina se extrae mayor proporción del compuesto activo. Ratnasooriya y Rupasinghe(64) informaron que la recuperación de flavonoides y compuestos fenólicos totales a partir de orujo de uva aumentó al aumentar la concentración de BCD hasta 25 g/L, mayores concentraciones no afectaron la recuperación de compuestos fenólicos, excepto los flavonoides. Gao y col.(70) estudiaron el efecto de la concentración de HPBCD (10, 30, 50, 70, 100, 150, 180 y 200 g/L) en la eficiencia de extracción de cuatro compuestos fenólicos de la hierba *P. cuspidatum*. Observaron que los rendimientos de extracción de polidatina y resveratrol aumentaron inicialmente cuando la concentración de HPBCD aumentó de 10 a 50 g/L y luego se alcanzó un *plateau* a mayores concentraciones de la CD.

La extracción o recuperación de compuestos utilizando soluciones acuosas de CD como solvente también se ve afectada por la temperatura y el tiempo del proceso. Por un lado, un aumento en la temperatura de extracción aumenta la difusión molecular, y también disminuye la viscosidad y la tensión superficial de los solventes, lo que permite un mejor acceso o penetración en el tejido, mejorando así la eficiencia y tiempo de extracción (85, 86). Además, como la entalpía de inclusión en la CD es negativa, es más probable que la formación del complejo se favorezca a mayor temperatura (87). Los trabajos de dos Santos (78) y Maraulo y col. (77) muestran que la extracción de compuestos con capacidad antioxidante aumenta al aumentar tanto la concentración de BCD como la temperatura de extracción (Figura 4).

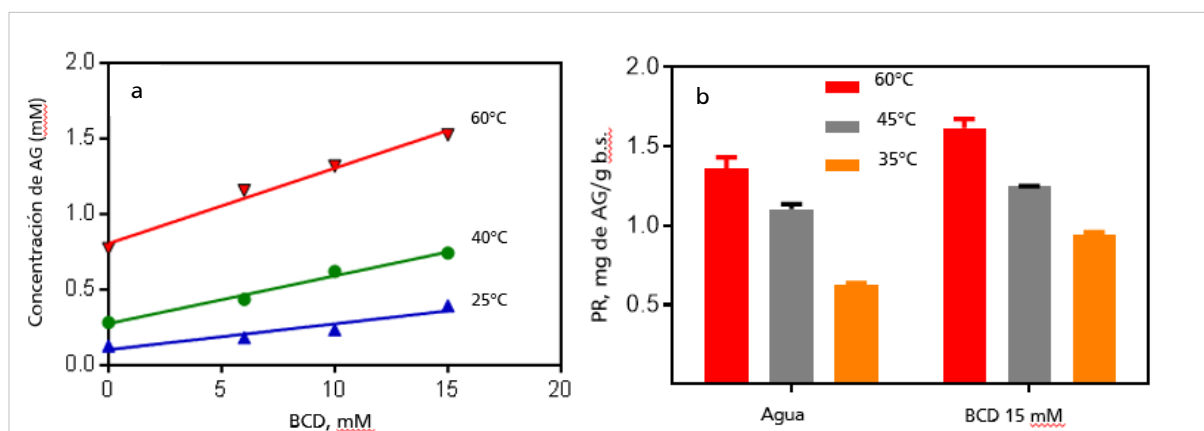


Figura 4. Efecto de las condiciones de extracción (temperatura y/o concentración de BCD) sobre la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de (a) propóleo (78) y (b) orujo de oliva (77). AG: equivalentes de ácido gálico, PR: poder reductor

Por otro lado, temperaturas altas y tiempos largos de extracción pueden promover la oxidación y degradación térmica de compuestos fenólicos u otros bioactivos de interés (88), y la descomposición de los complejos, que ocurre generalmente a partir de 50–60 °C (89). Por lo tanto, es muy importante seleccionar la temperatura/tiempo de extracción adecuados para mantener la estabilidad del activo y los complejos con BCD (71).

2.3.4. Técnicas verdes para favorecer la extracción de fitoquímicos

Otro aspecto clave en la extracción de fitoquímicos a partir de materiales vegetales usando ciclodextrina como disolvente es la selección de un método eficaz que mejore la afinidad de los compuestos por la CD, favorezca el equilibrio hacia la formación del complejo y maximice la extracción de los componentes activos del tejido. La extracción convencional por reflujo en caliente es sencilla, pero presenta bajos rendimientos y tiempos largos de extracción, la extracción empleando solventes orgánicos es eficiente, pero requiere sucesivas etapas, agitación y tiempos largos de proceso. La extracción asistida por ultrasonido (EU) o por microondas (EM), surge recientemente como un método "verde" para reducir los tiempos de extracción, evitar el uso de solventes orgánicos y mejorar la eficiencia de extracción respecto de los métodos tradicionales (70, 90). Se ha propuesto que la extracción por ultrasonido mejora la transferencia de masa y la penetración del disolvente en el material vegetal mediante la ruptura de las paredes celulares por efectos mecánicos de cavitación acústica, mientras que la radiación por microondas genera un calentamiento rápido que acelera el proceso de extracción, evitando el daño debido a largos tiempos de extracción (91). Estas técnicas serían por lo tanto opciones ideales para mejorar la eficiencia de extracción de componentes activos, las cuales se verían potenciadas utilizando soluciones acuosas de ciclodextrinas como solvente de extracción. Hasta el momento, hay pocos estudios que utilicen EU o EM combinadas con CD como estrategia para extraer compuestos naturales.

2.3.5. Ventajas de la extracción asistida por CD a partir de fuentes vegetales

El uso de soluciones acuosas de CD como solvente mejora la eficiencia de extracción, especialmente de compuestos fenólicos, y disminuye los tiempos de extracción. Este efecto se atribuye por un lado a que los compuestos se solubilizan al encapsularse en la CD, lo que aumenta la diferencia de concentración entre las células del tejido vegetal y el agua, aumentando la velocidad de disolución (83). Por otro lado, la formación de complejos de inclusión protege los compuestos de interés de la oxidación y degradación, lo cual ha sido demostrado en gran cantidad de trabajos (2,83,74). Otro beneficio de la extracción en CDs es que los extractos crudos resultantes exhiben mayores actividades antioxidantes. Esto se puede atribuir a la mayor eficiencia de extracción de polifenoles, y a la diversidad de compuestos ya que se extraen compuestos tanto polares como no polares incluidos en la cavidad de la CD (81). Finalmente, dado que la encapsulación en CD aumenta generalmente la estabilidad del compuesto encapsulado, enmascara sabores desagradables y mejora la biodisponibilidad, no es necesaria la eliminación de la CD luego de la

extracción. Además, la presencia de la CD en el extracto final favorece la preparación de extractos en polvo, de fácil solubilización y manejo durante el almacenamiento (84).

2.4. Encapsulación mediante secado por aspersión

El método de encapsulación más utilizado en la Industria Alimentaria, Biotecnológica y Farmacéutica es el secado por aspersión, debido a: su bajo costo de operación, la obtención de producto en polvo estables, altas eficiencias de encapsulación, proceso escalable, opera en forma continua, el producto obtenido es fácil de manejar y almacenar debido a su estabilidad (física, química y microbiológica) la cual se logra dado sus bajos valores de actividad de agua y de contenido de humedad (92).

2.4.1. Elementos y etapas básicas del secado por aspersión

La microencapsulación mediante secado por aspersión consiste en la conversión de una alimentación líquida que es bombeada hacia un dispositivo aspersor en el cual se atomiza para generar gotas finas, las cuales son transformadas a estado sólido (partícula o cápsula) al ponerlas en contacto directo con una corriente de gas caliente dentro de una cámara de secado, dando como resultado una rápida evaporación de la humedad, hasta casi su totalidad, llegando así al secado del material alimentado (93-94). En la Figura 5 se indican los componentes principales de un secador por aspersión y las etapas básicas de operación.

En secado por aspersión generalmente se produce cápsulas de forma esférica con una distribución definida en los tamaños de partícula, además de poseer tiempos cortos de secado, lo que beneficia la encapsulación de agente activos termosensibles. A pesar de la existencia de diferentes técnicas para la encapsulación, el secado por aspersión es el más común en el área de alimentos debido a que es un proceso económico, de amplia disponibilidad y produce cápsulas de buena calidad (94-96).

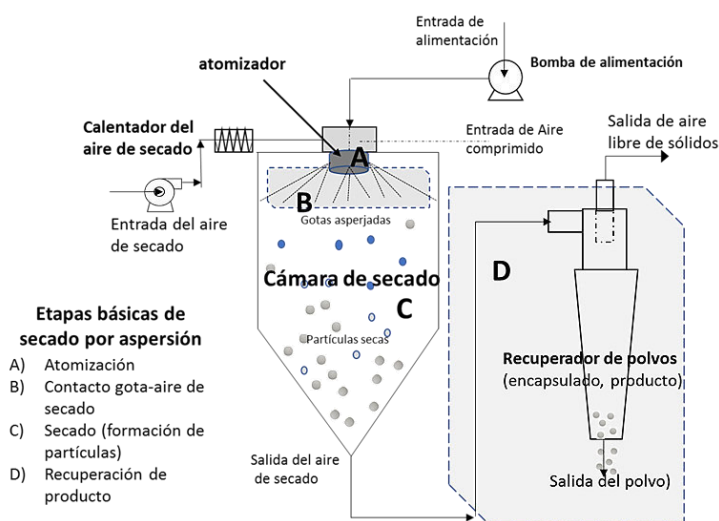


Figura 5. Esquema de un secador se aspersión simple en el que se muestran los componentes básicos y las etapas del proceso. Etapas: A) Atomización, B) Contacto gota-aire de secado, C) Secado, D) Recuperación de producto

Generalmente, el gas que se emplea para realizar el secado del material asperjado es aire caliente, pero en algunos casos pueden utilizarse gases inertes como el nitrógeno. El aire, puede ser calentado por contacto directo con resistencias eléctricas o por contacto indirecto utilizando gases de combustión o vapor sobrecalentado. La corriente del material alimentado al secador puede ser en forma de una solución, emulsión o suspensión, preferentemente en concentraciones de sólidos del 30 % para una mayor eficiencia de operación, sin embargo, esta concentración puede ser menor. Generalmente se utilizan bombas para su movimiento. Dado que el tiempo de contacto entre la gota y el aire caliente es corto (1 a 20 s), el daño que sufre el producto durante el secado es mínimo, lo que representa una

ventaja para el tratamiento de productos termolábiles al considerarse que durante esta etapa de secado ocurre un enfriamiento evaporativo y la superficie de la gota se mantiene a una temperatura cercana a la temperatura de bulbo húmedo correspondiente a la condiciones del aire de secado, eliminándose el mayor contenido de humedad (94, 95, 97).

Este método de encapsulación involucra cuatro etapas básicas:

1. *Dispersión/emulsión*. Este paso consiste en la formación de la dispersión o de la emulsión, según sea el caso, con la finalidad de poner en contacto en forma homogénea el agente activo con los materiales pared. Generalmente estos materiales requerirán ser previamente rehidratados. Una emulsión se forma con un agente de naturaleza lipídica, el cual se encontrará en forma dispersa en una fase continua de materiales pared. La homogeneización puede realizarse con diversos equipos como: dispersores de alta velocidad (tipo rotor-estator), sonicadores, dispersores de altas presiones (microfluidizadores) (8, 96, 97).
2. *Atomización*. Este paso consiste en asperjar la emulsión en forma de finas gotas (Figura 5A). Que generen la máxima superficie de transferencia de calor y masa durante el proceso de secado. A menor tamaño de gota, el área de contacto con el aire de secado será mayor y en consecuencia el tiempo de secado se reduce. La formación de las gotas, a su paso por un dispositivo atomizador, se da al someter la alimentación a fuerzas intensas de cizalla y/o elongación bajo un alto gradiente de velocidad dado entre el líquido asperjado y el aire de atomización que lo rodea (95, 96, 98). El tamaño de gota y su distribución dependerán de factores relacionados con la alimentación (concentración, composición, viscosidad, densidad y tensión superficial), con la presión de atomización y con el tipo de atomizador. Existe una amplia variedad de dispositivos de atomización, entre ellos.

Disco atomizador. Es un dispositivo centrífugo que consiste en un disco o rueda (50 a 300 mm de diámetro) con canales, que rota sobre su propio eje a alta velocidad centrífuga (5 000 a 60 000 rpm). La alimentación entra a este por la parte superior de su centro de rotación, y es impulsado en forma radial hacia el borde de este, al mismo tiempo que el disco gira, formando ángulos de aspersión mayores a 120. La alimentación sale por los canales en forma de hilos los cuales se rompen en gotas finas (9, 94,98).

Boquillas a presión. Están conformadas por dos dispositivos, uno que provoca turbulencia en el interior de la boquilla y otro con un orificio (0.4 a 4 mm de diámetro) para la alimentación del líquido. La alimentación se bombea a la boquilla a altas presiones que van de (5 a 50 MPa). La descarga de este se realiza en forma vertical a presiones de 180 a 220 bar, formando ángulos de aspersión de 40 a 60 . La capacidad puede llegar hasta 400 L/h, la cual puede aumentar al utilizar varias boquillas (98).

Boquillas neumáticas de doble fluido. Está conformada por un dispositivo para la entrada del líquido y otro para la entrada del aire a presión. Se crea un efecto Venturi y el líquido se convierte en una nube de gotas finas. La mezcla de ambos puede llevarse a cabo en el interior del cabezal (mezclado interno) o a la salida de este (mezclado externo). El líquido se rompe en gotas finas debido a la energía cinética y de fricción impartida por la corriente del aire a presión (1 a 3 kPa), formando un ángulo de atomización que puede ir de 20 a 60°. La capacidad de éstas puede alcanzar los 1000 l/h (98).

Boquilla ultrasónica. Se utiliza un generador sónico en el cabezal de la boquilla, que al paso del líquido lo rompen en gotas finas. Durante la atomización, el sistema de combustión dentro del atomizador calienta el aire de secado antes de que contacte a la alimentación en un ambiente de alta resonancia. El menor tamaño de gota se obtiene a menor caudal de alimentación ya que de esta forma se tiene mayor exposición a la energía acústica (6).

3. *Contacto aire caliente – gota*. Se lleva a cabo durante la atomización y con ella inicia el secado. De acuerdo a la posición del atomizador con respecto a la entrada del aire de secado se pueden presentar arreglos en co-corriente, contra-corriente o tipo mixto. La corriente del aire de secado se hace pasar a través de un filtro de aire para eliminar impurezas y posteriormente se calienta al pasar a través de sistemas que pueden ser eléctrico, vapor sobrecalentado o de combustión (6,98).

4. *Evaporación de la gota de agua.* El secado de la gota asperjada se lleva a cabo en dos etapas. La primera, denominada periodo de velocidad constante, la evaporación del agua libre presente en la superficie de la gota, la cual al reducirse genera mayor área de contacto, favoreciendo los mecanismos de transferencia de calor y masa, y en consecuencia se alcanzan mayores velocidades de secado. La temperatura de la gota desciende a la temperatura de bulbo húmedo del aire de secado y a medida que se evapora se produce un efecto de enfriamiento, previniendo la elevación de la temperatura del material en proceso de secado por arriba de la temperatura de bulbo húmedo del aire de secado (8,94). En la segunda etapa de secado denominada periodo de velocidad decreciente, el contenido de humedad disminuye de tal forma que no es suficiente para mantener las condiciones de saturación en la superficie de la gota asperjada, provocando que la sustancia disuelta en la solución saturada comience a depositarse como una fase sólida en la superficie de la gota. Así, las gotas se convierten en partículas con una cobertura sólida delgada en su superficie. Después de este punto, el espesor de la cobertura o coraza aumenta, lo que incrementa la resistencia a la difusión del vapor, del interior de ésta hacia el exterior, por lo que la velocidad de secado disminuye y se favorece el incremento de la temperatura de la partícula (8, 94, 97). La evaporación continúa hasta que la gota adquiere un contenido de humedad en equilibrio con el aire de secado. Las partículas obtenidas, después del secado de las gotas, pueden alcanzar tamaños que van de 30 a 120 μm .
5. *Separación del producto seco y el aire húmedo.* Esta operación se lleva a cabo a través de un sistema de recuperación de polvos, que generalmente puede ser uno de tipo ciclón mecánico ciclón el cual está conectado al secador. En un arreglo simple, las cápsulas más densas se recuperan en el fondo de la cámara de secado, mientras que las partículas más ligeras se capturan en el ciclón. Posteriormente el aire puede pasar a través de otro dispositivo para asegurar su limpieza antes de ser descargado a la atmósfera (94, 97).

2.4.2. Características generales de materiales pared

La selección de los materiales pared dependerá de su compatibilidad con el material bioactivo y de las características de calidad deseadas en el producto final. Se prefiere los materiales que presenten bajas viscosidades a altas concentraciones de sólidos; alta solubilidad; facilidad de manipular durante el proceso de encapsulación; alta capacidad estabilizante, dispersante o emulsificante; ser de bajo costo; permeabilidad al vapor de agua, gas, soluto o lípidos; se requiere que el encapsulado presente una matriz amorfa meta estable, resistente a las condiciones de almacenamiento. La liberación de los compuestos bioactivos se da bajo condiciones de temperatura y humedad relativa controladas (8, 9, 95).

Existen diferentes tipos de materiales encapsulantes que han sido utilizados en secado por aspersión, entre los que se encuentran los polisacáridos (almidones modificados, ciclodextrinas, maltodextrinas, jarabe de maíz y gomas), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, caseína, suero lácteo, soya y trigo), entre otros (9, 95).

Las características de algunos de ellos son:

Maltodextrina: Es uno de los materiales pared más empleado, obtenido de la hidrólisis del almidón. Es de bajo costo, sabor y aroma neutro, capacidad antioxidante siendo una barrera contra el oxígeno, aumenta la dispersabilidad y la solubilidad, proporciona estructura física a la cápsula, preferida por su capacidad para aumentar la temperatura de transición vítrea cuando se mezcla con jugos de frutas los cuales contienen alta concentración de azúcares. Su principal ventaja es su baja capacidad emulsificante, por lo que se prefiere su uso en combinación con algún hidrocoloide para aumentar la eficiencia de encapsulación (8).

Goma arábiga (Acacia): Es una fibra dietaria no digerible que confieren capacidad emulsificante, antioxidante y excelente estabilizan a las mezclas. Es una de las gomas más utilizadas en la formación de cápsulas, presenta alta solubilidad en agua y baja en disolventes orgánicos, produce emulsiones estables con la mayoría de los aceites en un amplio intervalo de pH, tiene capacidad para formar películas y de retener agua, aporta textura y presenta buenas propiedades sensoriales. En su estructura química llega a presentar de 2 a 3 % de proteína, lo cual es la responsable de su capacidad emulsificante. La principal ventaja de esta goma es su alto costo (8, 95).

Proteínas: Son polímeros de aminoácidos en formas fibrosas o globulares; presentan alta capacidad emulsificante, generan películas elásticas, generalmente biocompatibles, biodegradables, solubles en

agua, pero insolubles en medios ácidos y sensibles a precipitar a pH menor a 7.0. Entre las proteínas más utilizadas se encuentran las del suero lácteo, caseinatos y las de soya. El caseinato de sodio tiene mejores propiedades de encapsulación que la caseína micelar, debido a la conformación molecular, la alta difusividad, y las fuertes características anfífilas de las caseínas individuales. En el secado por aspersión, puede presentarse desnaturalización de proteínas globulares, cuando se combina el efecto de alta temperatura y actividad de agua de la gota. Los aislados de proteínas de suero y de soya, son eficientes en la encapsulación de compuestos volátiles, sin embargo, son inestables y sufren oscurecimiento enzimático durante su almacenamiento (7, 8, 95).

Almidones modificados: Los almidones modificados hidrofólicamente se utilizan como reemplazo de la goma arábiga, gelatina y pueden parcial o totalmente reemplazar a las caseínas. Actúan como compuestos tensioactivos, son altamente efectivos, consistentes, versátiles y económicos. En la encapsulación de vitaminas, generalmente se obtienen gotas muy finas (100 nm), que permiten que las microcápsulas se reconstituyan y formen bebidas transparentes (7,99). Ofrecen una alta carga de aceite, una alta retención volátil, una larga vida útil y alta eficiencia de fabricación (7).

2.4.3. Ejemplos de encapsulación mediante secado por aspersión

En Tabla 3 se presentan algunos ejemplos de encapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos y de extractos que en su composición presentan componentes con bioactividad, entre estos compuestos fenólicos, vitaminas y aceites conteniendo ácidos grasos. Estos materiales se han microencapsulado mediante secado por aspersión, utilizando materiales pared como maltodextrinas (10 DE, 20 DE), proteínas de origen vegetal (aislado de proteína de soya), proteína de origen animal (suero de leche, caseinato de sodio), almidón modificado, quitosano, alginato de sodio, goma arábiga, mucílago de nopal. Los materiales pared son utilizados solos o en mezclas. Estos y el agente bioactivo o en su caso el extracto conteniendo los componentes bioactivos.

Tabla 3. Ejemplos de compuestos bioactivos encapsulados mediante secado por aspersión

Compuesto Bioactivo	Materiales pared	Homogeneización	Condiciones de secado	Ref.
Licopeno de tomate	Maltodextrina, aislado de proteína de soya y almidón modificado (Capsul)	Rotor-estator Ultra-Turrax Ika T25 (IKA, Staufen, Germany) Condiciones: 10000 rpm durante 3 minutos	Equipo: Secador por aspersión de laboratorio, Büchi B-190 (Flawil, Suiza). Condiciones de operación: Temperatura de entrada: 160 ± 2°C Temperatura de salida: 80 ± 2°C Presión de atomización: 350 kPa	(100)
Vit. C y Vit.B12	Quitosano, quitosano modificado y alginato de sodio	Agitación magnética Condiciones: 12000 rpm por 2 horas	Equipo: Secador por aspersión de laboratorio, Büchi B-290 (Flawil, Suiza); equipado con una boquilla de 0.5 mm de diámetro. Condiciones de operación: Temperatura de entrada: 120°C Presión de atomización: 6 bar	(101)
Infusión de canela (compuestos fenólicos)	Maltodextrina (ED 10)	Agitación magnética Condiciones: 300 rpm por 1 hora a 25 C	Equipo: Secador por aspersión de laboratorio, Büchi B-290 (Flawil, Suiza); Condiciones de operación: Temperatura de entrada: 140, 160, 180°C Presión de atomización: 6.5 bar	(102)
Aceite de semilla de chía	Aislado de proteína de soya, maltodextrina 20 ED.	Dispensador rotor-estator (Ultra-Turrax T18, IKA, Germany), 15,500 rpm por 5 min. Microfluidizador (M-110Y, Microfluidics, Newton-MA, EUA), 104 MPa, 2 ciclos.	Equipo: Secador por aspersión nivel piloto (Mobile Minor™ 2000, GEA Niro, Denmark), con boquilla neumática de doble fluido en co-corriente. Condiciones de operación: Temperatura de entrada: 180 ± 5 °C Temperatura de salida: 80 ± 5 °C Presión de atomización: 0.6, 1.0 y 1.4 bar. Flujo de alimentación: 20–40 mL/min,	(103)

Tabla 3. Ejemplos de compuestos bioactivos encapsulados mediante secado por aspersión (cont.)

Compuesto Bioactivo	Materiales pared	Homogeneización	Condiciones de secado	Ref.
Oleoresina de paprika	Aislado de proteína de soya, maltodextrina 20 ED, goma arábiga	Dispersador (Ultra-Turrax Modelo T18, IKA, EUA). 11,000 rpm por 5 min.	Equipo: Secador por aspersión nivel piloto (Mobile Minor 2000, GEA Niro, Denmark). Boquilla neumática de doble fluido en co.corriente. Condiciones de operación: Temperatura de entrada: 150 C Temperatura de salida: 70 C	(104)
Extractos oleosos de hojas de aguacate	Goma arábiga y maltodextrina	Dispersador de alta velocidad (Ultra-Turrax, M45, EUA) a 11,000 rpm	Secador por Aspersión (Mobile MinorTM 2000, GEA Niro, Denmark), arreglo en paralelo. Condiciones de operación: Temperatura de entrada: 180 C Temperatura de salida: 80 C Presión de atomización: 1.0 bar. Flujo de alimentación: 20 mL/min	(105)

3. Conclusiones

El aprovechamiento de residuos agroindustriales ha ganado mayor interés en los últimos años, debido a que aún después del procesamiento conservan cantidades importantes de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, ácidos grasos, enzimas, vitaminas, etc.). Entre los principales métodos de aprovechamiento y conservación de éstos, la encapsulación ha tenido un gran desarrollo tanto científico como tecnológico en diversas industrias, siendo la Biotecnológica, Farmacéutica y Alimentaria las que reportan importantes avances en el desarrollo de productos que ofrecen una mejora en la salud humana, siendo. La encapsulación mediante secado por aspersión, gelación ionotrópica, inclusión molecular y emulsificación son las técnicas que mayor desarrollo han reportado. En estas, aspectos como selección de los materiales pared, el método de homogeneización y las condiciones de operación utilizados, deben ser considerados como prioritarios, debido a que una adecuada selección de éstos, garantizar una alta estabilidad de los compuestos bioactivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Instituto Politécnico Nacional, SIP-20200351, COFAA, RED CYTED LACFUN 415RT0495, PICT-2017-0569 y PICT-2017-1744.

Referencias

- Palzer, S. (2009) Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends in Food Science & Technology*, 20(5), 194-200.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510–523.
- Pierce, G.N. & Mizin, V.I., & Omelchenko, A. (2012). *Advanced Bioactive Compounds Countering the Effects of Radiological, Chemical and Biological Agents*. NATO Science for Peace & Security Series A: Chemistry and Biology. Springer.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Kuang, S.S., Oliveira, J.C., & Crean, A.M. (2010). Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 951–968.
- Mishra, M.K. (2016). *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*. Boca Raton. CRC Press.
- Gaonkar, A.G., Vasisht, N., Khare, A.R., & Sobel, R. (2014). *Microencapsulation in the Food Industry*. Elsevier.
- Pegg, R.B., & Shahidi, F. (2007). Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives. Chapter 22. In: Rahman Sh. (ed). *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed. (p. 509-558). Boca Raton. CRC Press Taylor & Francis.

9. Barbosa-Cánovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2005). Encapsulation Process. Chapter 8. In: *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality*. New York. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
10. Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, *42* (1), 469-479.
11. Reineccius, G. (2019) Use of proteins for the delivery of flavours and other bioactive compounds. *Food Hydrocolloids*, *86*, 62-69.
12. Hoyos-Leyva, J.D., Bello-Pérez, L.A., Alvarez-Ramirez, J., & Garcia, H.S. (2018). Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food Reviews International*, *34*(2), 148-161.
13. Porras-Saavedra, J., Palacios-González, E., Lartundo-Rojas, L., Garibay-Febles, V., Yáñez-Fernández, J., Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G., & Alamilla-Beltrán, L. (2015). Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, *152*, 105-112.
14. McClements, J. (2005). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. CRC Press.
15. Mahfoundhi, N., Ksouri, R., & Hamdi, S. (2016). Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization, and application in food industry. In: *Emulsions Nanotechnology in the Agri-Food Industry* Volume 3. Academic Press.
16. Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, *22*, 1191-1202.
17. Tadros, T., Izquierdo, R., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and Stability of nano-emulsions. *Advance Colloid Interface Science*, *108*, 303-318.
18. Baspinar, Y., Keck, C.M., & Borchert, H.H. (2010). Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, *383*, 201–208.
19. Jafari, S.M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Optimization of nano-emulsion production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, *225*, 733–741.
20. McClements, D., & Gumus, C. (2016). Natural emulsifiers-biosurfactans, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, *234*, 3-26.
21. Dickinson, E., & McClements, D. (1995). *Advances in Food Colloids*. Springer Science.
21. Villalobos-Castillejos, F., Alamilla-Beltrán, L., Leyva-Daniel, D., Monroy-Villagrana, A., Jiménez-Guzmán, J., Dorantes-Álvarez, L., & Gutiérrez-López, F. (2017). Long term stability of microfluidized emulsions used in microencapsulation by spray drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *16* (1), 221-228.
22. Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014). Cyclodextrin containing biodegradable particles: from preparation to drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *461*, 351-366.
23. Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *496*, 176-190.
24. Monroy-Villagrana, A., Cano-Sarmiento, C., Alamilla-Beltrán, L., Hernández-Sánchez, H., & Gutiérrez-López, G. (2014). Coupled Taguchi-RSM optimization of the conditions to emulsify -tocopherol in an arabic gum-maltodextrin matrix by microfluidization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *13*(3), 679-688.
25. Guerra-Rosas, M., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, *52*, 438-446.
26. Bai, L., & McClements, D. (2016). Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: rhamnolipids. *Journal of Colloid Interface*, *479*, 71-79.
27. Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M.E., Sher, A.A., & McClements, D.J. (2012). Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloids*, *29*, 398-406.
28. Guan, Y., Wu, J., & Zhong, Q. (2016). Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. *Food Chemistry*, *194*, 787-796.
29. Yin, H., Chen, Z., Gu, Z., & Han, Y. (2009). Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by d-optimal mixture design. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(1), 327–331.
30. Ghai, D., & Sinha, V. (2012). Nanoemulsions as self-emulsified drug delivery carriers for enhanced permeability of the poorly water-soluble selective b1-adrenoreceptor blocker Talinolol. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *8*(5), 618-626.

31. McClements, D., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 5(4), 285-330.
32. Pinnamaneni, S., Das, N.G., & Das, S.K. (2003). Comparison of oil-in-water emulsions manufactured by microfluidization and homogenization. *Pharmazie*, 58, 554 - 558.
33. Anandharamakrishnan, C. (2014). *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*. Briefs in Food, Health and Nutrition. Springer;
34. Pereda, J. (2008). *Utilización de la ultra alta presión por homogenización como alternativa al tratamiento de pasteurización para la obtención de leche de consume*. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
35. Shi, J., Jun, S., Wang, B., Wang, W., Ye, X., & Young, S. (2015). Optimization of formulation and influence of environmental stresses on stability of lycopene-microemulsion. *Food Science and Technology*, 60, 99-1008.
36. Özoğul, Y., Durmu, M., Uçar, Y., Özogul, F., & Regenstein, J. (2016). Comparative study of nanoemulsions based on commercial oils (sunflower, canola, corn, olive, soybean, and hazelnut oils): Effect on microbial, sensory, and chemical qualities of refrigerated farmed sea bass. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 422-430.
37. Teixeira, M., Severino, P., Andreani, T., Boonme, P., Santini, A., Silva, A., & Souto, E. (2016). d-tocopherol nanoemulsions: Size properties, rheological behavior, surface tension, osmolarity and cytotoxicity. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ*, 25, 231-235.
38. Chen, H., Hu, X., Chen, E., Wu, S., McClements, D., Liu, S., Li, B., & Li, Y. (2016). Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 6, 662-671.
39. Calderó, G., Montes, R., Llinàs, M., García-Celma, M., Porrás, M., & Solans, C. (2016). Studies on the formation of polymeric nano-emulsions obtained via low-energy emulsification and their use as templates for drug delivery nanoparticle dispersions. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 145, 922-931.
40. Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D.J. (2013). Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food chemistry*, 139, 878-884.
42. Galanakis, C.M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 68-87.
43. Han, J., Guenier, A-S., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2008). Alginate and Chitosan Functionalization for Micronutrient Encapsulation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 2528-2535.
44. Endress, H-U., Mattes, F., & Norz, K. (2006). Pectins. In: Hui, Y.H. (ed.). *Handbook of Food Science, Technology and Engineering* Volume 3. (p. 1-35). CRC Press-Taylor and Francis.
45. Ward, F.M., & Hanway, W.H. (2006) Food Gums: Functional Properties and Applications. En: Hui, Y.H. (ed.). *Handbook of Food Science, Technology and Engineering* Volume 3. (p. 1-16). CRC Press-Taylor and Francis.
46. Agulhon, P., Robitzer, M., David, L., & Quignard, F. (2012). Structural regime identification in ionotropic alginate gels: Influence of the cation nature and alginate structure. *Biomacromolecules*, 13(1), 215-220.
47. Braccini, I., & Perez, I. (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089-1096.
48. Santagapita, P.R., Mazzobre, M.F., & Buera, M. (2011). Formulation and drying of alginate beads for controlled release and stabilization of invertase. *Biomacromolecules*, 12 9, 3147-3155.
49. Santagapita, P.R., Mazzobre, M.F., & Buera, M.P. (2012). Invertase stability in alginate beads: Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. *Food Research International*, 47, 321-330.
50. Vasile, F.E., Romero, A.M., Judis, M.A., & Mazzobre, M.F. (2016). Prosopis alba exudate gum as excipient for improving fish oil stability in alginate-chitosan beads. *Food chemistry*, 190, 1093-1101.
51. Traffano-Schiffo, M.V., Aguirre Calvo, T.R., Castro-Giraldez, M., Fito, P., & Santagapita, P.R. (2017). Alginate Beads Containing Lactase: Stability and Microstructure. *Biomacromolecules*, 18, 1785-1792.
52. Zazzali, I., Aguirre Calvo, T.R., Pinzones Ruiz-Henestrosa, V.M., Santagapita, P.R., & Perullini, M. (2019). Effects of pH, extrusion tip size and storage protocol on the structural properties of Ca(II)-alginate beads. *Carbohydrate polymers*, 206, 749-756.
53. Gombotz, W.R., & Wee, S.F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 194-205.
54. Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Nishinari, K., Funami, T., Williams, P.A., & Li, L. (2007). Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *The journal of physical chemistry. B*, 111 10, 2456-2462 .

55. Stokke, B.T., Draget, K.I., Smidsrød, O., Yuguchi, Y., Urakawa, H., & Kajiwara, K. (2000). Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Alginate Gels. 1. Ca-Alginate Gels. *Macromolecules*, *33*, 1853-1863.
56. Aguirre Calvo, T., & Santagapita, P. (2017). Encapsulation of a free-solvent extract of lycopene in alginate-Ca(II) beads containing sugars and biopolymers. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *4*, 16.
57. Aguirre Calvo, T., Busch, V., & Santagapita, P. (2017). Stability and release of an encapsulated solvent-free lycopene extract in alginate-based beads. *Lwt - Food Science and Technology*, *77*, 406-412.
58. Aguirre Calvo, T.R., Perullini, A.M., & Santagapita, P.R. (2018). Encapsulation of betacyanins and polyphenols extracted from leaves and stems of beetroot in Ca(II)-alginate beads: A structural study. *Journal of Food Engineering*, *235*, 32-40.
59. Klein, J., Stock, J., & Vorlop, K.D. (1983). Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, *18*, 86-91.
60. Andresen, I.L., Skipnes, O., Smidsrød, O., Østgaard, K., & Hemmer, P.C. (1977). Some biological functions of matrix components in Benthic Algae in relation to their chemistry and the composition of seawater. *ACS Symposium Series*, *48*, 361-381.
61. Sonego, J.M., Santagapita, P.R., Perullini, M., & Jobbágy, M. (2016). Ca(ii) and Ce(iii) homogeneous alginate hydrogels from the parent alginic acid precursor: a structural study. *Dalton transactions*, *45* 24, 10050-10057 .
62. Zhuravlev, R.A., Tamova, M.Y., Bugayets, N.A., Poznyakovskiy, V.M., & Penov, N.D. (2017). Innovative encapsulation technology of food systems using a by-product of dairy production. *Foods and Raw materials*, *5*(1), 81-89.
63. Fenyvesi, É., Vikmon, M., & Szente, L. (2016). Cyclodextrins in Food Technology and Human Nutrition: Benefits and Limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*, 1981 - 2004.
64. Ratnasooriya, C.C., & Rupasinghe, H.P.V. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food chemistry*, *134*, 625-631 .
65. Li, H., Xu, X.Y., Liu, M., Sun, D.Z., & Li, L.W. (2010). Microcalorimetric and spectrographic studies on host-guest interactions of α -, β -, γ - and M β -cyclodextrin with resveratrol. *Thermochimica Acta*, *510*, 168-172.
66. Ponce Cevallos, P.A., Buera, M.P., & Elizalde, B. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, *99*(1), 70-75.
67. Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical reviews*, *97*, 1743-1754 .
68. Astray, G., González-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1631-1640.
69. Hu, Y.S., Qi, Y.P., Liu, H., Fan, G.R., & Chai, Y.F. (2013). Effects of celastrol on human cervical cancer cells as revealed by ion-trap gas chromatography-mass spectrometry based metabolic profiling. *Biochimica et biophysica acta*, *1830*, 2779-2789.
70. Gao, F., Zhou, T., Hu, Y., Lan, L., vander Heyden, Y., Crommen, J., Lu, G., & Fan, G. (2016). Cyclodextrin-based ultrasonic-assisted microwave extraction and HPLC-PDA-ESI-ITMSn separation and identification of hydrophilic and hydrophobic components of *Polygonum cuspidatum*: A green, rapid and effective process. *Industrial Crops and Products*, *80*, 59-69.
71. Cai, R., Yuan, Y., Cui, L., Wang, Z., & Yue, T. (2018). Cyclodextrin-assisted extraction of phenolic compounds: Current research and future prospects. *Trends in Food Science and Technology*, *79*, 19-27.
72. Chen, X., Chen, R., Guo, Z., Li, C., & Li, P. (2007). The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, *101*, 1580-1584.
73. Mantegna, S., Binello, A., Boffa, L., Giorgis, M., Cena, C., & Cravotto, G. (2012). A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, *130*, 746-750.
74. Azeredo, H. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability. a review. *Journal of Food Science and Technology*, *44*, 2365-2376.
75. Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J., & Bruna, J.E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food chemistry*, *196*, 968-675.
76. Nedovic, V., Kaluševi, A., Manojlovi, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia food science*, *1*, 1806-1815.

77. Maraulo, G.E., dos Santos, C., y Mazzobre, M.F. (2018). Aprovechamiento del alperujo de oliva para la obtención de compuestos antioxidantes empleando extracción por ultrasonido y soluciones acuosas de ciclodextrina. *VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2018). Córdoba, Argentina, 1-3 octubre 2018*.
78. dos Santos, C. (2017). *Encapsulación de ingredientes alimenticios en ciclodextrinas y sus posibles aplicaciones*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
79. Diamanti, A.C., Igoumenidis, P.E., Mourtzinou, I., Yannakopoulou, K., & Karathanos, V.T. (2017). Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins. *Food Chemistry, 214*, 61–66.
80. Zhu, Q.Y., Zhang, Q.Y., Cao, J., Cao, W., Xu, J.J., & Peng, L.Q. (2016). Cyclodextrin-assisted liquid-solid extraction for determination of the composition of jujube fruit using ultrahigh performance liquid chromatography with electrochemical detection and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Food chemistry, 213*, 485-493.
81. Rajha, H.N., Chacar, S., Afif, C., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R.G. (2015). β -Cyclodextrin-assisted extraction of polyphenols from vine shoot cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry, 63*, 3387-3393 .
82. Mourtzinou, I., Anastasopoulou, E., Petrou, A., Grigorakis, S., Makris, D., & Biliaderis, C.G. (2016). Optimization of a green extraction method for the recovery of polyphenols from olive leaf using cyclodextrins and glycerin as co-solvents. *Journal of Food Science & Technology, 53*, 3939–3947.
83. Cui, L., Liu, Y.X., Liu, T., Yuan, Y.H., Yue, T.L., Cai, R., & Wang, Z. (2017). Extraction of Epigallocatechin Gallate and Epicatechin Gallate from Tea Leaves Using β -Cyclodextrin. *Journal of food science, 82*, 394–400.
84. Fumi, B., Kon i, M.Z., & Jug, M. (2017). Therapeutic Potential of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-Based Extract of *Medicago sativa* in the Treatment of Mucopolysaccharidoses. *Planta medica, 83*, 40–50.
85. Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J.A., & Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: Macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. Chapter 2. In: Hayes M (ed.). *Marine bioactive compounds sources, characterization and applications*. (p. 55-98). New York, Springer.
86. Rostagno, M.A., & Prado, J.M. (2013). *Natural product extraction: Principles and applications*. London. Royal Society of Chemistry.
87. Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers, 101*, 121–135.
88. Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4*, 675–682.
89. Del Valle, E.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry, 39*, 1033–1046.
90. Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., & Khodir, M. (2015). Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chemistry, 187*, 507–516.
91. Chemat, F., Vian, M.A., & Cravotto G. (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences, 13*, 8615–8627.
92. Mariod, A.A. (2018) Functional properties of gum arabic. Cap. 24. In: *Gum arabic. Structure, properties, application and economics*. (p. 283-295). Academic Press
93. Zuidam, N., & Heinrich, J. (2009). Encapsulation of aroma. In: Zuidam, N. & Nedovic, V. (ed.). *Encapsulation technologies for food active ingredients and food processing*. (p. 127-160). Dordrecht, Springer.
94. Masters, K. (1985). *Spray Drying Handbook*. 4th ed. New York. Halstead Press.
95. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International, 40*, 1107–1121.
96. Villalobos-Castillejos, F., Granillo-Guerrero, V.G., Leyva-Daniel, D., Alamilla-Beltrán, L., Gutiérrez-López, G.F., Monroy-Villagrana, A., & Jafari, S.M. (2018). Fabrication of nanoemulsions by Microfluidization. In: Jafari, S.M., & McClements, D.J. (ed.). *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. (p. 207-231). Academic Press.
97. Mujumdar, A.S. (2006). *Handbook of industrial drying*. 3rd ed. Taylor & Francis.
98. Woo, M.W., & Bhandari, B. (2013). Spray drying for food powder production. Cap. 2. In: Bhandari, B., Bansal, N., Zhang, M. & Schuckpp, P. (ed.). *Handbook of Food Powders*. (p. 29-56). Woodhead Publishing.
99. Chen, C.C., & Wagner, G. (2004). Vitamin E Nanoparticle for Beverage Applications. *Chemical Engineering Research & Design, 82*, 1432-1437.

100. Souza, A.L.R., Hidalgo-Chávez, D.W., Pontes, S.M., Gomes, F.S., Cabral, L.M.C., & Tonon, R.V. (2018). Microencapsulation by spray drying of a lycopene-rich tomato concentrate: Characterization and stability. *Lwt - Food Science and Technology*, *91*, 286-292.
101. Estevinho, B.N., Carlan, I., Blaga, A., & Rocha, F. (2016). Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. *Powder Technology*, *289*, 71-78.
102. Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J.A., Calderas, F., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Ochoa-Martínez, L., & Bernad-Bernad, M.J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *Lwt - Food Science and Technology*, *64*, 571-577.
103. Pereyra-Castro, S.C., Alamilla-Beltrán, L., Villalobos-Castillejos, F., Porras-Saavedra, J., Pérez-Pérez, V., Gutiérrez-López, G., & Jiménez-Aparicio, A. (2018). Microfluidization and atomization pressure during microencapsulation process: Microstructure, hygroscopicity, dissolution and flow properties. *Lwt - Food Science and Technology*, *96*, 378-385.
104. Porras-Saavedra, J., Alamilla-Beltrán, L., Lartundo-Rojas, L., Perea-Flores, M.J., Yáñez-Fernández, J., Palacios-González, E., & Gutiérrez-López, G.F. (2018). Chemical components distribution and morphology of microcapsules of paprika oleoresin by microscopy and spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, *81*, 6-14.
105. Plazola-Jacinto, C.P., Pérez-Pérez, V., Pereyra-Castro, S.C., Alamilla-Beltrán, L., & Ortiz-Moreno, A. (2019). Microencapsulation of biocompounds from avocado leaves oily extracts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *18*, 1261-1276.

Capítulo 20

Técnicas de análisis microestructural de alimentos: análisis digital de imágenes en microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de barrido láser

Antonio Ruperto Jiménez Aparicio¹, Francisco Rodríguez González¹, Liliana Alamilla Beltrán², Daniel Tapia Maruri¹, Ivan Priego Cortéz¹, Romina Ingrassia^{4,5,6}, María Eugenia Hidalgo^{4,5}, Lucas Bea⁴, Brenda Hildeliza Camacho Díaz¹, Patricia Risso^{4,5,6}, Fabiano Freire Costa³

¹Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Morelos. México

²Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Campus Zacatenco. Departamento de Ingeniería Bioquímica. México.

³Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia. MG. Brasil

⁴Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario. Argentina

⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina

⁶Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Veterinarias. Argentina

Resumen

El análisis microestructural proporciona información pertinente sobre la distribución de partículas en sistemas alimentarios complejos, como los sistemas biológicos en general, así como las matrices alimentarias (lácteos, proteínas, geles, etc.). Esta información es importante en el desarrollo de productos y procesos innovadores que se combinan con otros métodos analíticos, por ejemplo, en el estudio de estabilidad de los materiales y sus propiedades biológicas. La microscopía en general es una herramienta importante en los estudios microestructurales. Las técnicas de microscopía se han ido perfeccionando con los avances tecnológicos. Los microscopios fotónicos y electrónicos se están volviendo cada vez más sofisticados y adaptados a las disciplinas que los requiere (materiales complejos, organismos vivos, matrices alimentarias). Los microscopios en particular los fotónicos de barrido confocal y los electrónicos son equipos caros. La posibilidad de estudiar cualquier cosa con ellos se debe asociar a la creatividad y conocimientos técnicos del analista y el investigador, así como tener en cuenta las limitaciones del equipo a utilizar por su marca y modelo. Este documento hace una introducción al uso de los microscopios, confocal de barrido laser (MCBL) y el electrónico de barrido (MEB) orientados al área de la ciencia y de la tecnología alimenticia. Con el uso del análisis de imágenes como herramienta para el estudio de las microestructuras de matrices alimentarias, en sistemas estáticos o dinámicos.

1. Microscopía y microestructura

La observación de los objetos y la explicación de los fenómenos siempre se ha basado en la curiosidad desde tiempos antiguos con los filósofos en la antigua Grecia. Alrededor de 500 A.C. algunos observadores creían que la visualización de los objetos era porque emitían una luz que podía ser capturada por nuestros ojos. Otra teoría discutida en aquellos tiempos remotos era que el ojo humano podría emitir luz iluminando los objetos y permitiendo su visualización. Por supuesto que estas teorías, no se aplicaban durante la noche, puesto que no es posible todavía ver los objetos a simple vista, estando a oscuras (1, 2, 3, 4).

Aunque todavía incierto, se atribuye al físico y matemático árabe de nombre Abu Ali al-Hasan Ibn Al-Haitham, comúnmente conocido como Alhazen (965 D.C.), la invención de las lentes de aumento. Más tarde, en los años 1260-1270, fue atribuido a Roger Bacon, un sacerdote y filósofo inglés, que dedicó parte de su vida a los estudios de la naturaleza, la invención de los binóculos. Sin embargo, esta invención siempre ha sido cuestionada por los chinos, quienes abogan que las gafas en realidad ya habían sido inventadas antes en Asia y que Marco Polo había llevado las gafas hacia Europa (1,2,3,4).

Se cree que el primer microscopista fue el holandés Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723) quién utilizó un sistema de lupas para hacer observaciones microscópicas de materiales biológicos. Estas magnificadores se inventaron al final del siglo XVI por Hans Janssen y su hijo Zacharias, dos holandeses

fabricantes de gafas. Sin embargo, La invención y la mejora del microscopio en la forma que lo conocemos hoy, formada por una lente ocular y un objetivo fue atribuida a Galileo Galilei (1609) aunque impugnada por otros inventores de la época (1,2,3,4). Más adelante el microscopio electrónico fue presentado por primera vez, en el año 1931, por el físico alemán Ernst Ruska y desde entonces ha sido perfeccionado. El microscopio electrónico y las investigaciones relacionadas con él han generado desde su desarrollo, innumerables Premios Nobel de Física y Química, lo que refuerza aún más su importancia para la ciencia. Recientemente en el 2017, tres científicos fueron galardonados con un premio Nobel de química gracias al desarrollo de técnicas de Crio preservación para Visualización de biomoléculas en solución, (1,2,3,4).

2. Microscopía fotónica y electrónica

Existen diferentes tipos de microscopios en el mercado con precios que van desde los diez dólares hasta los equipos más sofisticados cuyo valor puede llegar a casi dos millones de dólares. Los microscopios fotónicos son los más comúnmente utilizados. Son popularmente llamados ópticos, aunque esta nomenclatura es errónea, ya que todos los microscopios son ópticos incluso los electrónicos que utilizan lentes electrónicas. Pero estos microscopios fotónicos por utilizar la región visible del espectro electromagnético como fuente de iluminación poseen limitaciones de visualización como amplificación y principalmente en la resolución. Para evitar estos problemas, los microscopios que utilizan otras bandas del espectro electromagnético con variación en la longitud de onda se desarrollan y se actualizan constantemente de acuerdo con los avances tecnológicos, como los microscopios de epifluorescencia, confocales multifotónicos y electrónicos de barrido y transmisión, etcétera, (1,2,3,4).

A los ojos de un inexperto, éste cuando ve un microscopio por primera vez se preocupa inicialmente con la capacidad de aumento. Microscopios modernos son capaces de aumentar hasta más de 1,000,000 de veces. La idea que tenemos es que la ciencia desarrolla equipos capaces de visualizar estructuras cada vez menores. Pero no es eso lo que ocurre, porque tenemos una limitación física que necesita ser considerada. Para un microscopista lo que interesa no es el poder de aumento sino el poder de resolución del equipo (1,2,3,4).

La resolución es la distancia más corta entre dos puntos. Esta distancia perceptible está relacionada con la radiación utilizada para la iluminación del material en la microscopía. Para examinar un material claramente distinguible, cuanto menor es la distancia perceptible entre dos puntos mejor es la resolución. El poder de resolución es la capacidad de resolver los detalles. Lo correcto es hablar en mejor y no mayor poder de resolución. Así, la resolución del ojo humano es del orden de 0,1 mm, la de un microscopio fotónico, cerca de 200 nm (0,2 μm), de un microscopio electrónico de escaneado es de 10 Å (1 nm) y de un microscopio electrónico de transmisión, alrededor de 1-2 Å (0,1-0,2 nm) (5).

2.1. Principios microscopía electrónica / MEB

El uso del electrón en lugar de la luz visible permite una resolución mucho mejor. Sin embargo, no es fácil manipular haces de electrones usando lentes de cuarzo, vidrio o plástico además de tener que ser operado en alto vacío. Para esto se creó la lente electrónica que consiste en un solenoide que mediante la realización de los electrones genera un campo magnético que ayuda en la desviación y la conducción de la viga a un punto de la muestra que se analizará (1,2,3,4).

Los microscopios electrónicos utilizan un haz de electrones como fuente de iluminación sobre una muestra que va a ser observada. Este haz de electrones es condensado y dirigido a las muestras a través de las lentes electrónicas (campos electromagnéticos). Los microscopios electrónicos se dividen de acuerdo con la interacción de los electrones con la muestra. En la microscopía electrónica de transmisión (MET) los electrones interactúan con una muestra suficientemente fina, donde los electrones logran atravesarla. La muestra queda posicionada entre la fuente de electrones y un mamparo, donde la imagen ampliada está formada por el impacto de los electrones transmitidos y difractados. La imagen formada es una proyección bidimensional de la muestra en campo claro, oscuro o aún de difracción de los electrones. Con el avance del desarrollo de software de tratamiento de imágenes es posible actualmente la construcción tridimensional (3D) de los materiales observados. En la microscopía electrónica de barrido (MEB) los electrones se irradian en la superficie de la muestra donde las señales

eléctricas producidas se captan en forma de imagen. Las imágenes formadas durante la exploración de la muestra proporcionan información en escala de grises de la topografía del material analizado (6).

Actualmente, con el avance de las técnicas de microanálisis es posible captar las señales de rayos X característicos que suministran informaciones elementales semi-cuantitativas a través del mapeo de la composición. Este aparato desarrollado puede ser acoplado en muchos tipos de microscopios electrónicos y es denominado EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) y EDX (Energy Dispersive X Ray). La incidencia de los electrones produce diversas interacciones con las muestras, lo que hace la utilización de esta técnica mucho más allá de la simple obtención de imágenes. Estos instrumentos modernos proporcionan un grado detallado de caracterizaciones ultraestructurales, composiciones y cristalográficos en diferentes materiales como aleaciones metálicas, semiconductores, vidrios, polímeros, madera, materiales de madera, hormigón, muestras biológicas, etc. En el caso de los materiales que no conducen corriente eléctrica, como los materiales biológicos, las muestras deben ser tratadas para que los electrones puedan ser conducidos en su superficie sin dañar el material estudiado. Para ello una serie de procedimientos de preparación de muestra se realizan para tener la mejor visualización posible de las estructuras que componen los sistemas analizados (4).

2.2. Principios microscopía fotónica confocal/MCBL

La microscopía confocal de barrido láser (CLSM) es una de las técnicas de microscopía más útiles para estudiar la microestructura de una amplia variedad de alimentos (7). El escaneo láser penetra en la superficie del alimento para visualizar secciones ópticas delgadas y obtener un análisis tridimensional de la microestructura sin alterar la estructura interna. En esta técnica no es necesario seccionar la muestra y esta se observa dentro de un plano tanto transversal como a lo largo del eje óptico.

El equipo estándar CLSM incluye un láser de argón con o sin un láser de helio-neón. Esta técnica puede proporcionar imágenes enfocadas a una profundidad de hasta varios cientos de micrones. Por lo tanto, las secciones secuenciales obtenidas se pueden utilizar para la reconstrucción tridimensional de las micrografías. Además, los distintos componentes del alimento, como las proteínas y las grasas, y la ubicación de los microorganismos se pueden identificar simultáneamente utilizando marcadores fluorescentes específicos (8, 9).

El microscopio confocal de barrido nos permite ver la imagen que se encuentra fuera del plano de foco, caso que en la microscopía óptica normal no se puede obtener. Esto es debido a que la luz que se va a hacer incidir sobre la muestra pasa por una pequeña abertura y es enfocada en el plano de la imagen de un objetivo de gran apertura numérica. La fuente de luz, en este caso es el rayo láser, se hace pasar por una ranura y posterior a esto se incide en un espejo dicróico. Después se enfoca en la muestra, pasando por el objetivo del microscopio. La luz que emite la muestra es colectada por el objetivo y se enfoca en una ranura detectora. La luz proveniente de los planos que se encuentran fuera de foco incide fuera de la ranura detectora.

2.3. Preparación de muestras para microscopía

Según Caillet *et al.*, (2003) (10), actualmente existen varias técnicas para microscopía para caracterizar las estructuras vivas. Los principales métodos son los métodos destructivos, indirectos y directos. El método destructivo se basa en la observación de muestras o matrices fijadas y/o contrastadas por métodos físicos o químicos. Las ventajas de estas técnicas son la información que se recoge directamente de la muestra ya que se preservan la mayoría de micro y ultraestructuras celulares, moleculares y reticulares. La desventaja es que con estas técnicas se puede llegar a comprometer a integridad de las muestras además de involucrar largos tiempos de desarrollo. Considerando que la muestra está modificada de su estado original, las imágenes obtenidas podrían no representar toda la morfología y textura del material biológico. Por otro lado, el método indirecto utiliza técnicas de microscopía fotónica y electrónica, proporcionando imágenes de la estructura de las muestras parcialmente destruidas por Cryo-sustitución, criofijación y congelación. La ventaja de esta técnica es la alta resolución y los detalles de la estructura de muestras delgadas de alimentos o con muy alto contenido de agua. La desventaja es que normalmente se ocupan gases de alta pureza y equipos que pueden trabajar en rangos de temperatura de -20 °C a -40 °C y con aditamentos como platinas de congelación de costos muy altos. El método directo, más utilizado por

los laboratorios industriales, caracteriza la estructura de los alimentos congelados y productos más sólidos. Este método utiliza microscopía fotónica con dispositivo coaxial iluminado para preservar mejor la textura original de la muestra congelada. Se basa en la reflexión de la luz en la cara de la muestra. En comparación con la microscopía electrónica, la desventaja es la baja resolución (6).

De manera muy particular en las muestras para microscopía electrónica además la preparación de muestras se divide en metálico y no metálico. Las muestras metálicas no requieren tratamiento para llevar a cabo la corriente porque su naturaleza ya lo permite. Para nosotros en los campos de la ciencia y la tecnología de los alimentos y relacionados trabajamos a menudo con muestras no metálicas y en este caso necesitamos un tratamiento previo para que los electrones pueden llevarse a cabo en su superficie o incluso a través de ella. Entre estos protocolos destacamos la fijación, deshidratación, secado a punto crítico, montaje y cubierta con oro (11,12,13).

La preparación de las muestras para la microscopía de transmisión es algo diferente de la preparación para el escaneo. Después de la selección del material y la deshidratación, las muestras se fijan con resinas poliméricas especiales. El secado del material con resinas poliméricas puede producirse a temperatura ambiente o en temperatura de enfriamiento, en presencia o no de radiación UV, Con el fin de promover el proceso de polimerización. Este material seco y en forma de bloque es llevado al equipo que corta en cuchillas ultrafina con un grosor que varía de 20-100 a Nm. Estas cuchillas se recogen en muestras de puertas en forma de rejillas o tamices. Como estas láminas delgadas también necesitan para conducir los electrones y éstos deben cruzar su superficie para la formación de la imagen se deben utilizar soluciones con iones metálicos como el plomo, el uranio o el oro. Después de esta preparación el material es adecuado para la visualización en el microscopio electrónico de transmisión. Ya están disponibles los dispositivos como el Ultramicrotomo y sistemas de análisis a bajas temperaturas para utilizar sólo la congelación del material como pretratamiento de las muestras (13,14).

Actualmente es posible adquirir un aparato que puede acoplarse a las llamadas de equipo de cámara ambiental. En este sistema las muestras pueden ser analizadas en su estado natural a temperaturas por debajo de 0 °C. En los últimos años las técnicas de criopreservación y crioanálisis han recibido más atención por parte de los investigadores debido a su versatilidad y amplia aplicación. Estas técnicas de criopreservación y crioanálisis mantienen las muestras originalmente encontradas en un estado líquido o pastoso en estado sólido. Esto se debe a la bajada de la temperatura. Las muestras solidificadas son entonces analizadas directamente en los equipos que se preparan para este propósito. Los resultados de estas técnicas fueron tan importantes que los investigadores que la desarrollaron obtuvieron el Premio Nobel de química en 2017 (13,14).

2.4. Interpretación de imágenes en microscopía fotónica y electrónica

Después de la obtención de imágenes el reto está en el interpretar lo que la formación y la distribución de los componentes pueden ofrecer como resultado. Los microscopios tienen varillas de medición que ayudan a medir las partículas y otras provisiones estructurales que conforman los sistemas. Generalmente, cuando observamos partículas geométricas con lados homogéneos y lisos podemos inferir que son estructuras cristalinas. Las células sanguíneas de lípidos son generalmente esféricas. Cuando el material está con la presencia de proteínas formando como ejemplo algún sistema emulsionado este enlatar se observa formando un anillo alrededor de los glóbulos de lípidos. Muchos análisis buscan observar exactamente esta interacción entre la grasa y las proteínas. Todavía es posible observar la dispersión de estructuras proteicas, cristalinas, de sangre lípidos, burbujas de aire (que también se presenta como una estructura esférica sin forma) y otros componentes alimenticios en el sistema. La microcomposición de los elementos químicos distribuido en la superficie de la muestra también son posible ser analizado y su distribución a lo largo del material observado de manera cuantitativa (13,14).

Encontrar fragmentación, defectos en los alimentos como colapso estructural, coalescencia de lípidos, nucleación, cristalización, crecimiento de cristales y fusión, distribución de carbohidratos, lípidos, proteínas y otros componentes y sus interacciones muchos Son los principales objetivos del analista. Algunas herramientas como el marcado químico de los componentes se encuentran también entre las técnicas que son utilizadas para ayudar en la mejor identificación de los componentes presentes. Los marcadores que interactúan específicamente con las proteínas, los carbohidratos de lípidos son comúnmente utilizados en el desglose de la composición (15,16,17).

Esta etapa de visualización y análisis del material estudiado depende en gran medida del conocimiento técnico del analista y del investigador. Otras técnicas analíticas como la medición del tamaño de partículas, la reología, los estudios térmicos, etc.; son favorables para auxiliar la interpretación. La creatividad asociada al conocimiento técnico es fundamental en la interpretación de los resultados.

Hoy en día, la microscopía se puede aplicar a diferentes estudios a través de diferentes métodos y técnicas. La microscopía también permite observar los diferentes comportamientos existentes en los sistemas considerados. Una excelente herramienta en los estudios de las interacciones entre las variables más diversas que componen la estructura alimenticia. En general con el avance que ha tenido la ciencia se han ido desarrollando diferentes tipos de técnicas de preparación de muestras y equipos para micro análisis. Lo importante es saber que este trabajo presenta los pasos iniciales para un buen análisis microestructural y del conocimiento encontrado en la literatura. Será posible desarrollar los métodos adaptados a la necesidad de cada analista e investigador, así como las muestras y el equipo utilizado en el análisis. Muestras complejas como alimentos en general son sistemas compuestos de carbohidratos, lípidos, proteínas, minerales y el estudio de la composición debe ser bien detallado para que en el momento de la preparación de las muestras sea posible minimizar los errores. Los productos químicos para el análisis de microscopía electrónica son caros y tóxicos. Los científicos responsables del desarrollo de técnicas microscópicas siempre apuntan a capturar mejor las imágenes pasando el menor tiempo posible con la preparación de muestras en la menor cantidad posible de reactivos o incluso eliminar el uso de estos como es el caso de algunos aparatos desarrollados para microscopios electrónicos que permite la observación de la muestra en fresco. Lógicamente estos aparatos son caros y no siempre adaptables a los equipos disponibles. Actualmente, las universidades federales brasileñas como UFJF, UFLA, UFMG, UFV, institutos de investigación como EMBRAPA, laboratorio nacional de Luz Sincrotrón. En Campinas, así como INMETRO tienen el equipo más moderno que se puede utilizar de acuerdo con las reglas y estándares de cada ubicación.

3. Procesamiento de imágenes obtenidas por microscopía

El término procesamiento de imágenes hoy en día es inherente a la manipulación y al análisis que se les da a las imágenes por medio de un computador. Este procesamiento de imágenes se considera como un tipo especial de procesamiento digital de un archivo electrónico que representa información gráfica en dos dimensiones, el cual es usado para generar información sobre un sistema estático o uno dinámico capturado en una imagen (18). Al principio el procesamiento digital de imágenes estaba limitado a algunos campos de investigación de ciencias de la computación, matemáticas y astronomía sin embargo el procesamiento de imágenes es sin duda hoy en día una herramienta posible de utilizarse en diversas disciplinas para obtener de la morfología de los objetos con información clara y suficiente a niveles macro y microscópicos.

En general, las imágenes digitales están formadas por incidentes, la luz en el espectro visible cae sobre una superficie parcialmente reflectiva y parcialmente absorbente, con los fotones dispersos reunidos en la lente de la cámara y convertido a señales eléctricas ya sea por tubo de vacío o CCD (19). En la práctica, este es sólo uno de los muchos en el caso de Microscopía electrónica se genera como respuesta una imagen a escala de grises en 8 bits con un microscopio confocal una imagen RGB monocromática en alguno de estos canales o el conjunto de estos en diversos tonos (20).

El término de imagen se describe como una función bidimensional de intensidad de luz representada como $f(x,y)$, donde (x,y) son las coordenadas espaciales y el valor de $f(x,y)$ en cualquier punto del plano es proporcional al brillo o nivel de gris que contiene la imagen en ese punto (19). Una imagen digital es una imagen $f(x,y)$ expresada como función discreta en coordenadas espaciales y en brillo. Una imagen digital es considerada como una matriz cuyos valores definen un punto en la imagen y otro que en magnitud identifica el nivel de intensidad de luz en ese punto, tales arreglos digitales son llamados elementos de imagen o píxeles, codificados en códigos binarios (1, 0), legible por cualquier dispositivo digital (20).

El proceso de tratamiento digital de imágenes cuenta con diferentes pasos, el primero es adquirir la imagen (digitalizarla), para ello es importante considerar el sistema de captura, el tipo de iluminante y el formato de almacenamiento (21, 20). Al obtener la imagen digital se procede a un preprocesamiento; este paso nos permite la mejora de la imagen de manera que aumente el contraste

y las diferencias entre el objeto de interés y el resto de la imagen o lo que comúnmente conocemos como fondo. El preprocesamiento utiliza técnicas para realzar el contraste, incrementar el brillo y retirar el ruido. Posterior a esto sigue la segmentación, que se define como la fragmentación de la imagen de entrada en sus partes constituyentes u objetos. Frecuentemente, la segmentación automatizada es una tarea compleja en el procesamiento de imágenes debido a que desde el origen las imágenes deben de estar lo suficientemente contrastada, adecuadamente capturada bajo las mismas condiciones y deberá ser del mismo tamaño digital (resolución). En términos de caracteres, el propósito de la segmentación es extraer caracteres individuales y objetos del fondo de la imagen y pudiera estar representada como la extracción de información cuantitativa de utilidad para poder diferenciar características de dos o más objetos en una misma imagen. Dando así lugar al siguiente paso asociado al reconocimiento de caracteres, descriptores o patrones tales como tamaños, formas, estructuras, colores, irregularidades texturas. El último paso se basa en el reconocimiento y la interpretación de la serie de valores obtenidos en el paso anterior. El reconocimiento es el proceso el cual da lugar a la clasificación de objetos, o asignatura de etiquetas o caracteres, basados en la información que proveen sus descriptores.

El microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio Confocal (MCBL) se utilizan cada vez más para identificar características de tamaño micrométrico, como los componentes ultraestructurales de las plantas como sus organelos. Además, algunas propiedades naturales, que a escalas macroscópicas nos proporcionan información fidedigna en un alimento como la red de la miga de pan, las micelas de la leche o algunas otras proteínas y que se asocian directamente a las propiedades funcionales de los ingredientes de los alimentos. La ventaja de utilizar el procesamiento digital de imágenes en las imágenes obtenidas por microscopía es el nivel de detalle que éstas poseen y dependiendo del tipo de microscopía, imágenes de alta resolución; sin embargo, la principal desventaja radica en el poco contraste que estas tienen en sistemas monocromáticos. Sin embargo, la intensidad de la imagen juega un papel importante en la segmentación de la imagen. El procesamiento imágenes en micrografías digitales permite evaluar parámetros de tamaño en objetos micro o nanométricos (por ejemplo, diámetro promedio, área o perímetro) describen un objeto geométrico diminuto independientemente de su forma. La morfología de una micro o nano estructura se caracteriza por la descripción (esférica, angular, elíptica, dendrítica o incluso fractal), por ejemplo, por medio de factores de forma o dimensiones fractales. El parámetro de aspecto también puede referirse a la profundidad de la imagen asociado al parámetro de intensidad o luminosidad sin considerar el tamaño, si no la textura aparente, utilizando proyecciones 3D. Este tipo de análisis es común llevarlo a cabo mediante el método de co-ocurrencia de matrices en escala de grises (GLCM).

4. Experiencia de campo en el análisis microestructural de alimentos con análisis de imágenes en MCBL y MEB

4.1. Evaluación de la microestructura de geles ácidos mixtos de proteínas y polisacáridos mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM)

La aptitud a la gelificación o gelación proteica es una propiedad funcional muy importante ya que tiene un papel fundamental en la preparación de numerosos alimentos (22). Las proteínas pueden formar geles a pH cercanos al punto isoeléctrico de las mismas, proceso base de la elaboración de yogures y postres ácidos. La reducción del pH de soluciones proteicas puede realizarse rápidamente (acidificación directa) o lentamente (uso de cultivos lácticos). La acidificación directa puede ser realizada mediante la adición de glucono- δ -lactona (GDL), que en solución acuosa se hidroliza liberando ácido glucónico. Esta técnica es una alternativa al uso de cultivos bacterianos ya que, dependiendo de la concentración y temperatura, la hidrólisis de la GDL puede promover una reducción lenta del pH. Por lo tanto, el uso de GDL es útil para evaluar tanto la cinética de la gelación ácida como para simular un proceso de gelación iniciado por cultivos bacterianos (23).

La gelación ácida proteica puede verse afectada por variaciones de las condiciones de proceso, como temperatura, contenido de sales, combinación de ingredientes, etc. En particular, este proceso puede verse afectado por la presencia de polisacáridos, debido a la posible incompatibilidad termodinámica entre estos últimos y las proteínas (24). La optimización de técnicas que determinen en forma precisa la microestructura de los geles formados contribuirá a desarrollar geles con características y/o funciones especiales.

Tres sistemas diferentes resultan de la mezcla de proteínas y polisacáridos en solución acuosa (25):

- a) Soluciones homogéneas estables por co-solubilidad, la cual disminuye con el incremento de la concentración de los biopolímeros y termina cuando se excede una concentración crítica. A partir de la misma, la separación de fases entre proteínas y polisacáridos surge de las variaciones locales de la concentración de biopolímero en la mezcla. En ausencia de gelación, las fases separadas se engrosarán con el tiempo y, eventualmente, se convertirán en un sistema de fases separadas macroscópicamente visible (24).
- b) Separación de fases asociativa o coacervación: Ambos componentes se concentran en la misma fase debido a la formación de un complejo electrostático a un pH menor del punto isoelectrico de la proteína, por medio de interacciones débiles y no específicas. La coacervación ocurre entre biopolímeros con carga opuesta y generalmente conduce a la formación de agregados solubles o gotas esféricas en una fase dispersante. En la etapa final de la separación de fases, los agregados o gotas sedimentan y forman una fase macroscópica que contiene a ambos biopolímeros (26).
- c) Separación de fases segregativa o incompatibilidad termodinámica: Los dos componentes se encuentran en fases distintas. Ocurre entre biopolímeros de igual carga y/o biopolímeros neutros y se observa principalmente a un pH mayor que el punto isoelectrico de la proteína (24, 27, 28).

Los galactomananos son polisacáridos hidrocoloides neutros, no gelificantes, que provienen del endosperma de las semillas de una gran variedad de leguminosas (29). Poseen alto peso molecular, son solubles en agua y capaces de aumentar significativamente la viscosidad del medio aún a bajas concentraciones. Debido a estas propiedades, se los utiliza como aditivos para espesar y/o estabilizar sistemas alimenticios y como agentes modificadores de textura (30). Entre ellos, la goma garrofin (LBG) con una relación Man/Gal de 3,5 y la goma guar (GG) con una relación Man/Gal de 2, son los comúnmente empleados por la industria alimentaria. La goma tara (GT) es un galactomanano con una composición similar a la LBG y la GG, con una relación Man/Gal de 3.

La mezcla de estos galactomananos con proteínas en su punto isoiónico, dependiendo de la concentración relativa de ambos biopolímeros, suele generar una incompatibilidad termodinámica cuyo estado final, en ausencia de gelación, es un sistema con fases macroscópicamente separadas en la que cada fase se enriquece en uno de los dos biopolímeros (separación de fases segregativa) (24).

Aunque un sistema de dos biopolímeros sea termodinámicamente inestable, la separación de fases puede no ser observada en el período de tiempo experimental debido a la existencia de una barrera de energía cinética asociada con la restricción del movimiento de las moléculas. Si uno o los dos biopolímeros son altamente viscosos o forman geles, la velocidad y extensión de la separación de fases puede ser severamente retardada. Dado que la separación de fases ocurre en una escala amplia de longitud, se habla de microseparación de fases en un límite inferior a 1 μm , el cual puede observarse en un microscopio, y un límite superior a 1 mm, donde la separación macroscópica de fases puede ser observada por el ojo humano (24, 28).

Además, debido a la incompatibilidad termodinámica entre soluciones acuosas de ciertas combinaciones de polímeros hidrofílicos pueden formarse emulsiones agua/agua (W/W). A partir de los diagramas de fase se pueden seleccionar las composiciones más apropiadas para la preparación de dichas emulsiones (26, 31). El problema principal de las emulsiones W/W es su habitual falta de estabilidad, especialmente en composiciones cercanas al punto crítico. La coalescencia o floculación rápida tienden a ocurrir, lo que lleva a una separación de fases rápida e irreversible, a pesar del hecho de que las emulsiones W/W no estén sometidas a la maduración de Ostwald. Esta ha sido la principal desventaja para usar emulsiones W/W en aplicaciones prácticas (31).

Muchas veces la separación de fases viene acompañada por la gelación de alguno de los biopolímeros, tornando aún más compleja la descripción de la red heterogénea formada por proteínas y polisacáridos. Tanto la separación de fases asociativa como la segregativa pueden ser detenidas por dicha gelación. Dependiendo del balance entre las velocidades de los procesos de gelación y de separación de fases, variará la microestructura final obtenida (24, 27, 32). Las microestructuras de geles de mezclas de polisacáridos y proteínas se clasifican en homogéneas y de fases separadas. Estas últimas surgen como consecuencia de la microseparación de fases entre proteína y polisacárido y se dividen en: "hebras gruesas", "bicontinuas" y "proteína continua" o "polisacárido continuo" (32). Estas dos últimas

microestructuras pueden obtenerse controlando la velocidad de gelación y corresponden a emulsiones W/W estables debido a la formación de estados gelificados que previenen la coalescencia (31).

La microscopía CLSM permite evaluar la microestructura de los geles ya que posibilita la visualización de muestras con un alto grado de hidratación y la obtención de secciones ópticas que permiten la adquisición de una imagen tridimensional (33).

En la Figura 1 se muestran las imágenes digitales que fueron obtenidas por CLSM de geles ácidos de mezclas de proteínas y galactomananos. Para preparar los geles se partió de dispersiones acuosas madre de proteínas (caseinato de sodio -NaCAS- o aislado de proteínas de soja -SPI-) y de galactomananos (LBG, GG y GT), obteniendo un volumen constante de mezclas de proteínas 3 o 5 % P/P y polisacárido variable (0-0,5 % P/P), completando el volumen con agua destilada. La gelación ácida se inició por la adición de GDL en cantidad tal para obtener una relación %P/P de GDL / %P/P proteína de 0,5. Como colorante fluorescente se utilizó Rodamina B (2×10^{-4} % P/V) respetando una relación de 66 μg de Rodamina por g de proteína, la que se adicionó inmediatamente antes de la GDL. Posteriormente, 80 μL de cada muestra se colocaron en placas LAB-TEK II de 8 compartimientos y se dejaron gelificar a temperatura constante, manteniendo la humedad controlada. Luego se tomaron imágenes digitales con un microscopio confocal de barrido láser NIKON TE2000E (Nikon Instruments Inc., EUA) con láser de He-Ne, excitación a 543 nm y banda de emisión 605–675 nm, aplicando un zoom 4 sin pérdida de resolución. El objetivo utilizado fue de 40.0 (Plan Apochromat). Los archivos de las imágenes se adquirieron con una resolución en píxel de 1024 1024 y se almacenaron con el programa EZ-C1. Por último, estas imágenes se convirtieron al formato TIFF para su posterior análisis. Durante el proceso de adquisición de las imágenes se realizó un promedio de estas para eliminar el ruido aleatorio generado por los componentes electrónicos del equipo.

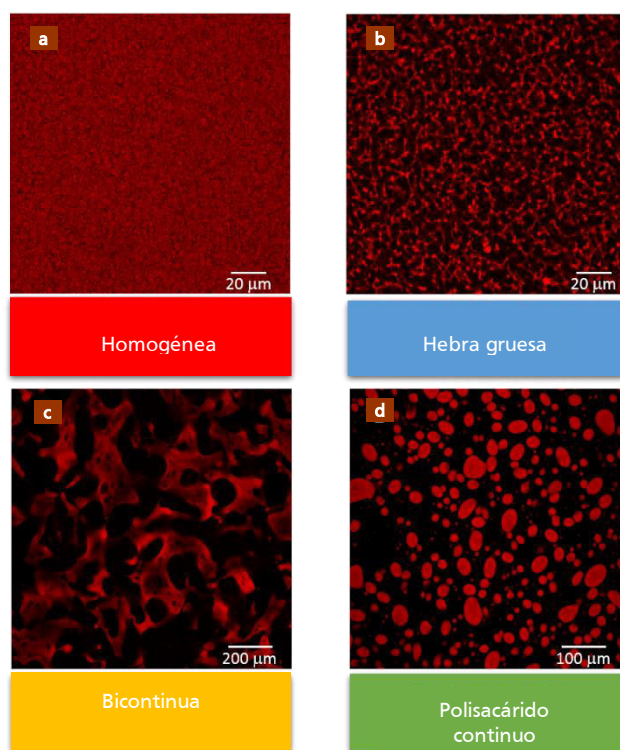


Figura 1. Imágenes digitales de geles ácidos de mezclas de proteínas y galactomananos, obtenidas por CLSM utilizando Rodamina B como marcador fluorescente. A) SPI 3 % P/P, B) SPI 3 % P/P / LBG 0,4 % P/P, C) NaCAS 5 % P/P / GG 0,25 % P/P y D) SPI 3 % P/P / GT 0,3 % P/P.

En la Figura 1 se puede observar que la malla de red proteica aparece en color rojo, ya que la Rodamina B se une a las proteínas, mientras que las zonas en color negro corresponden a los intersticios o poros y/o la fase continua de galactomanano. En la Figura 1A se muestra una red de gel de SPI (3 % P/P), en ausencia de galactomanano, donde se distingue una microestructura "homogénea", compacta y con poros pequeños. En la Figura 1B, el gel mixto formado por la mezcla de SPI (3 % P/P) y LBG (0,4 % P/P), posee una red de proteínas que esta menos interconectada y discontinua, también presenta poros más grandes esto se conoce como microestructura de "gel de hebra gruesa", donde la proteína forma una red gruesa e isotrópica, la cual está homogéneamente a través de la fase no proteica, y no una red compacta como en ausencia galactomanano. El gel mixto de NaCAS 5 % P/P / GG 0,25 % P/P no posee conectividad de la red proteica (Figura 1C), presentando una microestructura de "gel bicontinuo", en la que la fase no proteica forma canales continuos a través de la fase proteica. Por último, para el gel mixto SPI (3 % P/P) / GT (0,3 % P/P) de la Figura 1 D, puede observarse una microestructura de "polisacárido continuo", con formación de estructuras proteicas esféricas que están incorporadas en una fase continua rica en GT que serían emulsiones W/W de SPI en la solución acuosa de GT estabilizadas como dispersiones coloidales de partículas de microgel.

4.2. Evaluación de la microestructura de geles de *Aloe vera* y nanopartículas de dióxido de titanio mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para la elaboración de compósitos se han usado varios biopolímeros como las proteínas y los polisacáridos; en estos últimos se encuentran los mucílagos. Éstos son biopolímeros extraídos de cactáceas constituidos de moléculas ramificadas de alto peso molecular que forman enlaces intermoleculares y tienen la capacidad de formar soluciones viscoelásticas, geles y matrices. Los biocompósitos están formados con al menos un polímero natural y un biomaterial, y entre ellos constituyen una estructura tridimensional conocida como matriz (34). Para la elaboración de ésta se han usado varios biopolímeros de entre los cuales destacan algunas proteínas y los polisacáridos; las gomas y los mucílagos se encuentran entre los polisacáridos más usados (35). Los mucílagos son biopolímeros extraídos de cactáceas y de algunas semillas, tienen moléculas ramificadas de alto peso molecular que forman enlaces intermoleculares y son tienen la capacidad de retener agua en su estructura (36). Además, tienen la capacidad de formar soluciones viscoelásticas, geles y matrices (37). Particularmente, el mucílago de *Aloe barbadensis* Miller ha sido muy estudiado debido a las características fisiológicas y biológicas que presenta (38).

Los geles de mucílago de *Aloe barbadensis* Miller fueron elaborados al 4 % p/p para la elaboración de los compósitos y con diferentes concentraciones de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂); 0, 5, 15 y 25 % p/p con respecto a la concentración de mucílago, en el agua tridestilada y se sometieron a sonicación por 30 min. Después, las suspensiones se pusieron en una parrilla de calentamiento (marca Thermo Scientific) con agitación magnética constante y se aumentó la temperatura de la parrilla hasta 45 °C, cuando se alcanzó dicha temperatura, la cantidad de mucílago se adicionó a cada una de las suspensiones; posteriormente se aumentó la temperatura de la parrilla hasta 58 ± 2 °C. Una vez alcanzada ésta, los compósitos se mantuvieron en la parrilla por 10 min, después se retiraron y se dejaron enfriar 18 h a temperatura ambiente antes de su caracterización. La caracterización de los compósitos consistió en el estudio microestructural mediante microscopía electrónica de barrido.

El tamaño del poro de la microestructura del gel con (TiO₂) se determinó usando la técnica de microscopía electrónica de barrido, para ello se utilizó un microscopio de la serie EVO LS 10 marca Carl Zeiss, este equipo permite observar las partículas sin una preparación previa, antes de su análisis en el microscopio electrónico. Las condiciones de trabajo para determinar el tamaño de las partículas fueron 10000 y 15000X de magnificación y alto vacío usando un detector de electrones retrodispersos. Para el procesamiento de imágenes las micrografías fueron analizadas mediante el software Image J v. 1.44, con este se cuantificó la distribución de las nanopartículas de TiO₂ en el compósito de Aloe; además, se determinó los parámetros de entropía, contraste, segundo momento angular y su dimensión fractal de textura.

Para la determinación de la microestructura y distribución de partículas dióxido de titanio en los compósitos se procedió a elaborar estos materiales de acuerdo con lo presentado anteriormente. Después, las muestras fueron colocadas en un ultracongelador (PH85-5 So- Lo) por un periodo de 20 h y posteriormente fueron secadas en una liofilizadora 30 (LabConco) operando a una temperatura de -40 °C y una presión de 7x10⁻⁵ bars para conservar la estructura formada entre las moléculas del biopolímero y las nanopartículas de TiO₂. Para este estudio se utilizó el equipo de microscopía electrónica de barrido antes descrito, la captura de las

micrografías se realizó a presiones variables, con magnificaciones de 100 y 500X, se usó un detector de electrones retrodispersos y un detector de elementos químicos.

La determinación de tamaño de los aglomerados de nanopartículas formados en los compósitos se caracterizó mediante la formación de redes tridimensionales en cada uno de ellos; para estos se liofilizaron los compósitos y una vez deshidratados se obtuvieron micrografías de éstos para visualizar las estructuras formadas por el mucílago y las interacciones que éste tuvo con las nanopartículas de TiO_2 . Dichas micrografías se ilustran en la Figura 2, como se puede observar, las superficies de las muestras presentaron una rugosidad con presencia de poros, los cuales fueron aumentando en tamaño conforme se incrementó la concentración de nanopartículas de TiO_2 en los compósitos. Para el caso de los compósitos con el 15 y 25 % de nanopartículas, los poros tuvieron una forma alargada y las estructuras de las muestras formaron un laminado más ordenado a diferencia de los compósitos sin nanopartículas y con la concentración del 5 %, los cuales mostraron una cantidad menor de poros con un tamaño más reducido y estructuras menos ordenadas.

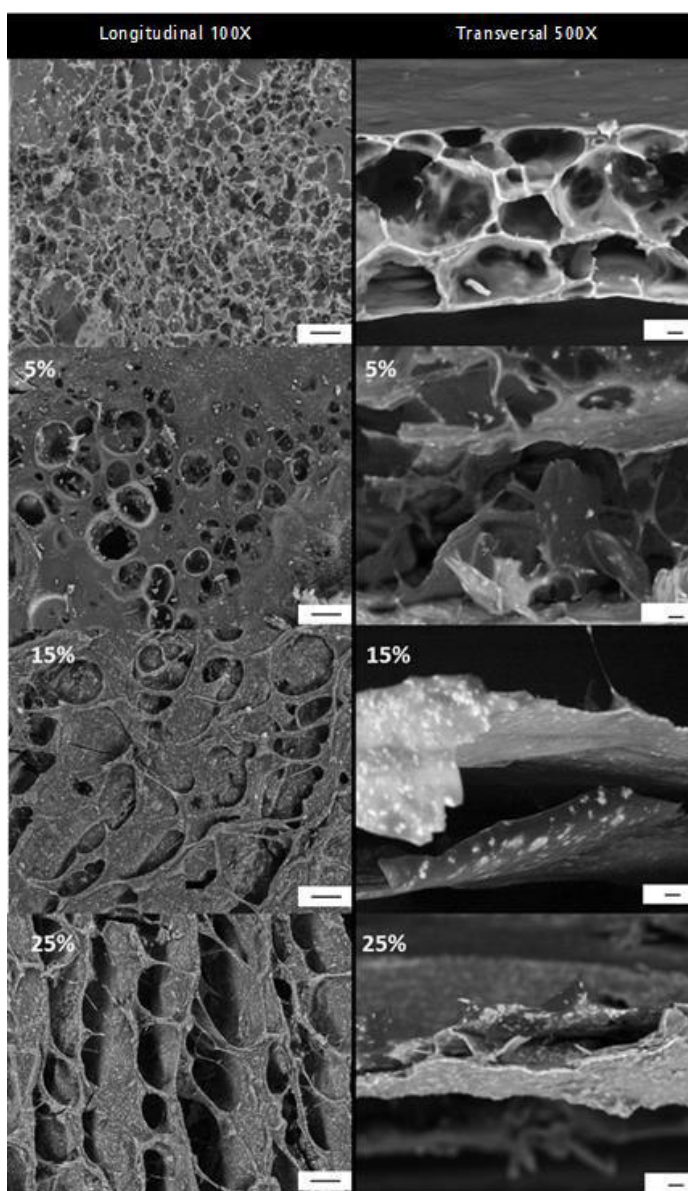


Figura 2. Micrografías de MEB de los compósitos liofilizado de mucílago de *Aloe barbadensis* Miller con diferentes concentraciones de nanopartículas de dióxido de titanio. Barra de referencia: 100 μm

Debido a lo anterior, se procedió a realizar el análisis de las imágenes de las diferentes micrografías, de éste se determinó: la entropía, la textura, el tamaño de poro y la circularidad de los poros. Del análisis se demostró de manera cuantitativa el aumento en el tamaño de poro y la disminución de la circularidad de éstos, este efecto posiblemente fue debido a que mientras se aumenta la concentración de las nanopartículas a los compósitos, la interacción de los componentes que los constituyen fomentaron la formación de poros en forma de placas o laminas como se puede apreciar en la Figura 2, como se puede ver en los valores de los diferentes parámetros obtenidos del análisis de las imágenes, los cuales se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis morfométrico de las micrografías de los compósitos de mucílago de Aloe *Barbadensis* Miller con diferentes concentraciones de nanopartículas de dióxido de titanio

Muestra-concentración (p/p)	Entropía	DF textura	Tamaño Promedio porosidad (longitud máxima en μm)	Circularidad de la porosidad
4 % Mucílago	8.866	2.555	34.17	0.7
4 % Muc + 5 % TiO_2	8.902	2.584	105.19	0.38
4 % Muc + 15 % TiO_2	8.943	2.512	153.72	0.21
4 % Muc + 25 % TiO_2	8.838	2.499	253.73	0.15

Por otro lado, las interacciones intermoleculares que se formaron en los compósitos son debidas a la unión de las nanopartículas de dióxido de titanio con los grupos OH presentes en el mucílago de Aloe (39), este autor usó un molde a una cadena de DNA para la formación de nanotubos y la unión a los diferentes grupos del mucílago de los que destacan (T-O, T-C, T-H₂N), esta interacción se demostró por la desaparición de varios grupos funcionales mediante espectroscopia por infrarrojo del mucílago y la presencia con mayor intensidad de algunos picos, los cuales están relacionados con enlaces del titanio. Resultados similares fueron reportados por Ochoa *et al.*, 2009 (40).

Debido a las interacciones de fisicoquímicas entre las nanopartículas de dióxido de titanio hubo cambios morfométricos en la estructura de los compósitos, los cuales están relacionados con el tamaño de los poros presentes en las muestras liofilizadas. El tamaño de los poros que se observar en los compósitos liofilizados fueron de mayor tamaño cuando éstos tenían un alto contenido de nanopartículas con respecto a los compósitos sin y con 5 % de partículas.

El aumento en el tamaño de los poros fue de 71.01, 119.54 y 219.55 μm para los compósitos elaborados con 5, 15 y 25 % de nanopartículas, respectivamente. Estos cambios son esenciales en la caracterización de estructuras como lo evaluaron Tapia-Ochoategui *et al.*, 2011 (41), en donde se observaron cambios morfométricos en las vainas de vainilla. Por otro lado, los cambios morfométricos y las características físicas de los compósitos se vieron modificados, dicho efecto se observa claramente en aumento en los tiempos de relajación y esfuerzos se cedencia.

5. Conclusiones

La microscopía CLSM permite distinguir diferentes microestructuras de geles mixtos de proteínas y polisacáridos, lo que implica la obtención de geles con diferentes texturas y la posibilidad de utilizar algunas de ellas para microencapsular compuestos bioactivos.

Por otra parte, la microscopía electrónica de barrido ayuda a observar la microestructura de los compósitos donde se aprecia la rugosidad, su porosidad y como estos compósitos se vieron afectados por la concentración de las nanopartículas.

Agradecimientos

Proyectos de la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional 20160347, 20170470, CONACYT, CONICET y a la Facultad de Farmacia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

Referencias

1. Alves, E., Gilvaine Ciavareli, L., Pozza, E., & de Carvalho Alves, M. (2012). Scanning Electron Microscopy for Fungal Sample Examination. In: *Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology*. (p. 133-150) Springer Science & Business Media.
2. Bozzola, J.J., & Russell, L.D. (1999). *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2a ed. Jones & Bartlett Learning.
3. Mannheimer, W.A. (2002). *Microscopía de materiales: una introducción*. Río de Janeiro. Y Papeles Servicios editoriales.
4. Amaral, D.C., Alves, E., Costa, F.F., Resende, J.V., Abreu, L.R., & Ramos, T.M. (2016). *Introducción al análisis microestructural de productos lácteos*. Juiz de Fora. Associate Publisher.
5. Tipler, P.A., y Macedo, H. (2010). *Física para científicos e ingenieros. Óptica y física Moderna*. 3ª ed. Río de Janeiro. Guanabara Koogan.
6. Trejo, R., Dokland, T., Jurat-Fuentes, J., & Harte, F. (2011). Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. *Journal of dairy science*, *94*, 5770-5775.
7. Auty, M., Twomey, M., Guinee, T., & Mulvihill, D. (2001). Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *The Journal of dairy research*, *68*, 417-427 .
8. Abhyankar, A.R., Mulvihill, D., & Auty, M. (2011). Combined microscopic and dynamic rheological methods for studying the structural breakdown properties of whey protein gels and emulsion filled gels. *Food Hydrocolloids*, *25*, 275-282.
9. Panouillé, M., Saint-Eve, A., Loubens, C., Déléris, I., & Souchon, I. (2011). Understanding of the influence of composition, structure and texture on salty perception in model dairy products. *Food Hydrocolloids*, *25*, 716-723.
10. Caillet, A., Cogne, C.J., Laurent, P., & Rivoire, A. (2003). Caracterización de la estructura del helado por microscopía óptica directa. Influencia de la congelación Parámetros. *Ciencia y tecnología de Alimentos*. *36*, 743-749.
11. Spagnuolo, P.A., Dalglish, D., Goff, H.D., & Morris, E. (2005). Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, *19*, 371-377.
12. Dalglish, D.G., Spagnuolo, P.A., & Goff, H.D. (2004). Una posible estructura del Caseína micelle basada en microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisiones de campo. *Revista Internacional de lácteos*, *14*, 1025-31.
13. Costa, F.F., Resende, J.V., Abreu, L.R., & Goff, H.D. (2008). Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. *Journal of dairy science*, *91* 6, 2165-2174.
14. Costa, F.F., Resende, J.V., & Abreu, L.R. (2014). Investigação microscópica da estrutura do leite adicionado de polissacarídeos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, *32*(1), 145-150.
15. Goff, H.D., Verespej, E., & Smith, A. (1999). A study of fat and air structures in ice cream. *International Dairy Journal*, *9*, 817-829.
16. Alves, Y., Pascholati, S.F., & Llet, B. (2001). Formación de biofilms bacterianos en la superficie de poliestireno: una metodología para el microscopio electrónico de barrido. En: *XVIII Congreso de la sociedad brasileña de microscopía y microanálisis*. Águas de Lindóia-SP. Acta Microscopica. (p. 155-156). São Carlos-SP, Sociedad brasileña de Microscopía y microanálisis.
17. Smith, A., Goff, H.D., & Sun, B. (2004). Freeze-substitution and low-temperature embedding of dairy products for transmission electron microscopy. *Journal of Microscopy*, *213*, 63-69
18. Gonzalez, R.C. & Woods, R.E. (1992). *Digital Image Processing*. Addison-Wesley, Massachusetts.
19. Rosenfeld, A. (1976). *Digital picture processing*. Academic press.
20. Burger, W., & Burge, M.J. (2016). *Digital image processing: an algorithmic introduction using Java*. Springer.
21. Sun, D.W. (2016). *Computer vision technology for food quality evaluation*. Academic Press.
22. Cheftel, J.-C., Cuq, J.L., y Lorient, D. (1989) *Proteínas Alimentarias*. Zaragoza. Editorial Acribia.
23. De Kruif, C.D. (1997). Skim Milk Acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, *185*, 19-25.
24. Stieger, M., & Velde, F.V. (2013). Microstructure, texture and oral processing: New ways to reduce sugar and salt in foods. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *18*, 334-348.

25. Tolstoguzov, V. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468.
26. Turgeon, S., Beaulieu, M., Schmitt, C., & Sánchez, C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 401-414.
27. Corredig, M., Sharafbafi, N., & Kristo, E. (2011). Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25, 1833-1841.
28. Hidalgo, M.E., Fontana, M., Armendáriz, M., Riquelme, B., Wagner, J., & Risso, P. (2014). Acid-Induced Aggregation and Gelation of Sodium Caseinate-Guar Gum Mixtures. *Food Biophysics*, 10, 181-194.
29. Aspinall, G.O. (1959). Structural chemistry of the hemicelluloses. *Advances in carbohydrate chemistry*, 14, 429-68 .
30. Dea, I.C., & Morrison, A. (1975). Chemistry and Interactions of Seed Galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 241-312.
31. Esquena, J. (2016). Water-in-water (W/W) emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 25, 109-119.
32. van den Berg, L., van Vliet, T., van der Linden, E., van Boekel, M.V., & van de Velde, F.V. (2007). Breakdown properties and sensory perception of whey proteins/polysaccharide mixed gels as a function of microstructure. *Food Hydrocolloids*, 21, 961-976.
33. Hassan, A., Frank, J., Farmer, M.A., Schmidt, K., & Shalabi, S.I. (1995). Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*, 78, 2629-2636.
34. Soulestin, J., Quiévy, N., Sclavons, M., & Devaux, J. (2007). Polyolefins-biofibre composites: A new way for an industrial production. *Polymer Engineering and Science*, 47, 467-476.
35. Villada, H.S., Acosta, H.A., y Velasco, R.J. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas agrarios*, 12(2).
36. Saag, L.M., Sanderson, G., Moyna, P., & Ramos, G. (1975). Cactaceae mucilage composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, 993-1000.
37. Medina-Torres, L., García-Cruz, E., Calderas, F., Laredo, R., Sánchez-Olivares, G., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., & Rodríguez-Ramírez, J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *Lwt - Food Science and Technology*, 50, 642-650.
38. Lobo, R., Prabhu, K.S., Shirwaikar, A., Ballal, M., & Balachandran, C. (2010). A HPTLC densitometric method for the determination of aloeverose in Aloe vera gel. *Fitoterapia*, 81, 231-233.
39. Monreal, H. (2005). Obtención de (Nanocilindros) de TiO₂ dirigido por ADN mediante sol-gel. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*, 6 (23), 21.
40. Ochoa, Y., Ortegón, Y., Vargas, M., & Páez, J.R. (2009). Síntesis de TiO₂, fase anatasa, por el método Pechini. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 3, 931-937.
41. Tapia-Ochoategui, A.P., Camacho-Díaz, B., Perea-Flores, M.J., Ordóñez-Ruiz, I.M., Gutiérrez-López, G., & Dávila-Ortiz, G. (2011). Cambios morfométricos durante el beneficio tradicional de las vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*, Orchidaceae) en México. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 10, 105-115.

Capítulo 21

Evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos en alimentos funcionales: Modelos de digestión *in vitro*

Camilo Eduardo Sandoval-Cuellar, María Ximena Quintanilla-Carvajal*

Universidad de La Sabana, Facultad de Ingeniería. Chía. Colombia.
*mariaxiquintanilla@gmail.com; maria.quintanilla1@unisabana.edu.co

Resumen

El proceso digestivo comprende una serie de etapas interdependientes mediante las cuales un alimento se reduce a compuestos más sencillos que pueden ser absorbidos y utilizados por el cuerpo. Entendiendo este proceso, es posible diseñar alimentos con propiedades nutricionales y saludables mejoradas. Los modelos de digestión *in vitro* se han convertido en una herramienta útil para determinar la bioaccesibilidad de un nutriente o un compuesto bioactivo en el tracto gastrointestinal, es así como cada vez están siendo más utilizados para evaluar los posibles efectos que la composición, estructura y procesamiento de los alimentos sobre este parámetro. Los métodos estáticos son los modelos más sencillos, prácticos y rápidos para llevar a cabo pruebas de digestión de alimentos, y permiten obtener evidencia preliminar para realizar *claims* y conducir nuevas hipótesis en futuras investigaciones. En este documento, se hace una breve introducción a los modelos *in vitro* de digestión humana y se presentan dos de ellos que han tenido una amplia acogida en la comunidad científica. El primero, el protocolo armonizado de la red COST INFOGEST, busca tener un alcance general y ser aplicado a distintos tipos de alimentos, realizando las adaptaciones y ajustes apropiados. La red ha promovido su uso de forma que los experimentos puedan ser reproducibles y los resultados generalizables entre los diferentes equipos de investigación. El segundo modelo que se presenta es el desarrollado por David Julián McClements y su equipo de la Universidad de Massachussets. Este modelo es aplicado para la digestión de lípidos y particularmente al estudio de sistemas de encapsulación de bioactivos lipofílicos. Se espera que la información suministrada contribuya al avance de la investigación y al desarrollo de alimentos funcionales a partir de los recursos autóctonos de la región.

1. Introducción

La digestión constituye un proceso biológico complejo. Comprende una serie de etapas interdependientes que permiten la liberación de nutrientes desde la matriz alimentaria, para su eventual absorción y transporte vía circulatoria hasta los diferentes tejidos y órganos donde serán utilizados, bien sea para crecimiento y mantenimiento, o como fuente de energía (1). Estas etapas ocurren dentro del tracto gastrointestinal (TGI), el cual junto a otros órganos y glándulas auxiliares conforman el sistema digestivo humano (Figura 4). El TGI puede dividirse en dos secciones: el tracto superior, compuesto por la boca, el esófago, el estómago y el intestino delgado (duodeno, íleo y yeyuno), y el tracto inferior compuesto por el ciego, el colon, el recto y el canal anal, los cuales constituyen el intestino grueso (2). Cada una de estas partes tiene su propia función en el procesamiento de la comida, siendo la boca y el estómago los principales responsables de disminución de tamaño y solubilización de nutrientes, mientras que el intestino delgado se encarga de la digestión fina, absorción y transferencia de nutrientes al sistema circulatorio (1,3).

Se ha observado que los procesos fisicoquímicos que gobiernan la digestión de los alimentos y el tránsito de las sustancias resultantes a través de las paredes del TGI, tienen un efecto sobre la velocidad y la eficiencia de su absorción por parte de las células (4). Este conocimiento ha estimulado el interés de los científicos de alimentos en entender y controlar la digestión mediante la composición y estructura de los alimentos, de modo que ciertos componentes de interés puedan ser entregados en el momento y lugar apropiado dentro del TGI (5). Este interés responde a un cambio de paradigma en el concepto de alimento, el cual ha evolucionado desde la mera satisfacción de necesidades nutricionales y el énfasis en los atributos hedónicos, a la influencia que este puede tener sobre la salud (6). Es así como la investigación en ciencia de alimentos ha tornado al desarrollo de alimentos funcionales,

incorporando compuestos con actividad biológica así como la extracción de compuestos perjudiciales con objetivos dietarios (e.g. intolerancia a la lactosa y celiaquía) o para proporcionar protección contra enfermedades e incluso ayudando en su tratamiento (7).

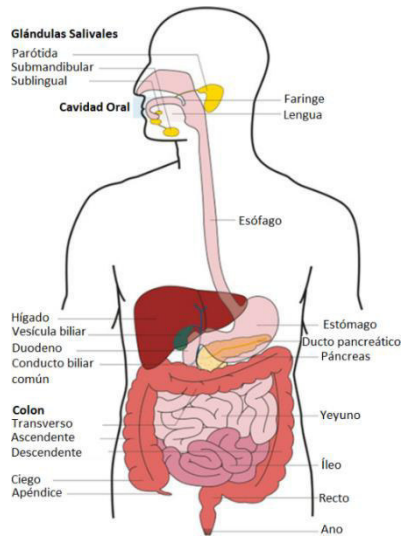


Figura 4. Sistema digestivo. Modificado de Verhoeckx & Cotter, 2015 (2)

Factores como el creciente riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el estilo de vida (e.g. cáncer, diabetes, obesidad e hipertensión), el costo del cuidado de la salud cada vez más elevado, el envejecimiento de la población y la toma de conciencia de los consumidores respecto a la influencia que tienen la alimentación sobre su salud, han creado un ambiente propicio para el desarrollo de productos funcionales (7,8). Adicionalmente, las declaraciones de propiedades funcionales en un alimento representan un factor diferenciador que interesa a la industria alimentaria ante la posibilidad de aumentar los márgenes de ganancia ya de por sí bastante estrechos (6). Sin embargo, muchos de los compuestos bioactivos que se incorporan en los alimentos funcionales como vitaminas, carotenoides, antioxidantes, aceites esenciales, *flavors* y compuestos aromáticos, son hidrofóbicos o poco solubles en agua, lo cual dificulta su incorporación en matrices alimentarias. Adicionalmente suelen ser susceptibles a degradación por varias condiciones ambientales y de proceso, así como a condiciones gastrointestinales de pH, temperatura y presencia de enzimas, disminuyendo drásticamente su biodisponibilidad (9). Por lo tanto, para poder realizar *claims* respecto a las propiedades nutricionales y saludables de un alimento, es necesario mostrar evidencias de que un compuesto bioactivo está realmente biodisponible en el organismo después de la digestión de un alimento (10).

El término biodisponibilidad se define como la fracción de un componente ingerido que está disponible para su utilización en el sitio de acción en una función fisiológica normal como resultado de tres pasos principales: i) digestión y solubilización de los elementos en el TGI, ii) la absorción de dichos elementos y su transporte vía circulatoria y iii) su incorporación en el tejido objetivo (10). La biodisponibilidad, entonces, comprende dos conceptos adicionales: bioaccesibilidad y bioactividad. El primero de ellos, bioaccesibilidad, se define como la fracción de un nutriente que es liberada desde la matriz alimentaria dentro del tracto gastrointestinal y está por lo tanto disponible para su absorción a través de las paredes intestinales (11). De este modo, la bioaccesibilidad comprende los eventos desde la ingesta del alimento, su solubilización en el TGI y la liberación de los bioactivos en el sitio donde se dará su absorción. La bioactividad por otro lado comprende los eventos desde la absorción del bioactivo, su transporte vía circulatoria hasta el sitio de acción y su interacción con biomoléculas, las transformaciones que pueda experimentar y las respuestas fisiológicas que se puedan inducir (12) (Figura 5).

Debido a restricciones éticas y prácticas, la biodisponibilidad de un nutriente suele identificarse como la fracción de éste que alcanza el sistema circulatorio, sin considerar su bioactividad (13), por lo tanto, se requieren ensayos *in vivo* para su medición. Dichas pruebas suelen ser costosas, dispendiosas e implican consideraciones éticas importantes al involucrar ensayos en animales que posteriormente deben ser

sacrificados, o requerir ensayos en humanos, que involucran compuestos cuya potencial peligrosidad no ha sido establecida (1). Por otro lado, muchas veces los datos obtenidos de estos ensayos tienen una alta variabilidad intersujeto y las conclusiones son difícilmente generalizables (10, 12, 14). Sin embargo, la bioaccesibilidad de un bioactivo puede ser establecida mediante procedimientos *in vitro*, como una aproximación al comportamiento de un alimento en el TGI, con propósitos predictivos y para establecer tendencias que permitan conducir hipótesis en futuras investigaciones. Estos modelos buscan emular condiciones gastrointestinales como concentración de sales, presencia de enzimas, temperatura corporal y pH en diferentes etapas del proceso digestivo, para estudiar los efectos de las condiciones de proceso o la estructura de la matriz, por ejemplo, sobre la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos y la estabilidad de los sistemas durante su tránsito por el aparato digestivo (14). A través de los años, un gran número de modelos de digestión *in vitro* han sido desarrollados y utilizados para determinar la bioaccesibilidad de nutrientes como una forma de estimar la biodisponibilidad de los compuestos testeados. Estos modelos van desde métodos tan simples como reacciones enzimáticas en un *beaker* hasta modelos dinámicos sofisticados como el TIM-1, y la aplicación de estos modelos ha sido tan amplia como la diversidad de modelos existentes (2).

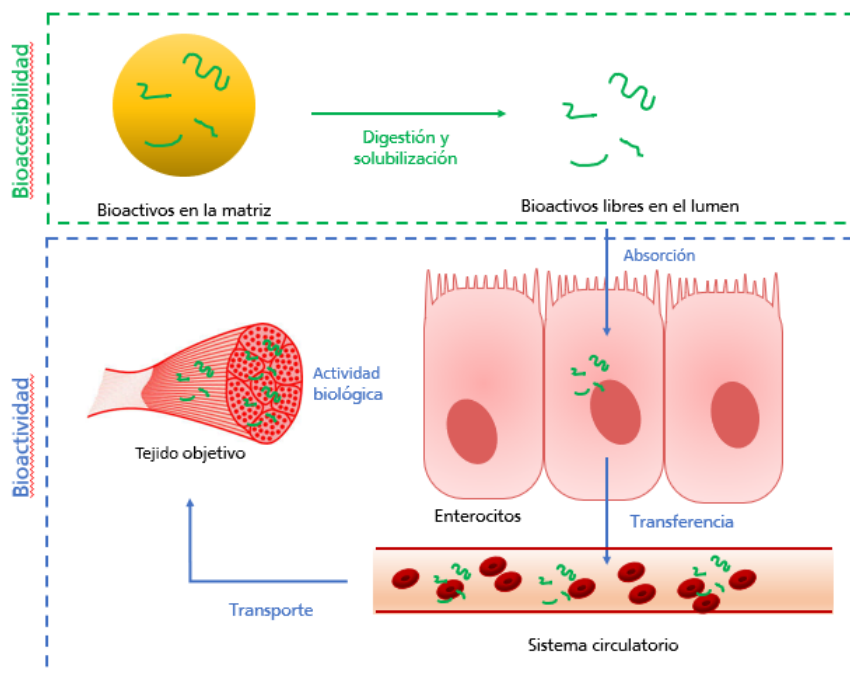


Figura 5. Biodisponibilidad de un compuesto bioactivo dividida en los eventos que constituyen la bioaccesibilidad (en verde) y la bioactividad (azul)

2. Modelos de digestión *in vitro*

Los métodos de digestión *in vitro* (IVD) son modelos del tracto gastrointestinal que tratan de imitar condiciones fisiológicas *in vivo* teniendo en cuenta la presencia y concentración de enzimas digestivas, condiciones de pH, tiempos de digestión, concentración de sales, entre otros factores, considerando generalmente tres áreas: boca, estómago e intestino delgado (12). Estos métodos son particularmente relevantes para determinar los efectos de la estructura química del compuesto bioactivo, la morfología del alimento, interacciones con otros componentes y condiciones físicas y biológicas del procesamiento (1). Deben ser flexibles, proveer resultados precisos en un corto tiempo y por lo tanto permitir un análisis rápido de alimentos con diferentes composiciones y estructuras (11).

Durante la aplicación de un modelo de digestión *in vitro*, los nutrientes o compuestos bioactivos de interés deben ser monitoreados para determinar si están siendo afectados por las condiciones digestivas o si, por otro lado, están interactuando en otros componentes del alimento o entre ellos

(12). Para este fin varias metodologías pueden ser empleadas, como por ejemplo el método pH-Stat durante la fase intestinal para monitorear la liberación de ácidos grasos o aminoácidos (15-16). El uso de modelos *in vitro* permite adicionalmente, determinar la cantidad de nutrientes o compuestos bioactivos que fueron liberados durante la digestión, que puede ser asimilada por las células epiteliales del intestino (i.e. enterocitos), mediante la incorporación de modelos *in vivo* (e.g. perfusión intestinal), técnicas *ex vivo* y modelos de cultivo celular (e.g. Caco-2), después de la fase intestinal (12).

Los modelos de digestión *in vitro* se dividen en dos tipos: estáticos y dinámicos. La diferencia entre ambos, radica en que mientras los estáticos parten de condiciones iniciales con valores medios y constantes, los modelos dinámicos incluyen variación de los parámetros en el tiempo y tratan de acercarse a las condiciones *in vivo* simulando el flujo de fluidos digestivos, tiempos de vaciado gástrico y movimientos peristálticos entre otros aspectos (17). En general, los métodos estáticos son los modelos más ampliamente usados (11) puesto que son más simples, económicos, prácticos y permiten una primera aproximación al comportamiento de un alimento funcional durante la digestión. En la Tabla 6 se muestra una comparación general entre los dos tipos de modelos de digestión humana.

Tabla 6. Comparación entre modelos de digestión *in vitro* estáticos y dinámicos para aplicación en alimentos. Modificado de Lucas-González *et al.*, 2018 (11)

Modelo estático	Modelo dinámico
<i>Tipo de estudio</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Aplicable a digestión limitada (etapa gástrica y/o intestinal) 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicable a estudios de digestión total
<i>Tipo de alimento</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Alimento homogéneo/simple • Compuestos aislados o purificados 	<ul style="list-style-type: none"> • Alimentos complejos
<i>Principales aplicaciones</i>	
Macronutrientes	Alimentos y farmacéuticos
<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis de proteínas • Hidrólisis de lípidos • Resistencia de almidón 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación y bioaccesibilidad de nutrientes de matrices alimentarias complejas • Digestión de proteínas • Separación de lípidos • Producción de péptidos
Moléculas bioactivas	
<ul style="list-style-type: none"> • Liberación de matrices alimentarias simples • Solubilidad y bioaccesibilidad 	
<i>Principales objetivos</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Mejorar las propiedades de los alimentos • Pruebas preliminares para <i>claims</i> de propiedades nutricionales o saludables 	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto de la estructura del alimento en la liberación de nutrientes, interacción de compuestos, sobrevivencia de probióticos, liberación de probióticos, etc.
<i>Principales ventajas</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Rápido y simple • Económico • Sólo necesita ser validado a la luz de su uso previsto 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor exactitud en el ambiente dinámico del intestino: • Movimientos peristálticos • Fuerzas físicas • Fuerzas de cizalla • Permite la comparación con resultados de estudios <i>in vivo</i>
<i>Principales desventajas</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de fuerzas mecánicas que contribuyen en la digestión <i>in vivo</i> y en el cambio del ambiente digestivo • Acumulación de metabolitos que pueden interferir en la digestión 	<ul style="list-style-type: none"> • Su habilidad para simular las condiciones gastrointestinales debe ser validada

En un artículo de revisión publicado en 2018, Lucas-González y colaboradores (11) revisaron más de 2.000 artículos de digestión *in vitro* de alimentos, donde el 89 % de ellos se realizaron utilizando métodos estáticos. En estos trabajos, la digestión gástrica e intestinal era simulada en tres etapas sucesivas (oral, gástrica e intestino delgado). En cada etapa, la temperatura se mantenía a un valor determinado y se utilizaba un fluido digestivo simulado específico, mientras el pH se mantenía a un valor fijo mediante el uso de una solución tampón de sales, cuya concentración variaba dependiendo del método empleado en cada estudio. McClements y Li (2010) (18) publicaron una revisión de varios modelos que han sido

empleados para evaluar sistemas coloidales para la encapsulación de bioactivos lipofílicos. En él se reportan un gran número de condiciones de estudio diferentes entre los modelos de digestión empleados. Por su parte, Hur y colaboradores (2011)(19) revisaron alrededor de 80 trabajos en digestión *in vitro*, reportando diferencias importantes entre los métodos de digestión utilizados, siendo la composición de los fluidos digestivos y el número de etapas (e.g. boca, estómago e intestino) de las más importantes. Los autores también reportan que las enzimas y moléculas biológicas más frecuentemente utilizadas son la pepsina, pancreatina, tripsina y quimotripsina, -amilasa, lipasa, sales biliares y mucina (19). Pese a su aparente simplicidad, el hecho de que cada equipo de investigación utilice su propio método de digestión estático y la falta de consenso en las condiciones fisiológicas empleadas para realizar los estudios, han dificultado el avance en este campo, pues los resultados obtenidos son difícilmente comparables y conclusiones generales no pueden ser obtenidas. Para tratar de solventar este problema, la red COST INFOGEST ha propuesto un protocolo estático de digestión *in vitro* armonizado basado en condiciones fisiológicas consideradas relevantes, el cual puede ser aplicado y adaptado a varios tipos de alimentos.

3. Aplicación de métodos estáticos de digestión *in vitro*

Como ya se ha dicho, los métodos de digestión estáticos permiten realizar evaluaciones rápidas sobre matrices alimentarias sencillas y establecer efectos de composición, estructura y procesamiento sobre la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos y nutrientes. Sin embargo, fallan al reproducir el ambiente *in vivo* que cambia continuamente y parámetros físicos como movimientos peristálticos y fuerzas de cizallamiento, entre otros. Pese a estas limitaciones, es una herramienta muy útil y económica para realizar predicciones y evaluar tendencias en el comportamiento de un alimento en el TGI. Sería imposible abordar en detalle todos los modelos que han sido utilizados hasta la fecha, sin embargo, se puede hacer mención a dos métodos que han tenido una amplia aceptación y aplicación en cuanto a estudios de digestión de alimentos se refiere: i) el modelo publicado por la red COST INFOGEST en 2014 (14), el cual pretende tener un alcance general y cuya utilización ha sido incentivada desde la red, y ii) el modelo propuesto por David coloidales para y su equipo (15), quienes han sido prolíficos en el estudio de sistemas de encapsulación de compuestos lipofílicos.

Protocolo armonizado INFOGEST

La red COST INFOGEST nace con el objetivo de ampliar el conocimiento científico sobre cómo los alimentos son desintegrados durante la digestión, de modo que se puedan diseñar alimentos funcionales con mejores propiedades nutricionales (20). La red cuenta con la participación de más de 140 institutos de investigación ubicados en 41 países. Uno de los productos obtenidos por la red es un modelo estático basado en condiciones gastrointestinales fisiológicamente relevantes, el cual fue publicado en 2014 con el ánimo de uniformizar los métodos existentes y que los resultados de los estudios en diferentes laboratorios sean comparables entre sí (14). El modelo contempla tres fases (oral, gástrica e intestinal), para cada una de las cuales se simula el fluido digestivo correspondiente mediante una solución madre de electrolitos (SME) estandarizada y enzimas. Para la preparación de las SMEs se utilizan las sales correspondientes disueltas en agua Milli-Q, deben prepararse a 1,25 veces la concentración recomendada de modo que al realizarse el ensayo la mezcla con los demás ingredientes proporcione la concentración apropiada (i.e. 4 partes de solución madre de electrolitos más una parte de agua da la composición iónica correcta en el fluido digestivo simulado). En la Tabla 7 se presentan las concentraciones de electrolitos en la SME correspondiente, junto con las enzimas que se agregan en cada fase digestiva.

Todas las enzimas, así como las sales biliares utilizadas en el modelo son de origen porcino, a excepción la α -amilasa utilizada en la fase oral, que debe ser de origen humano. Ésta puede o no agregarse durante la IVD dependiendo del contenido de almidón en la matriz. Por otra parte, las enzimas pancreáticas, pueden agregarse como extracto pancreático (pancreatina), o como enzimas individuales (i.e. tripsina, quimotripsina y lipasa pancreática). Las enzimas deben diluirse en la solución de electrolitos correspondiente y agregarse a la muestra justo antes de dar inicio a cada fase digestiva. Por otro lado, el cloruro de calcio y la bilis (Sombreadas en la tabla), deben ser agregadas directamente a la muestra cuando el experimento se esté llevando a cabo.

Tabla 7. Concentración de electrolitos en el fluido salivar simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS) (14)

	FSS pH 7	FGS pH 3	FIS pH 7
Constituyente	mmol/L	mmol/L	mmol/L
Cloruro de Potasio	15,1	6,9	6,8
Fosfato monobásico de Potasio	3,7	0,9	0,8
Bicarbonato de Sodio	13,6	25	85
Cloruro de Sodio	-	47,2	38,4
Cloruro de Magnesio	0,15	0,12	0,33
Carbonato de amonio	0,06	0,5	-
Cloruro de Calcio*	1,5	0,15	0,6
Sales biliares*	-	-	10
Enzimas**	U/mL	U/mL	U/mL
α-Amilasa	2.000	-	-
Pepsina	-	2.000	-
Lipasa pancreática	-	-	2.000
Tripsina	-	-	100
Quimotripsina	-	-	25

* Los constituyentes sombreados deben ser agregados a la muestra cuando el experimento se esté desarrollando.

** Las enzimas deben ser diluidas en el fluido de electrolitos correspondiente y agregarse justo antes de dar inicio a la fase digestiva.

Cabe destacar que en el caso del protocolo armonizado INFOGEST, las enzimas digestivas son agregadas por unidades de actividad enzimática. Por lo tanto, las unidades de actividad específica deben ser determinadas para cada extracto que vaya a ser empleado. Los procedimientos para realizar estas pruebas pueden encontrarse en el material electrónico suplementario (ESI) del artículo de Minekus y colaboradores (2014)(14) en donde el protocolo de digestión *in vitro* fue publicado, en este mismo documento se pueden consultar detalles del modelo y recomendaciones sobre cómo adaptarlo a las diferentes muestras que se vayan a evaluar.

La Figura 7 muestra de manera general el procedimiento a seguir para aplicar el modelo INFOGEST en un estudio IVD. Cada uno de los pasos presentan alternativas que deben someterse a consideración de modo que el modelo se ajuste a los objetivos de cada investigación y el tipo de matriz a trabajar (14).

Finalmente, en la Tabla 8 se muestran algunas publicaciones realizadas con el protocolo INFOGEST, la mayoría de ellos han sido realizados laboratorios integrantes de INFOGEST. En muchos de estos trabajos se ha estudiado la hidrólisis de proteínas y péptidos, mientras que la bioaccesibilidad de carotenoides de frutas se ha estudiado en menor medida. En cuanto a la digestión de lípidos, Mat y colaboradores (2016) (21) publicaron un trabajo en el que incorporaban el método pH-Stat para el control del pH en la fase intestinal. Este método ha sido ampliamente utilizado para caracterizar la digestibilidad *in vitro* de lípido. Los datos obtenidos pueden ser interpretados para obtener la fracción de ácidos grasos libres que se liberan desde los triglicéridos durante la digestión (15). Mat y su equipo utilizan la información del pH-Stat para establecer el porcentaje de hidrólisis tanto de lípidos como de proteínas durante la digestión intestinal de emulsiones de aceite de canola estabilizadas con aislado de proteína de suero de leche (WPI) mediante un modelo matemático. Los autores muestran como al realizar algunas modificaciones al protocolo INFOGEST, es posible determinar perfiles de digestión para dos macronutrientes utilizando un montaje relativamente sencillo del método pH-Stat (21).

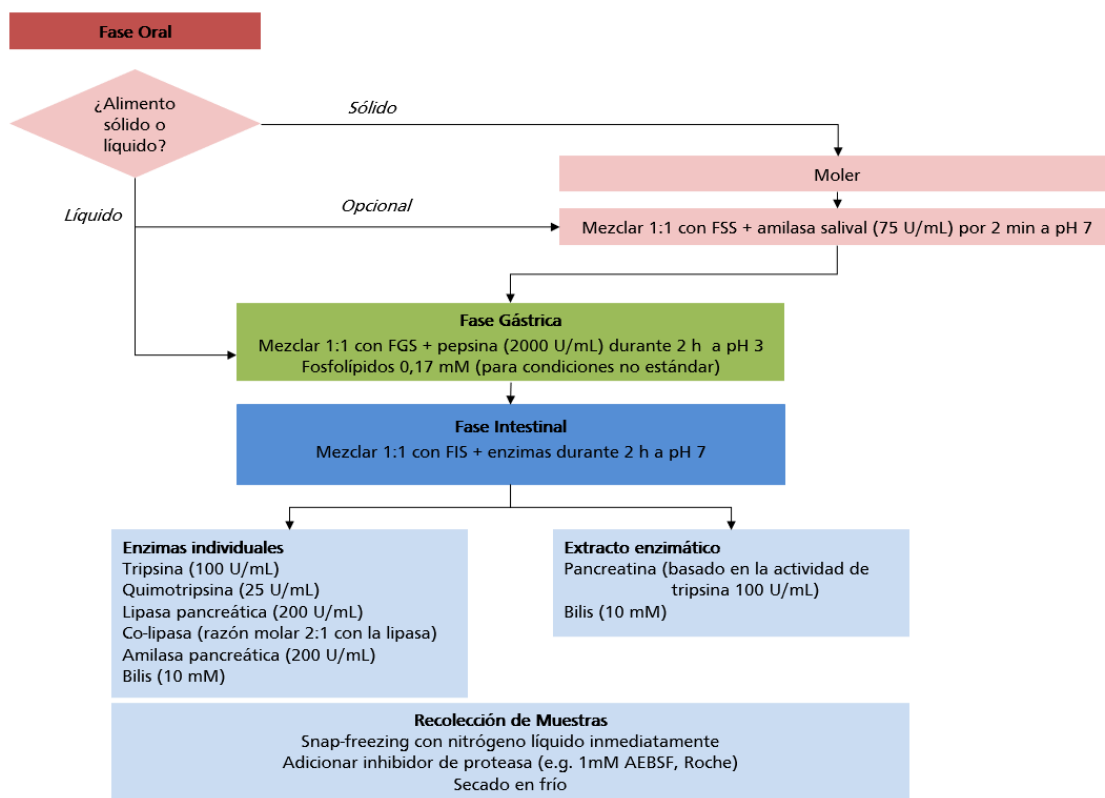


Figura 7. Diagrama de flujo del modelo de digestión *in vitro* INFOGEST. FSS, FGS y FIS se refieren al fluido salival simulado, fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado. Las actividades de las enzimas están dadas en unidades por mL de mezcla final en la fase digestiva correspondiente. Modificado de Minekus *et al.*, 2014 (14)

Tabla 8. Estudios de digestión *in vitro* en los que se utiliza el protocolo armonizado de INFOGEST

Muestra	Objetivo del estudio	Ref.
Leche de cabra y kéfir	Evaluar el efecto de la fermentación en la bioactividad de los péptidos liberados durante la IVD de la leche de cabra o el kéfir	(22)
Emulsiones de suero de leche y aceite de canola	Desarrollar un método simple y robusto para evaluar los efectos de la estructura de matrices complejas en la digestión	(21)
Byrsonima crassifolia (nance)	Adaptar en método INFOGEST para evaluar la bioaccesibilidad de los carotenoides y los ésteres de carotenoides de las frutas	(23)
Suero de leche desnatada	Determinar si la aplicación del modelo armonizado incrementa la consistencia entre los resultados de estudios inter-laboratorio	(24)
T. terrestres y garbanzo	Determinar el contenido de saponina y su bioaccesibilidad IVD en la T. terrestres y el garbanzo y su efecto inhibidor de enzimas digestivas de lípidos y carbohidratos (lipasa, α -amilasa y α -glucosidasa)	(25)
Nannochloropsis oculata	Investigar el efecto del proceso de cambio de pH y tratamientos térmicos sobre la bioaccesibilidad de las proteínas y lípidos de la N. oculata	(26)
Oligosacáridos de la lactulosa (OsLu) en polvo de leche desnatada	Estudiar el efecto de la inclusión de OsLu en la leche sobre la digestión de proteínas y los cambios en la fracción de carbohidratos utilizando un modelo IVD	(27)
Nisina	Establecer cuales fragmentos de nisina se producen durante la digestión <i>in vitro</i> y su actividad biológica	(28)

Protocolo de digestión *in vitro* para lípidos

David Julián McClements y su equipo han sido prolíficos en el estudio de la digestión de lípidos, particularmente de sistemas basados en emulsiones para encapsular bioactivos lipofílicos o poco solubles en agua. Para ello han desarrollado un protocolo que comprende tres fases, e.g. oral, gástrica e

intestinal. En ocasiones las fases oral y gástrica se omiten y sólo la digestión intestinal es simulada (29). En la Tabla 9 se muestran las composiciones de los fluidos digestivos para cada etapa del modelo.

Tabla 9. Composiciones de soluciones digestivas: fluido salivar simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). Basado en las condiciones publicadas por Mao y McClements (2012)

Constituyente	FSS	FGS	FIS
	pH 6,8 mmol/L	pH 2,5 mmol/L	pH 7 mol/L
Cloruro de Sodio	27,3	36,7	3,5
Nitrato de Amonio	4,1	-	-
Fosfato monobásico de Potasio	4,7	-	-
Cloruro de Potasio	2,7	-	-
Citrato de Potasio	0,9	-	-
Sal sódica de ácido úrico	0,1	-	-
Urea	3,3	-	-
Lactato de Sodio	1,3	-	-
Ácido Clorhídrico (37%)	-	7*	-
Cloruro de Calcio	-	-	0,25
Mucina**	30	-	-
Bilis**	-	-	53,6
Enzimas	g/L	g/L	g/L
Pepsina	-	32	-
Lipasa pancreática	-	-	24

* Las unidades de concentración del ácido clorhídrico (37%) en la solución digestiva son de mL/L.

** Los constituyentes sombreados deben ser agregados a la muestra cuando el experimento se esté desarrollando.

Para la fase gástrica, la pepsina puede no ser agregada dependiendo de la presencia de proteína en la muestra. En caso de agregarla, debe diluirse en el FGS justo antes de dar inicio a la digestión gástrica. La fase intestinal suele ser llevada a cabo empleando el método pH-Stat. Para esta fase, las soluciones de lipasa pancreática, bilis y sales son preparadas por separado en agua Milli-Q o en el buffer en que haya sido preparada la emulsión. Para implementar el método, la bilis y la solución de sales se agregan a la muestra proveniente de la fase gástrica y se ajusta el pH a 7. A continuación se agrega la solución de lipasa a la concentración correspondiente y se inicia el método en el equipo adecuado. Una solución de NaOH 0,25 M suele ser utilizada como titulante para compensar la acidificación del medio debida a la liberación de ácidos grasos libres durante la digestión intestinal (30, 31, 32). En la Figura 8 se presenta el diagrama de flujo general del modelo de digestión *in vitro*.

Li y McClements (2010)(15) presentaron un modelo matemático para la interpretación de los perfiles pH-Stat obtenidos para la digestión intestinal. Haciendo uso de estas ecuaciones, se puede obtener el porcentaje de liberación de ácidos grasos (%FFA) a través del tiempo partiendo del volumen de titulante (V_{NaOH}) que se agrega a la mezcla digestiva durante la fase intestinal. Para este cálculo, se tiene en cuenta el peso molecular promedio del aceite (M_{aceite}), la cantidad de aceite en la emulsión (w_{aceite}) y la concentración de la solución titulante (m_{NaOH}). La ecuación (1) muestra el modelo matemático empleado, el número 2 en el divisor es debido a que cada molécula de triglicérido libera dos moléculas de FFA y una molécula de monoglicérido, por lo tanto se requieren dos moles de NaOH para neutralizar la digestión de un mol de triglicérido (21) (Mat *et al.*, 2016).

$$\%FFA = 100 \times \left(\frac{V_{NaOH} \times m_{NaOH} \times M_{aceite}}{w_{aceite} \times 2} \right) \quad (1)$$

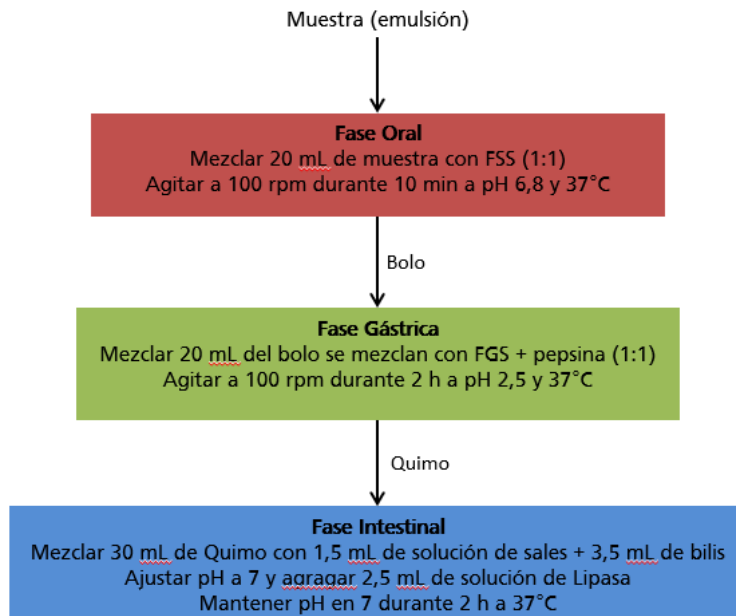


Figura 8. Diagrama de flujo del modelo de digestión in vitro para lípidos y sistemas de encapsulación basados en emulsiones. FSS, FGS se refieren al fluido salival simulado, fluido gástrico simulado

Referencias

- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, *30*(11), 591-600. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2012.08.001>
- Verhoeckx, K., & Cotter, P.D. (2015). General introduction. In: *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. VII-XII). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
- Kong, F., & Singh, R.P. (2008). Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science*, *73*(5), R67-R80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>
- Lentle, R. G., & Janssen, P. W. M. (2011). Introduction. En *The Physical Processes of Digestion* (pp. 1-7). New York, NY. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9449-3_1
- McClements, D J. (2018). The biophysics of digestion: lipids. *Current Opinion in Food Science*, *21*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2018.03.009>
- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., & Faria, J.A. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(3), 292-302. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, *31*(2), 118-129. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006>
- Stratton, L.M., Vella, M.N., Sheeshka, J., & Duncan, A.M. (2015). Food neophobia is related to factors associated with functional food consumption in older adults. *Food Quality and Preference*, *41*, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.11.008>
- Rezaei, A., Fathi, M., & Jafari, S.M. (2019). Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. *Food Hydrocolloids*, *88*, 146-162. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.10.003>
- Alegria, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static Digestion Models: General Introduction. In: *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 3-12). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-161044_1
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J.A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, *107*, 423-436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>

12. Fernández-García, E., Carvajal-Lerida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 29 (11), 751-760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
13. Ariza, M.T., Reboredo-Rodríguez, P., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Battino, M., & Simal-Gandara, J. (2018). Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food chemistry*, 248, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.FOODCHEM.2017.11.105>
14. Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunteun, S.L., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C., Singh, R., Vegarud, G., Wickham, M., Weitschies, W., & Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & function*, 5 (6), 1113-24. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
15. Li, Y., & McClements, D.J. (2010). New Mathematical Model for Interpreting pH-Stat Digestion Profiles: Impact of Lipid Droplet Characteristics on in Vitro Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (13), 8085-8092. <https://doi.org/10.1021/jf101325m>
16. Mat, D.J.L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, 239 (Supplement C), 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.115>
17. de Souza Simões, L., Madalena, D.A., Pinheiro, A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., & Ramos, Ó.L. (2017). Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243 (Supplement C), 23-45. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.010>
18. McClements, D.J., & Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, 1 (1), 32-59. <https://doi.org/10.1039/C0FO00111B>
19. Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., & McClements, D.J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125 (1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>
20. Dupont, D. (2011). *Improving Health Properties of Food by Sharing our Knowledge on the Digestive Process - ABOUT Infogest*. <https://www.cost-infogest.eu/ABOUT-Infogest>
21. Mat, D.J.L., Le Feunteun, S., Michon, C., & Souchon, I. (2016). In vitro digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*, 88 (Part B), 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>
22. Nehir El, S., Karakaya, S., Simsek, S., Dupont, D., Menfaatli, E., & Eker, A.T. (2015). In vitro digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides. *Food & Function*, 6 (7), 2322-2330. <https://doi.org/10.1039/c5fo00357a>
23. Rodrigues, D.B., Mariutti, L.R.B., & Mercadante, A.Z. (2016). An in vitro digestion method adapted for carotenoids and carotenoid esters: moving forward towards standardization. *Food & Function*, 7 (12), 4992-5001. <https://doi.org/10.1039/c6fo01293k>
24. Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodtkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M.J., Feunteun, S., Janssen Duijghuijsen, L.M., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E., Vegarud, G., Vergeres, G., & Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>
25. Ercan, P., & El, S.N. (2016). Inhibitory effects of chickpea and Tribulus terrestris on lipase, -amylase and -glucosidase. *Food Chemistry*, 205 (Supplement C), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.012>
26. Cavonius, L.R., Albers, E., & Undeland, I. (2016). In vitro bioaccessibility of proteins and lipids of pH-shift processed Nannochloropsisoculata microalga. *Food & Function*, 7 (4), 2016-2024. <https://doi.org/10.1039/c5fo01144b>
27. Ferreira-Lazarte, A., Montilla, A., Mulet-Cabero, A.-I., Rigby, N., Olano, A., Mackie, A., & Villamiel, M. (2017). Study on the digestion of milk with prebiotic carbohydrates in a simulated gastrointestinal model. *Journal of Functional Foods*, 33 (Supplement C), 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.031>
28. Gough, R., O'Connor, P.M., Rea, M.C., Gómez-Sala, B., Miao, S., Hill, C., & Brodtkorb, A. (2017). Simulated gastrointestinal digestion of nisin and interaction between nisin and bile. *LWT - Food Science and Technology*, 86 (Supplement C), 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.031>

29. Mackie, A., Rigby, N., Macierzanka, A., & Bajka, B. (2015). Approaches to Static Digestion Models. In: *The Impact of Food Bioactives on Health* (p. 23-31). Cham. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_3
30. Li, Y., Hu, M., Du, Y., Xiao, H., & McClements, D.J. (2011). Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads. *Food Hydrocolloids*, *25* (1), 122-130. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2010.06.003>
31. Mao, Y., & McClements, D.J. (2012). Influence of electrostatic heteroaggregation of lipid droplets on their stability and digestibility under simulated gastrointestinal conditions. *Food and Function*, *3* (10), 1025-1034. <https://doi.org/10.1039/c2fo30108c>
32. Zou, L., Zheng, B., Liu, W., Liu, C., Xiao, H., & McClements, D.J. (2015). Enhancing nutraceutical bioavailability using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size on solubility and bioaccessibility of powdered curcumin. *Journal of Functional Foods*, *15*, 72-83. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.02.044>

Capítulo 22

Nuevas técnicas para la búsqueda de actividad antioxidante en mezclas naturales con aplicación en alimentos

Oscar Bernardo Micheloni¹, Abel Eduardo Farroni²

¹Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Departamento de Ciencias Básicas. Pergamino, Buenos Aires. Argentina

²Intituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Laboratorio de Calidad de Alimentos Suelos y Aguas. Argentina

Resumen

Los ensayos autográficos acoplados a cromatografía constituyen una herramienta interesante e innovadora en la búsqueda de compuestos activos en la preservación de alimentos a partir de extractos naturales. Como principio general de las autografías, luego del desarrollo de la cromatografía, se deposita sobre la placa un sistema de reactivos que revela la actividad buscada mediante un cambio de color localizado. El acoplamiento de una técnica de detección con una separativa es un diseño que permite la localización de los posibles compuestos activos presentes en mezclas complejas facilitando su aislamiento guiado por la actividad buscada, disminuyendo los costos y los tiempos. Las autografías químicas con revelado por aspersion fueron utilizadas con éxito para la detección de actividad antioxidante a partir de la captación de radicales libres en extractos acuosos obtenidos a partir de especies de crecimiento silvestre como *Nicotiana longiflora*, *Oxalis articulata*, que presentaron actividad captadora de DPPH, y *Sonchus oleraceus*, *Sphaeralcea bonariensis* y *Cichorium intybus* las cuales a su vez fueron positivas en el ensayo de ABTS. Las autografías enzimáticas pueden utilizarse para la búsqueda de actividad inhibitoria de las polifenoloxidasas. El uso de PPO fuentes naturales en el ensayo permite detectar compuestos que inhiban específicamente la enzima del alimento que se desea preservar, en este caso manzana, evitando la aparición de falsos positivos o negativos debidos a las diferencias de especificidad con la enzima comercial de hongos. La versatilidad de las autografías y su capacidad de separación las hace herramientas muy importantes en la búsqueda de una actividad específica en mezclas complejas como los extractos naturales.

1. Introducción

La investigación sobre el uso de antioxidantes es un tema complejo y se ha incrementado en los últimos tiempos. Existe un gran número de metodologías y variaciones de estas para medir la capacidad antioxidante en materiales vegetales. Los sistemas biológicos presentan la particularidad de poseer múltiples fuentes de actividad antioxidante como, por ejemplo: enzimas, como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, polifenoloxidasa y catalasa; macromoléculas como albumina, ceruloplasmina, ferritina, otras proteínas; pequeñas moléculas o metabolitos secundarios como ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tocoferoles, carotenoides, polifenoles; e incluso algunas hormonas (estrógenos, angiotensina, melatonina, etc.) (1). Existen diversos métodos espectrofotométricos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea in vitro o in vivo (2–5). Una de las estrategias más aplicadas en las medidas in vitro de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. Cuando la actividad antioxidante se manifiesta como la inhibición de una enzima, el abordaje consiste en evaluar la actividad enzimática remanente en presencia de la muestra (6–8). No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas in vitro nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas in vivo (9).

Los ensayos autográficos acoplados a cromatografía en placa han sido considerados como generadores de una nueva era en la ciencia de la separación y determinación de actividad de compuestos químicos presentes en los productos naturales (10). Pueden implementarse como una herramienta cualitativa simple, de bajo costo y llevarse adelante en laboratorios sencillos sin la necesidad de utilizar equipamientos complejos. Como principio general de las autografías, luego del desarrollo de la

cromatografía, se deposita sobre la placa un sistema de reactivos que revela la actividad buscada mediante un cambio de color localizado. Esto puede hacerse sumergiendo la placa en una solución reveladora, aplicando la solución sobre la placa en forma de aerosol o en forma de un gel delgado que contenga los reactivos necesarios. El acoplamiento de una técnica de detección con una separativa es un diseño que permite la separación de los posibles compuestos activos presentes en mezclas complejas facilitando su localización y el aislamiento guiado por la actividad buscada, disminuyendo los costos y los tiempos (11, 12). Las autografías pueden ser clasificadas en tres grupos: autografías a célula entera o bioautografías, autografías químicas y autografías macromoleculares o enzimáticas. Las autografías a "célula entera" o bioautografías fueron las primeras en utilizarse. Estos ensayos se basan en la evaluación de la capacidad inhibitoria del crecimiento de diferentes microorganismos y han sido mencionados como la metodología más eficiente para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos (13). Las primeras bioautografías se implementaron usando como fase estacionaria papel para estimar la pureza de penicilinas (14). El uso de cromatografía en capa delgada CCD fue introducido recién en el año 1961 (15). Las autografías químicas existentes se utilizan para la determinación de actividad antioxidante, las mismas se basan en la medición de la capacidad captadora de radicales libres utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (16) o el radical estable del 2,2'-azino-bis(3-etil-5-metil-6-tiazolil-sulfonil)propano (ABTS) (17).

En las autografías macromoleculares o enzimáticas, se trata de poner en evidencia la inhibición de una enzima. En el caso del estudio de inhibidores enzimáticos se aplica sobre la placa cromatográfica una solución de tinción en forma líquida o de un gel delgado conteniendo los reactivos que permitan el desarrollo de una reacción de color partir de la actividad enzimática buscada, detectando, la presencia de la misma por un cambio de color respecto del fondo en el lugar donde está presente el compuesto activo. El uso de geles de agarosa permite controlar mucho mejor el pH y la concentración de enzimas y sustratos en el medio de reacción. En estos casos es importante tener en cuenta que el compuesto activo debe migrar desde la placa al gel y por lo tanto son importantes las interacciones y la hidrofobicidad de la placa. En cambio, cuando la solución reveladora se aplica por aspersión es esta la que difunde en la placa, el procedimiento es más simple que utilizar un gel, pero es más difícil controlar las condiciones y la homogeneidad de la aplicación. Existen diferentes autografías que se han desarrollado utilizando diferentes enzimas, la mayoría de ellas comerciales como β -glucosidasa (12, 18, 19), xantina-oxidasa (20), acetilcolinesterasa (21, 22), lipasa (23), tirosinasa de hongos (24, 25) y también naturales como polifenol oxidasa de manzanas (26). Para la aplicación en alimentos orientada hacia la búsqueda de compuestos con una actividad particular hacia una enzima que intervenga en el deterioro de estos es conveniente iniciar utilizando como fuente enzimática la enzima de ocurrencia natural presente en el alimento en estudio (26).

2. Detección de inhibidores de polifenoloxidasa

El pardeamiento enzimático conduce a importantes pérdidas económicas en muchos productos frescos, tales como manzanas, peras, bananas, papas y hongos comestibles (27). La estrategia más frecuentemente utilizada para su control es la inhibición de la enzima polifenol oxidasa (PPO) por mecanismos físicos o químicos. Sin embargo, esta no es la única enzima relacionada al pardeamiento. La enzima PPO cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de difenoles a o-quinonas que se polimerizan con azúcares, aminoácidos y proteínas formando compuestos de color oscuro (melaminas). La enzima peroxidasa (POD) puede oxidar fenoles a quinonas en presencia de peróxido de hidrógeno y la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), por su parte genera sustratos fenólicos, que pueden ser utilizados por la PPO y POD (28). Por lo tanto, el control del pardeamiento enzimático a partir de la búsqueda de inhibidores naturales de estas enzimas ofrece un importante campo de desarrollo. Estas investigaciones normalmente se llevan a cabo mediante métodos espectrofotométricos utilizando como fuente enzimática tirosinasa comercial de hongos. A pesar de que esta metodología tiene la ventaja de la medición cuantitativa, los extractos naturales al ser mezclas complejas y frecuentemente coloreadas dificultan las mediciones precisas de absorbancia (26). Además, la utilización de tirosinasa de hongos comercial para la búsqueda de inhibidores de la PPO de alimentos vegetales presenta el inconveniente de no poder abordar la diferente afinidad por los inhibidores que presentan las PPO de diferentes fuentes. Esto es debido a que las isoformas de la enzima PPO difieren entre las diferentes especies vegetales presentando distinta sensibilidad a cambios de pH y temperatura o diferente punto isoeléctrico (29). Recientemente, Mayr F. *et al.* (2019) (30)

propusieron que los ensayos espectrofotométricos de aislamiento bioguiado para detectar inhibidores de pardeamiento enzimático a partir de tirosinasa de hongos comercial presentan interferencias que pueden llevar a obtener falsos negativos descartando de esta manera fracciones de extractos que podrían tener compuestos con actividad inhibitora.

Es aquí donde las autografías enzimáticas preparadas con el enzima blanco y acopladas a cromatografía en capa delgada cobran importancia para la identificación y separación preliminar de compuestos inhibidores. El desarrollo de estas metodologías requiere de la puesta a punto de la corrida cromatográfica y del sistema de revelado. Como primer paso se desarrolla una cromatografía del extracto en estudio y se elimina todo el solvente de corrida por evaporación. La secuencia de incorporación de reactivos debe ser puesta a punto en cada autografía en particular. Para el caso presentado en la Figura 2 los mejores resultados se obtuvieron depositando sobre la placa una solución de agar y 3-metil-2-benzothiazolinona hidrazona (MBTH) en buffer fosfatos 50 mM pH =6,8, sustrato (L-Dopa) y la enzima PPO extraída del alimento vegetal que se quiera estudiar, en este caso manzana. Esta enzima se extrajo en frío y en presencia de polivinilpirrolidona para eliminar compuestos fenólicos, luego se conservó liofilizada a -18 °C. La solución de enzima se cuantificó de manera de utilizar siempre el mismo valor de unidades enzimáticas por superficie de la placa. El MBTH cumple la función de mejorar el contraste entre el fondo coloreado y el área incolora donde la enzima ha sido inhibida ayudando a incrementar la sensibilidad del método. Este compuesto reacciona con la dopaquinona producida por la PPO y tiñe el fondo de la placa de color rojo ladrillo (Figura 1). En la zona donde existe un inhibidor natural de la enzima PPO, esta reacción no se desarrolla apareciendo una zona blanca.

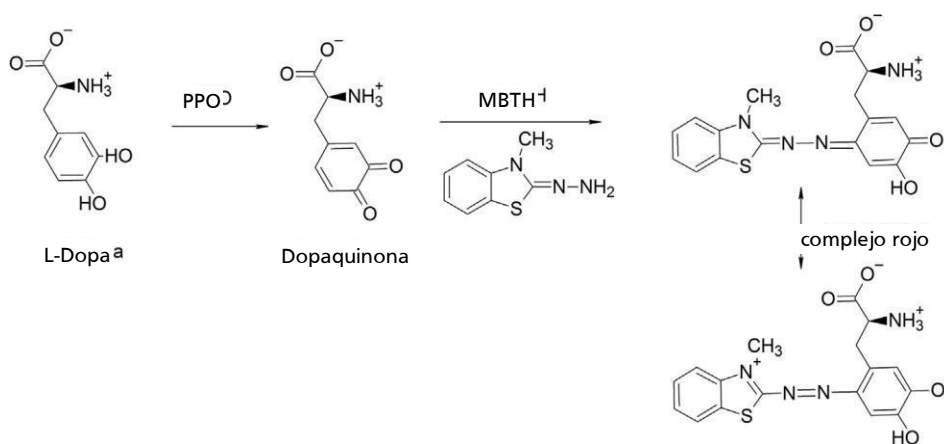


Figura 1. Oxidación de L-Dopa a dopaquinona catalizada por PPO y reacción con MBTH para producir complejo rojo

En la Figura 2 se observa la corrida de un extracto acuoso de ajo revelado con una autografía desarrollada para detectar inhibidores específicos de PPO de manzana además de otras formas de revelar la placa cromatográfica utilizando iluminación UV (26). La longitud de onda de 254 nm activa un fluoróforo verde aplicado sobre el fondo de la placa y su fluorescencia es opacada por los compuestos que corren en la calle donde se siembra la muestra haciéndolos visibles como manchas oscuras. Cuando la placa se ilumina a longitud de onda más larga como 365 nm los compuestos que emiten fluorescencia se observan brillantes sobre un fondo oscuro. De esta manera se pueden poner de manifiesto características que no son observables bajo luz visible. La presencia de un compuesto inhibidor de la PPO de manzana en el extracto acuoso de cebolla (*Allium cepa*) se encuentra marcada con un círculo amarillo en la zona de relación de frente (Rf)=0.55. Este compuesto no aparece destacado a 254 nm ni a 365 nm. Este sistema de revelado en particular es compatible con placas cromatográficas de fase normal y fase reversa. De esta manera se pueden realizar separaciones de compuestos en un amplio rango de polaridad haciendo más versátil la búsqueda de principios activos en diferentes tipos de extractos naturales.

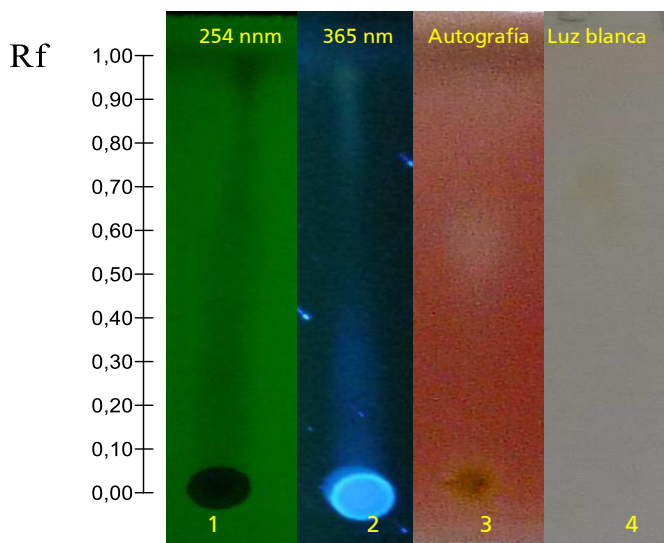


Figura 2. Autografía de extracto acuoso de *Allium cepa* en diferentes condiciones de revelado: 1) Luz UV 254 nm, 2) Luz UV 365 nm, 3) autografía y 4) Luz blanca. Fase móvil: acetona: metanol (90:10)

3. Autografías químicas

3.1 Autografía de DPPH

Este ensayo permite la detección de compuestos con actividad reductora que son capaces de captar radicales libres por medio de la donación de hidrógeno. El DPPH es un radical sintético estable. Esta estabilidad es debida a la deslocalización del electrón desapareado por toda la molécula que impide la dimerización, como sucede para la mayoría de los otros radicales libres. Esta deslocalización es la responsable de originar el color violeta que lo caracteriza. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno, se origina la forma reducida del DPPH (Figura 3). La coloración violeta se pierde y prevalece la coloración amarilla del grupo picril presente (31). Esta autografía química puede realizarse aplicando las soluciones de reactivos en forma de aerosol directamente sobre la placa. Se utiliza una solución etanólica de 2,2-Di (4-tert-octilfenil)-1-picril-hidrazilo (DPPH). Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente los compuestos antioxidantes se observaran como puntos amarillos sobre un fondo color violeta (32).

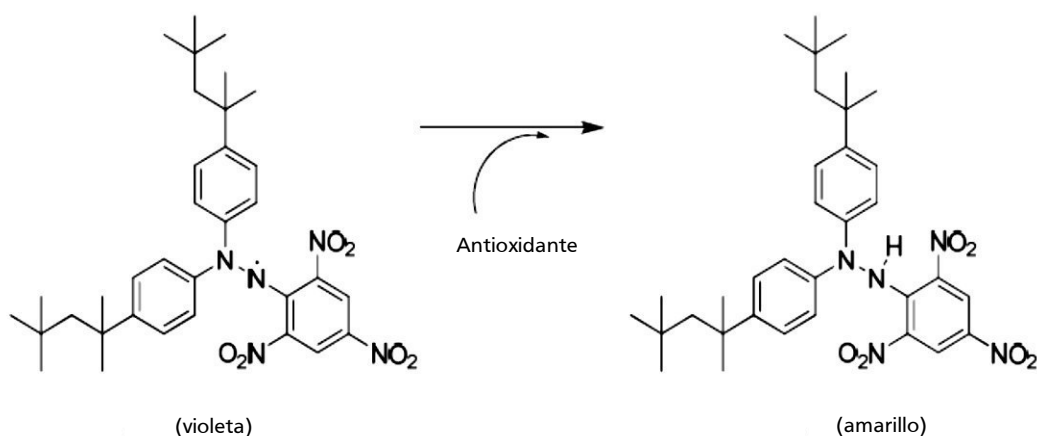


Figura 3. Reacción de captación de radical DPPH por parte de compuestos antioxidantes

La Figura 4 muestra la aplicación de estas autografías al estudio de capacidad antioxidante de extractos acuosos de las especies vegetales de ocurrencia natural, este caso se muestran los resultados de *Nicotiana longiflora* (NL) y *Oxalis articulata* (OA). Las placas cromatográficas se desarrollaron con metanol: acetato de etilo (90:10) y se revelaron aplicando un aerosol de DPPH al 0,04%. Ambas mostraron la presencia de compuestos con actividad antioxidante. NL (calle 1) mostró zonas con actividad antioxidante entre valores de Rf de 0 a 2. OA (calle 2) también mostró compuestos con actividad antioxidante entre valores de Rf de 0 a 0,25 y una zona activa con valor de Rf de 0,5. El revelado a 365 nm puso de manifiesto que varios compuestos o grupos de estos pueden separarse en los dos extractos. Al guiar el revelado con la actividad captadora de DPPH se observa que OA presenta una variedad mayor de compuestos activos que NL cuando se separan con esta fase móvil.

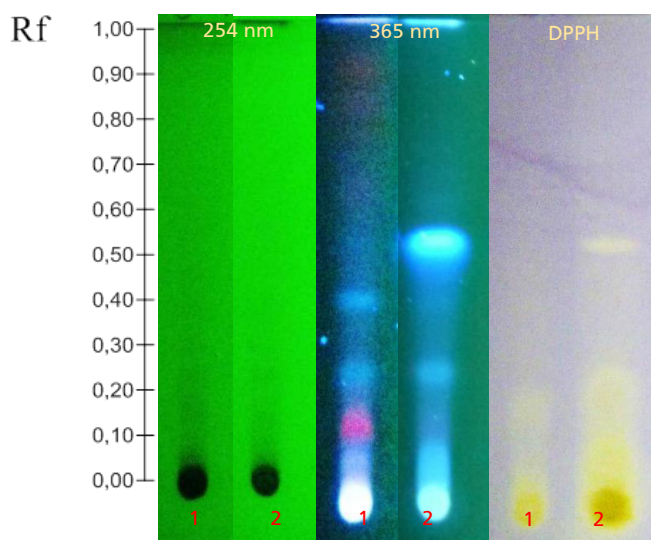


Figura 4. Comparación de cromatogramas con diferentes revelados UV (254 y 365 nm) y autografía DPPH. Calle 1 *Nicotiana longiflora*, calle 2 *Oxalis articulata*. Siembra 500 µg

3.2 Autografía de ABTS

Zampini *et al.* (2010) (17), han desarrollado una técnica autográfica en gel para detectar compuestos antioxidantes de extractos vegetales utilizando como aceptor de hidrógeno el radical ABTS^{•+} formado entre el ABTS y el persulfato de potasio (figura 5). Los compuestos reductores se pueden visualizar como puntos blancos en un fondo verde oscuro.

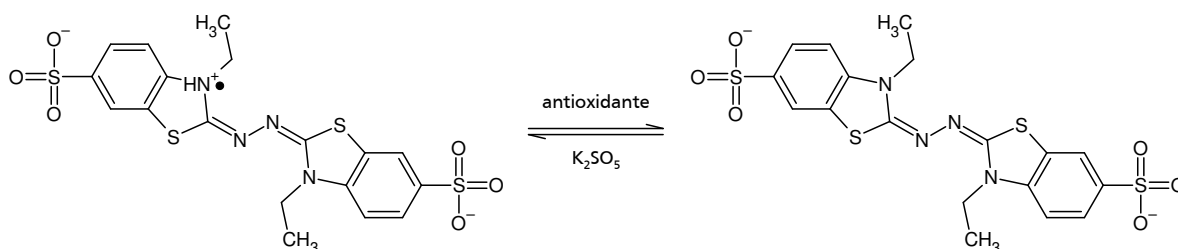


Figura 5. Reacción de formación de radical ABTS^{•+} con persulfato de potasio

En la Figura 6 se pueden observar las cromatografías de extractos acuosos de las especies vegetales *Sonchus oleraceus* (calle 1), *Sphaeralcea bonariensis* (calle 2) y *Cichorium intybus* (calle 3) desarrolladas con hexano: acetato etilo (30:70). En la placa revelada con la autografía se puede visualizar zonas de

color blanco que indican la presencia de compuestos que le ceden un hidrogeno al $ABTS^{+\cdot}$. *Sonchus oleraceus* mostró una importante zona con actividad antioxidante con un valor de Rf de 0,7 y algunos otros sectores con valores de Rf de 0 y superiores a 0,7. *Sphaeralcea bonariensis* mostró zonas con actividad antioxidante con valores de Rf entre 0 y 0,2 y 0,8. *Cichorium intybus* mostró zonas activas con valores de Rf de 0 y 0,75.

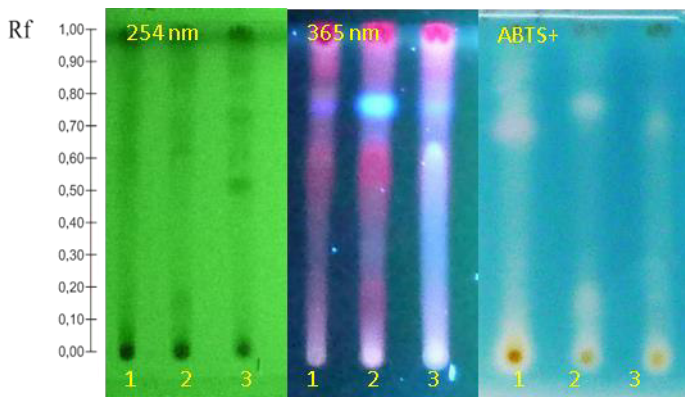


Figura 6. Autografía para capacidad captadora de $ABTS^{+\cdot}$. Placas desarrolladas con hexano: acetato de etilo (30:70), Extractos de *Sonchus oleraceus* (calle 1), *Sphaeralcea bonariensis* (calle 2) y *Cichorium intybus* (calle 3)

4. Consideraciones finales

La búsqueda de compuestos antioxidantes o inhibidores del pardeamiento a partir de fuentes naturales requiere de enfoques innovadores que permitan el procesamiento de muestras complejas de manera simple. Las técnicas autográficas son fáciles de realizar y no requieren grandes equipamientos de laboratorios y permiten una separación preliminar de los compuestos activos. Son versátiles en el sentido que pueden adaptarse a la búsqueda de inhibidores enzimáticos, compuestos con una actividad química específica como el caso de la captación de radicales libres o incluso la inhibición del crecimiento de un microorganismo. El diseño de la separación y el revelado deben realizarse cuidadosamente teniendo en cuenta el sistema en estudio y la actividad buscada. Cuanto más compleja sea la muestra más relevancia cobra la fase separativa, pueden realizarse corridas con diferentes solventes o incluso utilizar fase reversa ampliando mucho el rango de compuestos que puede separarse. La técnica de revelado puede adaptarse a las necesidades del sistema o las capacidades del laboratorio. Las técnicas por inmersión y aspersion tienen la ventaja de ser fáciles de hacer y rápidas además de no requerir equipamiento; pero es difícil calcular la concentración aplicada de los reactivos, se desperdicia mucho y pueden deformar las bandas cromatográficas. La aspersion además presenta dificultades para lograr homogeneidad de cobertura. Esto hace que sea más difícil de reproducir los resultados. La aplicación de la solución de tinción sobre las placas cromatográficas en forma de gel facilita la visualización de los halos, se puede calcular exactamente la concentración aplicada y hace más reproducible el experimento. Por otro lado, es más laboriosa no se puede automatizar y la sensibilidad puede verse afectada por la difusión. El adecuado control de las condiciones en el gel hace que las autografías enzimáticas puedan adaptarse a enzimas de diferentes fuentes, tanto comerciales como extraídas del alimento que se desea preservar. De esta manera se amplía el horizonte de aplicaciones y es posible sortear el problema de la diferente especificidad de los inhibidores evitando falsos resultados negativos o positivos. Finalmente, una vez detectados los compuestos activos, las autografías pueden repetirse modificando los solventes o fases de corrida. A partir de los resultados de las separaciones en TLC mono o bidimensional con diferentes fases móviles se puede guiar la puesta a punto de columnas preparativas para obtener fracciones enriquecidas en los activos que se hayan encontrado y de esta manera proceder a su identificación o elucidación estructural por técnicas como espectrometría de masas o resonancia nuclear magnética de alta resolución. En este trabajo se muestran extractos naturales obtenidos a partir de especies de crecimiento silvestre con actividad antioxidante o inhibidora de la PPO las cuales presentan más de un

compuesto activo. Estas mezclas son un interesante punto de partida para el control del pardeamiento enzimático en alimentos y el reemplazo de compuestos de origen sintético.

Referencias

1. Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 4290-4302.
2. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
3. Cintra, R.M.G., & Mancini-Filho, J. (2001). Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, 22, 49-62.
4. Miller, N.J., & Rice-Evans, C.A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60, 331-337.
5. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
6. Kim, M.J., Kim, C.Y., & Park, I. (2005). Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chemistry*, 89, 181-184.
7. Lee, M.Y., Lee, M.K., & Park, I. (2007). Inhibitory effect of onion extract on polyphenol oxidase and enzymatic browning of taro (*Colocasia antiquorum* var. esculenta). *Food Chemistry*, 105, 528-532.
8. Lee, M.K. (2007). Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 102, 146-149.
9. Kuskoski, E.M., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicação de diversos métodos químicos para determinar a atividade antioxidantes em polpa de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732.
10. Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of pharmaceutical analysis*, 5(2), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
11. Ramallo, I.A., García, P., & Furlan, R.L.E. (2015). A reversed-phase compatible thin-layer chromatography autography for the detection of acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Separation Science*, 38, 3788-3794.
12. Salazar, M.O., & Furlan, R.L.E. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 18, 209-212.
13. Rahalison, L. *et al.*, (1991). Article in Phytochemical Analysis. *Phytochemical Analysis*, 2, 199-203.
14. Goodall, R.R., & Levi, A.A. (1947). A micro-chromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Analyst*, 72, 277.
15. Fischer, R., & Lautner, H. (1961). On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, 294, 1-7.
16. Wettasinghe, M., & Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70, 17-26.
17. Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., & Isla, M.I. (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS•+ immobilized by gel entrapment. *AAPS PharmSciTech*, 11, 1159-1163.
18. Ramallo, I.A., Gonzalez Sierra, M., & Furlan, R.L.E. (2012). Discovery of β -glucosidase inhibitors from a chemically engineered extract prepared through ethanolysis. *Medicinal Chemistry*, 8, 112-117.
19. Salazar, M.O., Micheloni, O., Escalante, A.M., & Furlan, R.L.E. (2011). Discovery of a β -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Molecular Diversity*, 15, 713-719.
20. Ramallo, I.A., Zacchino, S.A., & Furlan, R.L.E. (2006). A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis*, 17, 15-19.
21. Ramallo, I.A., Salazar, M.O., & Furlan, R.L.E. (2015). Thin layer chromatography-autography-high resolution mass spectrometry analysis: accelerating the identification of acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26, 404-412.

22. Rhee, I.K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of chromatography. A*, 915, 217–223.
23. Hassan, A.M.S. (2012). TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 23, 405–407.
24. García, P., & Furlan, R.L.E. (2015). Multiresponse optimisation applied to the development of a TLC autography for the detection of tyrosinase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26, 287–292.
25. Wangthong, S., Tonsiripakdee, I., Monhaphol, T., Nonthabenjawan, R., & Wanichwecharungruang, S.P. (2007). Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection. *Biomedical chromatography*, 21, 94–100.
26. Micheloni, O.B., Farroni, A.E., García, P., & Furlan, R.L.E. (2018). Rapid autographic method for detection of enzymatic browning inhibitors based on enzyme immobilization. *Food Chemistry*, 269, 638–643.
27. Whitaker, J.R., & Lee, C.Y. (1995). Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. In: *Enzymatic Browning and Its Prevention* Chapter 1. ACS Symposium Series. Vol. 600. p. 2-7.
28. Yingsanga, P., Srilaong, V., Kanlayanarat, S., Noichinda, S., & McGlasson, W.B. (2008). Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-Chompoo. *Postharvest Biology & Technology*, 50, 164–168.
29. Yoruk, R., & Marshall, M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361–422.
30. Mayr, F. *et al.*, (2019). Mushroom Tyrosinase-Based Enzyme Inhibition Assays Are Not Suitable for Bioactivity-Guided Fractionation of Extracts. *Journal of natural products*, 82, 136–147.
31. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
32. Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199–1200.

Capítulo 23

Uso de herramientas estadísticas en el diseño experimental para el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios

Víctor Manuel Zamora-Gasga¹, Abraham Wall-Mercado², Gustavo Adolfo González-Aguilar³, Antonio Segura-Carretero⁴, Sonia G. Sáyago Ayerdi^{1*}

¹Tecnológico Nacional de México, Campus Tepic, Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, División de Estudios de Posgrado, Nayarit. México.
*ssayago@ittpic.edu.mx; sonia.sayago@gmail.com

²Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Instituto de Ciencias Biomédicas, Chihuahua, México.

³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD-Hermosillo) Coordinación de Antioxidantes y Alimentos Funcionales. Hermosillo Sonora. México

⁴Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica. España

Resumen

El aprovechamiento de subproductos agroalimentarios es un área que presenta en la actualidad un gran auge, por el alto contenido de compuestos bioactivos que pueden llegar a presentar. A partir de los subproductos se pueden obtener compuestos de interés funcional para su utilización en la formulación de nuevos productos. El uso de herramientas estadísticas cobra un interés fundamental en el diseño experimental de procesos, que incluyen el mayor número de factores que puedan afectar la fabricación o desarrollo de un alimento. En este capítulo se aborda de manera sencilla algunas herramientas estadísticas que pueden utilizarse en el diseño de experimentos para el aprovechamiento de un subproducto agroalimentario, su óptimo uso, así como las ventajas y desventajas que puede presentar la aplicación de estas herramientas.

1. Introducción

Los alimentos industrializados comúnmente se formulan con mezclas de ingredientes, los cuales son transformados en una serie de pasos complejos. Cada una de estas operaciones unitarias está definida por muchos factores con efectos sinérgicos o antagónicos, que impactan la calidad del producto final. Esto conlleva a que los tecnólogos en alimentos manipulen a nivel piloto uno o varios factores, utilizando diseños experimentales dirigidos a obtener resultados óptimos con el mínimo tiempo y recurso (1). La Figura 1, ilustra cómo diversos factores "controlables" (X_1, X_2, X_3, X_4) interaccionan con otros "no controlables" ("ruido", Z_1, Z_2, Z_3, Z_4), ambos impactan en diversas variables o características (Y_1, Y_2, Y_3, Y_4) del producto final. La correcta selección de un diseño experimental depende de varios factores como son: la etapa de desarrollo del producto, la intención del investigador, la viabilidad del(os) experimento(s) o la rentabilidad comercial. Así, de acuerdo con los objetivos de un experimento, estos diseños se pueden clasificar como diseños de selección o tamizaje y diseños de optimización. En los siguientes párrafos se comentan las ventajas y desventajas de algunos diseños experimentales (Tabla 1), sus características (Secciones 2 y 3), algunas consideraciones teóricas para su uso (Sección 4) y algunos ejemplos de su aplicación en el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios (Sección 5).

2. Diseños de selección o tamizaje

La forma más sencilla de resolver problemas en el procesamiento y desarrollo de alimentos es enfocarse en un solo factor a la vez. La definición de "factor" y otros términos comúnmente utilizados en diseño de experimentos se describen en el Apéndice 1. Si bien el diseño de un solo factor a la vez puede parecer una forma ordenada y lógica del análisis de factores, realmente este tipo de diseño es altamente ineficiente y puede producir resultados poco precisos pues se asume que las interacciones entre las variables no son importantes o inexistentes (2). Por esto, la naturaleza multivariada en el desarrollo de un alimento industrializado, justifica el uso de diseños experimentales en los que se evalúa más de un factor.

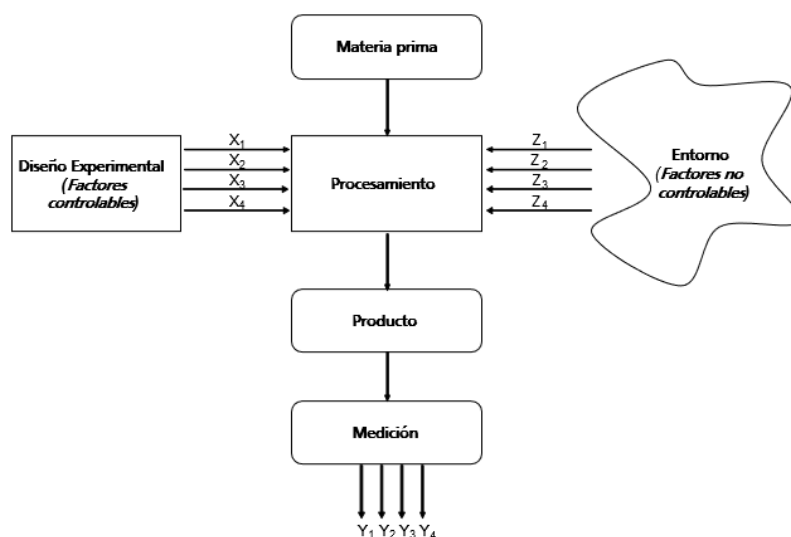


Figura 1. Fundamento de los diseños experimentales: Modelo de la caja negra

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diseños experimentales

Métodos de diseño de experimentos	Ventajas	Desventajas
Un factor a la vez	Fácil de usar y simple de entender.	No se pueden tener en cuenta las posibles interacciones entre las variables El número de corridas / muestras aumenta significativamente al aumentar el número de variables.
Factorial completo	Permite el estudio completo de las interacciones y efectos cuadráticos dentro de las variables. Permite el estudio de algunas interacciones y efectos cuadráticos dentro de variables.	El número de corridas / muestras aumenta significativamente al aumentar el número de variables. El número de corridas/muestras aumenta significativamente al aumentar el número de variables
Factorial fraccionado y Box-Behnken	Número reducido de corridas/muestras, en comparación con los diseños factoriales completos Diseños experimentales para factoriales de dos niveles están disponibles.	El grado de complejidad aumenta con el número para niveles Sistemas de nivel mixto requieren diseños complejos Los diseños factoriales fraccionarios con un alto grado de alias pueden resultar en una alta colinealidad entre las variables.
Diseño de Mezclas	Útil en el desarrollo de formulaciones ya que permite obtener un valor óptimo utilizando superficie de respuesta. Reducción significativa en el número de corridas / muestra.	En el desarrollo de la formulación no es posible incluir variables del proceso.
Diseños Taguchi	Optimización de las variables del proceso con la relación señal/ruído.	El diseño solo es útil para identificar un efecto principal significativo y no considera ningún efecto de interacción de dos factores.
Factorial completo de dos niveles.	El efecto principal y la interacción de factores pueden ser identificados.	El incremento del número de factores lleva al incremento geométrico del número de prueba. Por lo tanto, el diseño no es factible para seleccionar más de dieciséis factores.
Factorial fraccionado de dos niveles.	Se necesita menos número de ensayos experimentales en comparación con el diseño factorial completo para el mismo número de factores.	El efecto de las interacciones de los factores es muy limitado y puede estar mal orientado ya que no hay una medición del error en este diseño.
Diseño de Plackett-Burman	Se pueden examinar un gran número de variables con muy pocos ensayos experimentales.	El diseño solo es útil para identificar un efecto principal significativo y no considera ningún efecto de interacción de dos factores.

Así, los diseños de selección o tamizaje son útiles en la detección de los factores más influyentes y sus interacciones, ya que es claro que, aunque exista una gran cantidad de factores en el procesamiento de alimentos, no todos influyen en las variables respuesta. Este tipo de diseños puede examinar factores cualitativos, cuantitativos o un combinación de ellos (3).

2.1. Diseños factoriales completos

Los sistemas alimentarios, en la mayoría de los casos, son de naturaleza multivariable, con características sensoriales individuales derivados de procesos con diferentes variables a controlar. Los diseños factoriales completos son diseños equilibrados y ortogonales, que permiten la estimación de todos los factores principales y de la interacción de sus niveles (Ver definiciones en Apéndice 1) lo que implica un gran número de puntos de diseño o muestras(4). El número de experimentos a realizar se determina de acuerdo a la Ec (1):

$$n = m^k \quad \text{Ec (1)}$$

donde "n" es el número total de muestras, "k" es el número de factores y "m" es el número de niveles de cada factor(5). Los diseños factoriales pueden estudiar más de un factor en dos o más niveles. El número de factores y el número de niveles de cada factor se utilizan para clasificar los diseños factoriales. Por ejemplo, un diseño factorial de 2 X 2 significa que tiene dos factores cada uno en dos niveles y un diseño factorial de 2 X 2 X 2, significa que tiene tres factores cada uno con dos niveles. Es claro que el número de muestras aumenta exponencialmente con el aumento en el número de factores y sus niveles, lo que hace que sea extremadamente costoso realizar tales experimentos. Por ejemplo, el perfil sensorial de un producto alimenticio con cuatro variables independientes, cada una con un nivel bajo, medio y alto requerirá la evaluación de 81 muestras diferentes.

En la práctica los diseños factoriales completos más utilizados son los de dos niveles, y se utilizan para fines de selección proporcionando efectos principales e interacciones de los factores considerados con menos corridas. Para ilustrar lo anterior, la Tabla 2 muestra un diseño con tres factores y dos niveles sin replicas, se contabilizan o producen ocho 'tratamientos' (Ver definiciones en Apéndice 1). Una vez identificados los principales factores, estos se estudian con mayor detalle utilizando diseños experimentales que contienen factores con niveles más altos.

Tabla 2. Diseño factorial completo

Tratamiento	Factor			Efecto del parámetro
	A	B	C	
1	Alto	Bajo	Bajo	A (principal)
2	Bajo	Alto	Bajo	B (principal)
3	Bajo	Bajo	Alto	C (principal)
4	Alto	Alto	Bajo	AB (Interacción)
5	Alto	Bajo	Alto	AC (Interacción)
6	Bajo	Alto	Alto	BC (Interacción)
7	Alto	Alto	Alto	ABC (Interacción)
8	Bajo	Bajo	Bajo	I (Elemento de identidad)

2.2. Diseños factoriales fraccionados

En la etapa inicial de cualquier estudio, parece ser una buena alternativa un diseño factorial completo. Sin embargo, los diseños factoriales que involucran una gran cantidad de experimentos, no son económica ni prácticamente viables. Es así, que a menudo se utiliza una fracción del diseño factorial completo para obtener la información deseada. Los diseños factoriales fraccionados con dos niveles contiene solo una fracción del diseño factorial completo. En un diseño factorial fraccionado con dos niveles, el número de experimentos está dado por la Ec (2):

$$n = 2^{k-p} \quad \text{Ec(2)}$$

donde "p" representa la cantidad de veces que el diseño se reduce a la mitad y la cantidad de generadores de diseño utilizados, y "k" el número de factores(6). Estos diseños pueden considerar el análisis de más de dos factores con más de dos niveles. Si el lector desea profundizar en estos diseños,

se puede consultar los catálogos publicados por Li, Zhang (7) de diseños factoriales fraccionarios de tres niveles, categorizados por el número de corridas y factores. A pesar de que existen múltiples aplicaciones de estos diseños en el área de alimentos, su principal desventaja es que no puedan proporcionar estimaciones claras de los factores principales y de la interacción, ya que algunos de ellos pueden confundirse, según el grado de resolución del diseño experimental(7). El experimentador tendría que elegir en realizar un mayor número de experimentos, lo que implica utilizar una mayor cantidad de recursos para obtener un conocimiento profundo del experimento en contraposición, a obtener los efectos principales de los factores y sus interacciones.

2.3. Diseños de Plackett-Burman

Este diseño es una variante del diseño fraccionado, se utiliza cuando se desconoce por completo las variables que influyen sobre las características del producto final. Una alternativa para evaluar el efecto de los factores que contribuyen principalmente en el fenómeno (ignorando por completo las interacciones) con un número reducido de experimentos es el diseño de Plackett-Burman (6, 8). Esta herramienta establece un diseño para los factores $N-1$ en N experimentos, ya que N debe ser múltiplo de 4. Cuando el número de experimentos requerido por el diseño no es un múltiplo de 4, se pueden agregar factores imaginarios denominados "factores ficticios" para completar el diseño. Los factores ficticios se definen como variables virtuales, en las que la variación de un nivel a otro no representa un cambio físico(9). Los experimentos a veces se replican para determinar los errores del experimento. Normalmente, el modelo de polinomio de primer orden se ajusta al diseño de Plackett-Burman para estimar los efectos de varios factores (Ver definiciones en **Apéndice 1**). Los factores significativos del modelo estimado pueden ser identificados por análisis de varianza(10).

3. Diseños de optimización

La optimización es otra práctica del diseño experimental que confirma las condiciones óptimas para la obtención de una mejor respuesta. De acuerdo con Box, Hunter (11), el proceso de optimización se realiza después de haber identificado los factores más importantes en el proceso. Algunos de los diseños experimentales utilizados en la optimización son el diseño de Box- Behnken, el central compuesto, diseño de mezclas y diseños de Taguchi.

3.1. Diseño de Box-Behnken (DBB)

En un proceso en el que se han identificado previamente los factores de mayor influencia y se han definido los niveles extremos altos y bajos, es posible optimizar las condiciones para tener mayor respuesta utilizando un diseño de Box Behnken (DBB). El DBB consiste en un diseño factorial fraccionado con tres niveles y un diseño de bloque incompleto (12). La matriz de Box Behnken para tres factores es un diseño esférico y giratorio que, visto en un cubo, consiste en el punto central y los puntos medios de los bordes. En este diseño, todos los factores se estudian con tres niveles, y el número de experimentos necesarios para obtener el modelo se define como $N = 2k(k - 1) + C_0$, donde k es el número de factores y C_0 es el número de puntos centrales (13). Los efectos significativos del DBB en la respuesta pueden ser examinados por análisis de varianza y la respuesta óptima puede determinarse por el modelo de regresión con el cálculo de los parámetros de ajuste del modelo. El diseño central compuesto (se describe en la siguiente sección) tiene más niveles de factor que el DBB, por lo que éste se puede usar como una alternativa económica (14).

3.2. Diseño de mezclas

La formulación del producto final resulta ser una etapa clave en la comercialización de alimentos, y determinar la proporción de mezcla de cada ingrediente involucrado en la formulación resulta ser una tarea difícil. Un diseño experimental que proporciona una solución a esta tarea es el diseño de mezcla. Este diseño se puede utilizar para determinar la proporción de mezcla óptima de ingredientes, que maximice o minimice las propiedades del producto final mediante modelos que pueden ser lineales, cuadráticos o cúbicos (15, 16). Varios estudios están disponibles con respecto al desarrollo de bebidas utilizando un diseño de mezcla. Cabe señalar en este punto que los resultados obtenidos de los estudios

sensoriales de alimentos, proporcionan información importante sobre la calidad y las características de los productos alimenticios que se pueden utilizar en varios aspectos, como el desarrollo de nuevos productos, la comprensión del consumidor, el perfil de sabor y sabor y el control de calidad (4).

3.3. Diseño central compuesto (DCC)

Box y Wilson (17) desarrollaron un diseño experimental que puede ser utilizado para el desarrollo de modelos lineales y cuadráticos que se conoce como DCC. Este es una buena alternativa al diseño factorial completo de tres niveles, ya que proporciona resultados comparables con un número menor de experimentos (4, 18). El DCC generalmente consiste en un diseño factorial completo o un diseño factorial fraccionado con dos niveles, puntos axiales o de estrella adicionales y al menos un punto central del diseño experimental (17). El número de experimentos requerido por este diseño está definido por la Ec (3):

$$n = 2^k + 2k + Co \quad Ec (3)$$

siendo que "k" es el número de factores y "Co" el número de puntos centrales (10). Una de las ventajas de esta herramienta es que se puede realizar de manera preliminar, como un paso para la evaluación de los factores como si se tratara de un diseño factorial completo de dos niveles. Por otra parte, este diseño contempla experimentos con todos los factores en el nivel negativo o positivo, lo cual es una desventaja porque las ejecuciones realizadas en condiciones extremas pueden inducir resultados insatisfactorios (13).

3.4. Diseño Taguchi

El éxito en experimentos y/o tecnología depende principalmente de un proceso o producto diseñado adecuadamente (19). El método de diseño de experimentos de Taguchi es una herramienta estadística simple que incluye un sistema de diseños tabulados (matrices) que permiten estimar un número máximo de efectos principales (ortogonal), con un número mínimo de ejecuciones experimentales (9). En general, propone el uso de diseños factoriales fraccionarios de dos niveles, que forman matrices ortogonales que se designan como L4, L8, L12, L16 y L32, en las que el índice numérico corresponde al número de experimentos que deben realizarse (19). Por ejemplo, la matriz L4 es un diseño factorial fraccional 2^{3-1} , cuyos niveles de la tercera variable están definidos por la relación de generación I = 123 o ABC. La matriz de Taguchi L12 es bastante diferente del diseño de Plackett Burman propuesto para evaluar 11 factores con 12 ensayos. El modelado que se realiza esencialmente relaciona la señal a ruido con las variables de control, en un enfoque de 'solo efecto principal'. Este enfoque permite estudiar problemas de múltiples respuestas y problemas dinámicos, mediante el manejo de factores de ruido (9).

4. Estrategias recomendadas para el uso de un diseño experimental

4.1. Selección del diseño

En la práctica, hay dos tipos de situaciones en las que el uso del diseño experimental en el procesamiento y desarrollo de alimentos es beneficioso. La primera situación es tratar de comprender los principales factores de control en el rendimiento del proceso, y la otra es, medir el valor óptimo para los factores dominantes (4, 10, 13). La Figura 2 ilustra un enfoque de selección de un diseño experimental. Antes de optar por la optimización, es aconsejable utilizar el diseño de cribado en un proceso que ahorrará tiempo y trabajo.

Cuando los números de factor son pequeños, el diseño factorial completo de dos niveles, puede ser la opción para la detectar los factores con mayor relevancia. Pero cuando los números de factor aumentan ($k > 5$), un diseño de Plackett-Burman o un diseño factorial fraccionado, se convierten en la opción para propósitos de detección. Se necesitan ensayos experimentales mínimos en un diseño de Plackett-Burman para detectar los factores impactantes. La segunda situación se presenta cuando entendemos que el rango variable de los factores seleccionados, puede contribuir al rendimiento total de diferentes maneras. El mejor valor para maximizar el rendimiento, es a veces demasiado teórico para lograrlo, de ahí que se haya aplicado el término óptimo. Los estudios de optimización intentan encontrar los niveles

más óptimos de los factores en el procesamiento de alimentos. Para la optimización, la elección de los niveles a investigar es crucial. Los diseños de Taguchi, el diseño central compuesto o el diseño de Box-Behnken se pueden utilizar para la optimización de un número pequeño de factores. Así mismo, es importante considerar que el diseño de Box-Behnken es una alternativa mucho más económica que otros diseños de optimización.

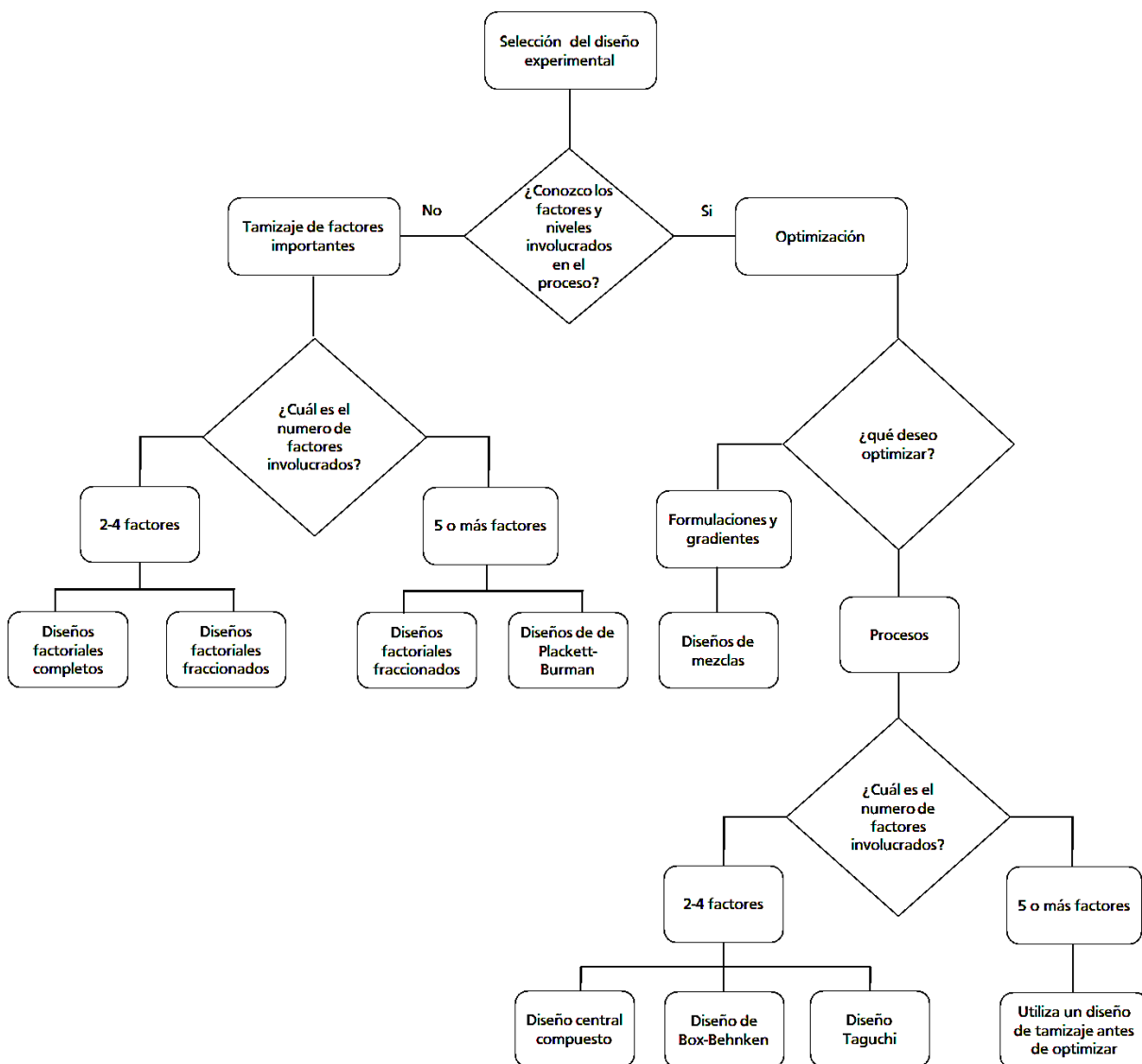


Figura 2. Diagrama de flujo para la selección de un diseño experimental. Adaptado de Sharif, Rahman (10)

4.2. Elección de un programa informático y matriz del diseño

En este punto, se debe generar la matriz del diseño de un estudio experimental. Existen algunas herramientas informáticas de diseño experimental especializado en el mercado, como el experto del DOE, Fusión Pro y Modde. Algunos programas estadísticos generales con compatibilidad de diseño experimental también pueden usarse para este propósito. La Tabla 3 muestra diferentes programas comerciales que se utilizan en el diseño y análisis de datos. La mayoría de los paquetes de informáticos, utilizan diferentes interfaces de usuario para que esta etapa sea fácil y conveniente. Para los usuarios principiantes, se recomienda familiarizarse con un programa antes del diseño y análisis de datos. Por tanto, es necesario un esfuerzo para comprender la interfaz y

así, lograr que el diseñar y analizar los datos sea fácil. Por ejemplo, el programa Statistica en su versión 12, mediante la opción "Experimental Design (DOE)" permite al usuario la creación apropiada de los diseños experimentales, seleccionar el número de factores y sus niveles (Ver definiciones en Apéndice 1), generando un número de experimentos aleatorios. La mayoría de estos programas permite a los usuarios analizar de manera sencilla sus experimentos, proporcionando resultados detallados de la falta de ajuste, el coeficiente, el valor de p y muchas otras estadísticas, gráficos para comprender los resultados. Sin duda, existen otros programas informáticos que no se consideran en el capítulo, considerando este hecho, ponemos a disposición del lector algunos revisiones de las aplicaciones de estas herramientas en diferentes áreas (20, 21).

Tabla 3. Ejemplos de paquetes informáticos para el diseño y análisis de experimentos

Nombre	Fabricante	Sitio web
JMP	SAS Institute Inc	http://www.sas.com
Minitab	Minitab Inc.	http://www.minitab.com
STATISTICA	StatSoft	http://www.statsoft.com
Matlab	The Mathworks Inc.	http://www.mathworks.com
Origin	Microcal Software	http://www.originlab.com/
Statgraphics	Startpoint Technologies	http://www.startgraphics.com
R project	Fundación R	https://www.r-project.org/

4.3. Ensayos experimentales

La etapa de experimentación a veces es tediosa, debido a los numerosos parámetros externos involucrados. La reproducibilidad y la precisión, deben verificarse antes de que los experimentos se lleven a cabo en un entorno particular. Es necesario mantener controladas las variables que influyen en el desarrollo del experimento, por ejemplo, la temperatura ambiente, la acidez del agua, la limpieza del material, el tamaño de las partículas y la recopilación de analistas. La aleatorización del experimento, es una forma importante que minimiza el efecto de aquellas variables que son difíciles de controlar. Además, se pueden presentar situaciones que requieran experimentos en más de un día. En estos casos, los experimentos se establecen en bloques (9). Por ello, la variabilidad y reproducibilidad del día a día en un día en particular debe considerarse antes de la ejecución del diseño experimental. Todo esto con la finalidad de establecer un proceso de recopilación de datos riguroso, a través de la medición con los instrumentos adecuados y con las medidas preventivas para obtener resultados confiables.

4.4. Análisis e interpretación de los datos

El primer paso del análisis de datos, debe concentrarse en la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas, en el ajuste del modelo, y el análisis de residuales, para posteriormente ir a un mayor análisis e interpretación. A veces, los investigadores encontrarán que los modelos matemáticos no son suficientes para considerar el rango experimental completo en estudio. Un modelo de orden superior, puede ser una forma de superar este problema. La evaluación del ajuste del modelo para el diseño experimental, se puede realizar por análisis de varianza. Una regresión estadísticamente significativa y una prueba negativa de falta de ajuste, representan una buena adecuación del modelo. Otra forma es mirar el valor residual, que consiste en evaluar si la variación que existe entre los datos puede describirse mediante los valores residuales en lugar de la ecuación de regresión. Esto puede interpretarse como la variación observada, debida a un error puro, lo que también cuestionará la calidad del modelo (6, 22). Un modelo bien ajustado, debería mostrar una distribución normal de residuos cuando se crea un gráfico visual, para facilitar la inspección del ajuste del modelo. Finalmente, la visualización de la ecuación del modelo predicho se puede obtener, mediante el gráfico de superficie de respuesta.

5. Aplicaciones en el aprovechamiento de sub-productos agroindustriales

La experiencia y el conocimiento de los tecnólogos en alimentos se aplican principalmente en ensayos a prueba y error, pero una forma mucho más eficiente es aplicar diseños experimentales. Sus aplicaciones se extienden desde el control de calidad de procesos industriales, hasta el análisis sensorial y aceptación de consumidores de productos formulados (23). La aplicación de cualquier diseño experimental normalmente conduce a la maximización de una o más características simultáneas en el producto resultante. Sin embargo, comúnmente se aplican varios diseños experimentales de forma consecutiva y ordenada, para elaborar un solo alimento. Por ejemplo, formular una bebida para maximizar uno de sus atributos (e.g. actividad antioxidante) con distintos ingredientes (factores) combinados a niveles convenientes (*1er diseño experimental*) para producir un conjunto de prototipos (formulaciones), en los que pueda evaluarse un segundo atributo sensorial (e.g. consistencia) con consumidores o paneles entrenados (2do. Diseño experimental), es una de las muchas estrategias combinadas.

Sin embargo, la utilidad de los diseños experimentales en el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios es algo incipiente. Algunas aplicaciones se describen en la Tabla 4 (24-37).

Tabla 4. Aplicaciones de los diseños experimentales en el aprovechamiento de subproductos agroindustriales

Subproducto	Objetivos del experimento	Diseño	Variables del diseño	Ref
Membranas de cascara de huevo	Producir concentrados peptídicos	Factorial completo	Relación enzima/sustrato, tiempo	24
Residuos de tilapia	Producir concentrado proteico	Factorial completo	T°C entrada, ToC salida, flujo	25
Subproducto de fruto de palma	Extracción de antioxidantes	Factorial fraccionado	pH, (EtOH), (sólido:líquido) T°C, tiempo	26
Cascara de plátano	Nano fibras de celulosa	Factorial fraccionado	T°C, pH, relación enzima/sustrato	27
Piel de salmón	Obtención de gelatina	Plackett-Burman	Hidrolisis enzimática y tiempo (pre-tratamiento), tiempo de pre-tratamiento, T°C y tiempo (Extracción)	28
Semilla de mango	Extracción de antioxidantes	Plackett-Burman	Tamaño de partícula, pH, (EtOH), tiempo, T°C, ciclos	29
Madera de <i>Eucalyptus globulus</i>	Producción de bioetanol	Box-Behnken	Cantidad de licor de maíz fermentado, suero de leche, levadura y Urea	30
Cascara de semilla de girasol	Extracción de antioxidantes	Box-Behnken	Concentración de MetOH, T°C, tiempo	31
Nisina/piel y semilla de aguacate	Optimizar capacidad antioxidante y antimicrobiana	Mezdas	Concentración de Nisina/piel y semilla de aguacate	32
Pasta desgrasada de aceituna	Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	Mezdas	(agua:metanol), T°C, amplitud, tiempo	33
Pulpa de manzana	Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	Diseño central compuesto	Energía ultrasónica, T°C, tiempo	34
Café gastado	Maximizar la glicosilación de lignocelulosa	Diseño central compuesto	Celulosa/hemicelulosa, tiempo,	35
Pulpa de cítricos	Producir pectidasa por fermentación en estado solido	Taguchi	Cantidad y tipo de pulpa cítrica, pH inicial, medio solido (paja de trigo o arroz)	36
Grano gastado de cerveza	Producción de peptidasas	Taguchi	Variedad de sustrato, tamaño grano, nivel de extracción de polifenoles	37

Por ejemplo, Santana *et al.* (24) optimizaron la obtención de un hidrolizado proteico (alcalasa/proteasa) a partir de membrana interna de cascara de huevo, con máxima capacidad antioxidante ($4 \mu\text{mol g}^{-1}$ de proteína) e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina ($\text{IC}_{50} 34.5 \pm 2.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) mediante un *diseño factorial completo* con trece experimentos independientes ($N=2k + 2k + n_0$) y análisis por superficie de respuesta, involucrando tres tipos de enzima, la relación enzima sustrato y el tiempo de hidrólisis como factores. Tibolla *et al.* (27), encontraron las condiciones

analíticas ideales (T°C (35-55), pH (6.0), relación enzima/sustrato (70 U de xilanasas g⁻¹sustrato)] para la obtención de nanofibras de celulosa a partir de salvado de lignificado de cáscara de plátano (15 % w/v en reacción) utilizando un diseño factorial fraccionado (2⁴⁻¹) con tres puntos centrales; los autores reportaron que el pH, particularmente entre 4 (-1) a 6 (+1) tuvo más influencia (p = 0.006) que la concentración de enzima o sustrato (p~0.03) en el tamaño de partícula mientras que el pH y que la temperatura influenciaron levemente el rendimiento (efecto ~14.0, p~0.063).

Icyer *et al.* (2015) utilizaron un diseño de mezclas y un análisis de superficie de respuesta para maximizar la obtención de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante a partir de pasta de aceituna desgrasada; los autores sustentaron esta decisión debido a que las condiciones de extracción supersónica (T°C, amplitud/ tiempo) varían en relación al tipo y concentración del solvente utilizado. Los autores reportaron que utilizando metanol acuoso al 51.1 %, una temperatura de 60 °C, amplitud del 13.71 % por 21.05 minutos se extraía la mayor cantidad de compuestos fenólicos (~50 mg/g). Por último, Anvari y Khayati (36) aplicaron un diseño ortogonal L16 (método Taguchi) para evaluar la influencia de 5 factores distintos (tipo de sustrato, pH inicial, relación C:N del medio y pulpa cítrica) en la producción de pectinasa a partir del cultivo en fase sólida de *Aspergillus niger* (PTCC 5010) y encontrando que el tipo y concentración de pulpa cítrica fue el factor más relevante; los autores utilizaron este método para reducir sustancialmente el número de combinaciones a 16 pues el diseño factorial completo correspondiente resultaría en 256 combinaciones (4³ 2² = 256).

6. Conclusiones

Existe un amplio espectro de herramientas estadísticas que pueden ser utilizadas por los investigadores, al momento de utilizar un subproducto agroalimentario para la obtención de compuestos bioactivos para el desarrollo de alimentos. Es importante destacar, que generalmente, se deben contemplar dos etapas para cada desarrollo, un diseño de selección, y posteriormente, un diseño de optimización. La combinación de ambos, es una práctica que mejora sustancialmente la efectividad de los diseños, el decidir, cuál utilizar definitivamente delimitará el alcance y propiedades en el desarrollo de nuevos productos. Estas herramientas estadísticas, así como los modelos de optimización, facilitan la investigación cuando se desea llevar a cabo el diseño de un alimento funcional o nutraceuticos a partir de distintos subproductos derivados de la agroindustria. Por lo que es de vital importancia, para tener validez científica y tecnológica, el uso apropiado de estas herramientas estadísticas y reducir el trabajo experimental, reduciéndose significativamente los tiempos de experimentación y los costos.

Referencias

1. Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., & Escalera, L.A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-77.
2. Olsson, M., Gottfries, J., & Wold, S. (2004). D-optimal onion designs in statistical molecular design. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 73(1), 37-46.
3. Dejaegher, B., & Vander Heyden, Y. (2011). Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 56(2):141-58.
4. Yu, P., Low, M.Y., & Zhou, W. (2018). Design of experiments and regression modelling in food flavour and sensory analysis: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 202-215.
5. Hibbert, D. (2012). Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 910, 2-13.
6. Montgomery, D.C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John Wiley.
7. Li, Z., Zhang, T., & Zhang, R. (2013). Three-level regular designs with general minimum lower-order confounding. *Canadian Journal of Statistics. = Revue Canadienne De Statistique*, 41, 192-210.
8. Plackett, R., & Burman, J.P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.
9. Ferreira, S., Caires, A.O., Borges, T., Lima, A.M., Silva, L.O., & Santos, W.N. (2017). Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal*, 131, 163-169.

10. Sharif, K.M., Rahman, M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M., Sahena, F., & Zaidul, I. (2014). Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, *124*, 105-116.
11. Box, G.E., Hunter, J.S., & Hunter, W.G. (2005). *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery*. New York. Wiley-Interscience.
12. Brereton, R., Jansen, J., Lopes, J., Marini, F., Pomerantsev, A., Rodionova, O., Roger, J.M., Walczak, B., & Tauler, R. (2017). Chemometrics in analytical chemistry—part I: history, experimental design and data analysis tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*, 5891-5899.
13. Ferreira, S., Junior, M.M., Felix, C.S., Silva, D.L., Santos, A.S., Neto, J.H., Souza, C.T., Junior, R.A., & Souza, A.S. (2019). Multivariate optimization techniques in food analysis - A review. *Food chemistry*, *273*, 3-8 .
14. Candioti, L., Zan, M.M., Câmara, M.S., & Goicoechea, H. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, *124*, 123-38 .
15. Toker, O.S., Do an, M., Canıylmaz, E., Ersöz, N.B., & Kaya, Y. (2012). The Effects of Different Gums and Their Interactions on the Rheological Properties of a Dairy Dessert: A Mixture Design Approach. *Food and Bioprocess Technology*, *6*, 896-908.
16. Handa, C., Lima, F.S., Guelfi, M., Georgetti, S.R., & Ida, E. (2016). Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food chemistry*, *197 Pt A*, 175-184 .
17. Box, G., & Wilson, K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the royal statistical society series b-methodological*, *13*, 1-38.
18. Tarley, C.R., Silveira, G., Santos, W.N., Matos, G., Silva, E., Bezerra, M.A., Miró, M., & Ferreira, S. (2009). Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*, *92*, 58-67.
19. Rao, R.S., Kumar, C.G., Prakasham, R.S., & Hobbs, P. (2008). The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnology Journal*, *3*, (4):510-23.
20. Musina, O., Putnik, P., Koubaa, M., Barba, F., Greiner, R., Granato, D., & Roohinejad, S. (2017). Application of modern computer algebra systems in food formulations and development: A case study. *Trends in Food Science and Technology*, *64*, 48-59.
21. Nunes, C.A., Alvarenga, V., Sant'Ana, A.D., Santos, J., & Granato, D. (2015). The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. *Food research international*, *75*, 270-280.
22. Pimentel, M.F., & Neto, B.B. (1996). Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova*, *19*, 268-277.
23. Bower, J.A. (2013). *Statistical methods for food science: introductory procedures for the food practitioner*. Wiley-Blackwell.
24. Santana, A., Melo, A., Tavares, T., & Ferreira, I.M. (2016). Biological activities of peptide concentrates obtained from hydrolysed eggshell membrane byproduct by optimisation with response surface methodology. *Food & function*, *7*(11), 4597-4604.
25. Paris, L.D., Haab, J.C., Sary, C., Bernardi, D.M., Boscolo, W.R., & Signor, A. (2016). Production and spray drying of protein hydrolyzate obtained from tilapia processing by-products. *Acta Scientiarum-technology*, *38*, 89-97.
26. Wong, W.H., Lee, W.X., Ramanan, R.N., Tee, L.H., Kong, K., Galanakis, C., Sun, J., & Prasad, K. (2015). Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. *Industrial Crops and Products*, *63*, 238-248.
27. Tibolla, H., Pelissari, F. M., Rodrigues, M. I. & Menegalli, F. C. (2017). Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial crops and products*, *95*, 664-674.
28. Fan, H., Dumont, M.J., & Simpson, B.K. (2017). Extraction of gelatin from salmon (*Salmo salar*) fish skin using trypsin-aided process: optimization by Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Journal of food science and technology*, *54*(12), 4000-4008.
29. Torres-León, C., Rojas, R., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R., & Aguilar, C.N. (2017). Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave. *Food and Bioprocess Processing*, *105*, 188-196.
30. Kelbert, M., Romani, A., Coelho, E., Pereira, F.B., Teixeira, J.A., & Domingues, L. (2015). Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements. *Industrial crops and products*, *64*, 16-24.

31. Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., & Sztyk, E. (2011). Optimization of extraction conditions of antioxidants from sunflower shells (*Helianthus annuus* L.) before and after enzymatic treatment. *Industrial Crops and Products*, *33*(1), 123-131.
32. Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H. B., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., & Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, *65*, 46-52.
33. Icyer, N.C., Toker, O.S., Karasu, S., Tornuk, F., Bozkurt, F., Arici, M., & Sagdic, O. (2016). Combined design as a useful statistical approach to extract maximum amount of phenolic compounds from virgin olive oil waste. *LWT-Food Science and Technology*, *70*, 24-32.
34. Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C.M., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, *17*(6), 1066-1074.
35. Scully, D.S., Jaiswal, A.K., & Abu-Ghannam, N. (2016). An investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. *Bioengineering*, *3*(4), 33.
36. Anvari, M., & Khayati, G. (2014). The effect of citrus pulp type on pectinase production in solid-state fermentation: Process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Journal of BioScience & Biotechnology*, *3*(3).
37. Kotlar, C.E., Agüero, M.V., & Roura, S.I. (2012). Statistical optimization of a novel low-cost medium based on regional agro-industrial by-products for the production of proteolytic enzymes by *Bacillus cereus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *42*(5), 406-425.

Apéndice 1. Conceptos básicos en diseño de experimentos

Término	Definición
Control o línea base	Punto de referencia
Corrida	Un experimento llevado a cabo en valores específicos para cada factor
Efecto	Magnitud del cambio en la respuesta al variar los factores
Efecto principal	El resultado de un factor único
Experimento	Una investigación planificada y controlada
Factor	Variable experimental bajo estudio (e.g. temperatura, tiempo, pH)
Interacción	El resultado de un factor combinado con otro(s)
Modelo	Ecuación matemática que define la respuesta en función de los factores estudiado
Niveles	Valores específicos de los factores para un experimento dado
Respuesta	Variable que es medida que depende principalmente de los factores en estudio
Treatment	La aplicación de configuraciones combinadas
Unidad de muestreo	Unidad individual muestreada de una población
Unidad experimental	Unidad de muestreo que se asigna en el experimento para recibir un tratamiento
Variable	Cualquier característica del experimento que puede variar (conocida o desconocida)

En este volumen se abordan distintos aspectos clave para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales y la valorización de recursos regionales.

Esta publicación surgió de las exposiciones y debates que tuvieron lugar en el marco de la Red Iberoamericana LACFUN-CYTED 415RT0495, del Área Desarrollo Sostenible, entre 2015 y 2019. En esta red participaron investigadores de ocho países (Argentina, Bolivia, Brasil Chile, Colombia, España, México y Uruguay) y además dos empresas (Rocío del Campo y Biofe, ambas de la Provincia de Santa Fe, Argentina) y se combinó con las actividades de un Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS), financiado por CONICET (Argentina) y el CIN (Consejo Interuniversitario Nacional). Han sido invitados para contribuir a este libro los referentes internacionales relacionados con los temas abordados, relacionados con los grupos participantes. Especialmente, materializando el intercambio inter-redes, se ha invitado a miembros de la Red Iberoamericana de Alimentos Autóctonos Subutilizados (ALSUB-CYTED, 118RT0543), coordinada por la Dra. Sandra Sayago, a contribuir con un capítulo sobre análisis multivariado.

El desarrollo sostenible se basa en la necesidad de que exista un delicado equilibrio entre tres aspectos: el impulso económico de una región, la conservación del medio ambiente y el bienestar de la sociedad involucrada. Se plantea como uno de los objetivos de la FAO para contribuir a la seguridad alimentaria (ODS 2).

Las reuniones, que se realizaron en varios de los países miembros de la Red, tuvieron como objetivo el estudio y la difusión de los beneficios de la recuperación de subproductos agroindustriales y el aprovechamiento de recursos regionales para la producción de alimentos. Estos aspectos favorecen también la soberanía alimentaria, que es uno de los componentes de la seguridad alimentaria.



Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social
CIN Consejo Interuniversitario Nacional



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina