

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE
RESIDUOS DE PALTA HASS MEDIANTE EFS-CO₂-
ETANOL Y SU ESTABILIZACIÓN EN HIDROGELES DE
ALGINATO DE PROPIEDADES REOLÓGICAS Y
TÉRMICAS DEFINIDAS**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster
en Ciencias de los Alimentos por:**

MARÍA TRINIDAD TORO ROJAS

Director de Tesis: Dr. Jaime Ortiz Viedma

Santiago-CHILE

Agosto 2012

Índice

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES GENERALES	4
2.1 La Palta.....	4
2.1.1 Caracterización química de la semilla y cáscara de la palta Hass	6
2.1.2. Principales compuestos fenólicos encontrados en la semilla y cáscara de palta Hass ...	6
2.2 Producción mundial y nacional	7
2.3 Actividad antioxidante	8
2.3.1. Antioxidantes sintéticos.....	9
2.3.2. Antioxidantes naturales.....	10
2.3.3. Polifenoles	10
2.3.3.1. Mecanismo de acción de los fenoles.....	12
2.3. Importancia de los residuos derivados de la industria de los alimentos.....	13
2.4. Fluidos supercríticos	14
2.4.1. Extracción mediante CO ₂ supercrítico	16
2.4.2. Uso de etanol como co-solvente de extracción.....	17
2.5 Extracción de polifenoles con solvente orgánico.....	18
2.6. Metodología de superficie de respuesta	19
2.7. Secado por lecho fluidizado (SLF).....	20
2.8. Encapsulación y generación de hidrogeles.....	21
2.8.1. El alginato y la formación de hidrogeles	22
2.8.2. Encapsulación por extrusión	23
2.9. Análisis térmico.....	24
2.9.1. Utilización de la calorimetría diferencial de barrido en la Ciencia de los Alimentos ..	25
2.10. Reología	26
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	31

3.1. Lugar de trabajo	31
3.2. Materiales	31
3.2.1. Materia prima	31
3.2.2. Equipos e instrumentos	31
3.2.3. Reactivo	32
3.2.4. Materiales de vidrio y otros	33
3.2.5. Pretratamiento de las muestras	34
3.2.5.1. Molienda	34
3.2.5.2. Secado por lecho fluidizado	34
3.2.6. Caracterización física del sustrato	34
3.2.6.1 Distribución del tamaño de partícula	34
3.2.6.2. Determinación de humedad	35
3.2.6.3. Densidad aparente (ρ_{ap})	35
3.3. Métodos	35
3.3.1 Extracción Supercrítica	35
3.3.1.1. Adición de co-solvente	36
3.3.1.2. Condiciones de extracción	36
3.3.2. Extracción hidroalcohólica	36
3.3.3. Contenido de fenoles totales	37
3.3.4. Capacidad antioxidante por el método del DPPH	38
3.3.5. Cálculo de la eficiencia de encapsulación (%EE)	39
3.3.6. Diseño experimental	39
3.3.6.1. Diseño experimental general para los métodos de extracción	39
3.3.6.2. Diseño experimental para el método de extracción supercrítica	40
3.3.6.3. Diseño experimental para el método de extracción hidroalcohólica	41
3.3.7. Elaboración de los hidrogeles (encapsulación por extrusión)	44

3.3.8. Comportamiento reológico de los hidrogeles	44
3.3.8.1. Análisis Rotatorios.....	45
3.3.8.2. Análisis Oscilatorios (Dinámicos)	45
3.3.9. Análisis térmico	45
3.3.9.1. Programa térmico.....	46
3.3.10. Dimensiones y la forma de los geles de alginato de calcio.....	46
3.3.11. Resumen metodología.....	47
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
4.1. Caracterización física del sustrato.....	48
4.2. Análisis estadístico.....	49
4.2.1. Análisis estadístico del efecto de las variables sobre las respuestas polifenoles (Y_{SC}) totales obtenidos mediante extracción supercrítica.....	49
4.2.1.1 Análisis de varianza y MSR para polifenoles obtenidos por extracción supercrítica. 52	
4.2.2. Análisis estadístico del efecto de las variables sobre las respuestas polifenoles totales (Y_{HH}) obtenidos mediante extracción hidroalcohólica.	57
4.2.2.1 Análisis de varianza y MSR para los polifenoles obtenidos por hidroalcohólica.....	61
4.3. Capacidad antioxidante por el método del DPPH para las mejores condiciones seleccionadas en cada método.....	63
4.4. Cálculo de la eficiencia de encapsulación.....	64
4.4. Análisis reológico de los hidrogeles de alginato	65
4.4.1. Ensayos reológicos rotatorios de los hidrogeles de alginato para los distintos mecanismos de extracción	65
4.4.1.1. Viscosidad aparente	66
4.4.2. Ensayos reológicos dinámico de los hidrogeles de alginato para los distintos mecanismos de extracción	68
4.4.2.1. Barrido de deformación	68
4.4.2.1.1. Visualización de la zona lineal viscoelástica	69

4.4.2.2. Barrido de frecuencia.....	70
4.5. Análisis microscópico	72
4.6. Calorimetría diferencial de barrido	73
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	74
6. Anexos.....	75
Anexo A. Caracterización física de sustrato.	75
Anexo B: Análisis estadístico	80
Anexo C. Datos comportamiento reológico de los hidrogeles.....	81
Anexo D. Composición fenólica de extractos hidroalcohólicos de residuos de palta Hass.....	83
Anexo E. Curva de calibración ácido gálico	88
7. Bibliografía.....	89

Índice de tablas

Tabla 2.1.	Caracterización química de la semilla y cáscara de palta Hass.	6
Tabla 2.2.	Fenoles identificados en la cáscara de palta Hass	7
Tabla 2.3.	Fenoles identificados en la semilla de palta Hass	7
Tabla 2.3.	Parámetros críticos de diferentes sustancias potencialmente útiles como fluidos supercríticos.	17
Tabla 2.3.	Parámetros críticos de diferentes sustancias potencialmente útiles como fluidos supercríticos.	17
Tabla 2.4.	Muestra de alimentos típicos y sus aplicación en el DSC.	27
Tabla 3.1.	Variables independientes y sus niveles para diseño Box-Behnken.	41
Tabla 3.2.	Diseño experimental Box-Behnken para extracción supercrítica.	41
Tabla 3.3.	Variables independientes y sus niveles para diseño Box-Behnken.	43
Tabla 3.4.	Diseño experimental Box-Behnken para extracción hidroalcohólica.	43
Tabla 4.1.	Contenido de fenoles totales en función de las variables presión, proporción cáscara:semilla, y uso de co-solvente.	50
Tabla 4.2.	Indicadores estadísticos del análisis de varianza del modelo de segundo orden seleccionado.	50
Tabla 4.3.	Análisis de varianza del modelo cuadrático para respuesta Y_{SC} .	52
Tabla 4.4.	Contenido de fenoles totales en función de las variables tiempo de agitación, proporción cáscara:semilla, y % soluto/solvente.	58
Tabla 4.5.	Indicadores estadísticos del análisis de varianza del modelo de segundo orden seleccionado.	59
Tabla 4.6.	Análisis de varianza del modelo cuadrático para respuesta Y_{HH} .	61
Tabla 4.7.	Eficiencia de encapsulación para extractos obtenidos por extracción hidroalcohólica y extracción supercrítica.	64
Tabla 4.8.	Rangos de los parámetros estadísticos del modelo Herschel-Bulkley para hidrogeles de alginato con extractos hidroalcohólicos y supercríticos.	67
Tabla A-1.	Contenido de humedad de la cáscara.	75

Tabla A-2.	Contenido de humedad de la semilla.	75
Tabla A-3	Densidad aparente de la cáscara.	76
Tabla A-4.	Densidad aparente de la semilla.	76
Tabla A-5.	Determinación del tamaño de partícula de cáscara molida y secada por lecho fluidizado.	77
Tabla A-6.	Determinación del tamaño de partícula de semilla molida y secada por lecho fluidizado.	78
Tabla B-1.	Valores actuales y predichos para las respuestas contenido de fenoles totales (Y_{SC}).	80
Tabla B-2.	Valores actuales y predichos para las respuestas contenido de fenoles totales (Y_{HH}).	80
Tabla C-1.	Análisis Rotatorio y viscosidad.	81
Tabla C-2	Barrido de deformación.	81
Tabla C-3.	Barrido de frecuencia.	82
Tabla C-4.	Rangos de los parámetros estadísticos de los modelos reológicos determinados para la curva de flujos de hidrogeles de alginato con extractos hidroalcohólicos y supercríticos.	83
Tabla D-1.	Tabla de composición fenólica de extractos de cáscara de palta Hass.	84
Tabla D-2.	Tabla de composición fenólica de extractos de semilla de palta Hass.	86

Índice de figuras

Figura 2.1.	Árbol del palto.	4
Figura 2.2.	Fruto del palto.	4
Figura 2.3.	Estructura química de la sub-clase de los flavonoides.	12
Figura 2.4.	Diagrama de fases general para un fluido supercrítico.	15
Figura 2.5.	Gelificación del alginato con calcio. Modelo “caja de huevos”.	23
Figura 2.6.	Tipo de dispositivos extrusores.	25
Figura 2.7.	Esquema del funcionamiento del calorímetro diferencial de barrido.	25
Figura 2.8.	Reograma para diversos fluidos.	29
Figura 3.1.	Mapa de la comuna de Quillota, V Región de Valparaíso.	31
Figura 3.2.	Resume metodología.	47
Figura 4.1.	Valores predichos v/s valores experimentales obtenidos en el mecanismo de extracción supercrítico.	52
Figura 4.2.	Superficie de respuesta de contenido de fenoles totales (Y_{SC}) como una función de la presión (P) y co-solvente (C), a un valor medio de cáscara:semilla (CS) de 1:3.	54
Figura 4.3.	Superficie de respuesta de contenido de fenoles totales (Y_{SC}) como una función de la presión (P) proporción cáscara:semilla (CS), a un valor medio de co-solvente de 4% p/p.	56
Figura 4.6.	Valores predichos v/s valores experimentales obtenidos en el mecanismo de extracción hidroalcohólica.	60

Figura 4.7.	Superficie de respuesta de contenido de fenoles totales (Y_{HH}) como una función de la fracción soluto/solvente (SS) y tiempo de extracción (T), a un valor medio de cáscara:semilla (CS) de 1:3.	62
Figura 4.8.	Curva de fluidez en ensayos rotatorios para hidrogeles de alginato mezclados con extractos polifenólicos.	66
Figura 4.9.	Viscosidad aparente de los hidrogeles de alginato.	67
Figura 4.10.	Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función de la deformación relativa para los hidrogeles elaborados con extracto Supercríticos.	69
Figura 4.11.	Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función de la deformación relativa para los hidrogeles elaborados con extracto Hidroalcohólico.	69
Figura 4.12.	Amplificación de la zona lineal viscoelástica del barrido de deformación relativa para los hidrogeles elaborados con extractos supercríticos.	70
Figura 4.13.	Amplificación de la zona lineal viscoelástica del barrido de deformación relativa para los hidrogeles elaborados con extractos hidroalcohólicos.	70
Figura 4.14.	Barrido de frecuencia hidrogeles con extractos supercríticos.	71
Figura 4.15.	Barrido de frecuencia hidrogeles con extractos hidroalcohólicos.	71
Figura 4.16.	Fotografías obtenidas mediante microscopía óptica de hidrogeles o microesferas de alginato elaboradas con extractos supercríticos	72
Figura 4.17	Fotografías obtenidas mediante microscopía óptica de hidrogeles o microesferas de alginato elaboradas con extractos hidroalcohólicos	72
Figura 4.18.	Termograma DSC de hidrogeles de alginato con extractos supercríticos.	73

Figura 4.19.	Termograma DSC de hidrogeles de alginato con extractos hidroalcohólicos.	73
Figura A-1.	Distribución del tamaño partícula obtenido del tamizado de muestra de cáscara de palta Hass.	79
Figura A-2.	Distribución del tamaño partícula obtenido del tamizado de muestra de semilla de palta Hass.	79
Figura E-1.	Curva de calibración de estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles por método Folin Ciocalteu.	88

Resumen

Actualmente, existe un gran interés científico y tecnológico por la investigación y el desarrollo de nuevas aplicaciones de diferentes compuestos bioactivos presentes en los alimentos y sus derivados industriales, que normalmente son considerados como desechos. El objetivo de este trabajo es la obtención de extractos fenólicos de cáscara y semilla de palta Hass mediante extracción con CO₂ supercrítico y su comparación con extracción hidroalcohólica, contemplando además su concentración y funcionalidad antioxidante en forma de extracto crudo así como estabilizada como hidrogeles de alginato. Las extracciones fueron optimizadas mediante el estudio del efecto de algunas variables; para el método de extracción supercrítica (45°C cte.) fueron: presión (200, 300 y 400 bar), proporción cáscara:semilla (1:2, 1:3 y 1:4 %) y co-solvente (2, 4 y 6 % p/p); para el método de extracción hidroalcohólica (50% agua/50% etanol) las variables estudiadas fueron: proporción cáscara:semilla (1:2, 1:3 y 1:4 %), tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y fracción soluto/solvente (3, 5 y 7 % p/v); ambos métodos de extracción se evaluaron sobre la respuesta contenido de fenoles totales (Y_{SC} : Supercrítico e Y_{HH} : Hidroalcohólica). El diseño factorial seleccionado fue el diseño Box-Behnken determinado por el software Design-Expert con 3 variables independientes y cada una con 3 niveles de trabajo, el efecto de estas variables se analizaron según un estudio de superficie de respuesta. Las extracciones se realizaron a partir de cáscaras y semillas trituradas y secadas mediante lecho fluidizado. Una vez optimizadas las condiciones de extracción, los extractos con mayor contenido de polifenoles se estabilizaron en forma de hidrogeles mediante interacción del alginato y calcio a los cuales se les determinó su aspecto mediante microscopía óptica, rendimiento de encapsulación, estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y sus propiedades de flujo y viscoelásticas por reología rotacional y oscilatoria, respectivamente. Los objetivos principales del estudio fueron: I. Determinar las diferencias entre los dos métodos de extracción de acuerdo al contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos; II. La estabilización de los compuestos bioactivos y fenoles presentes en el extracto mediante la generación de hidrogeles encapsulantes de alginato. III. La determinación de las propiedades reológicas y térmicas de los hidrogeles bioactivos. IV. La proyección del uso de los hidrogeles bioactivos como ingrediente en formulaciones alimentarias y farmacéuticas. Los resultados indicaron que las condiciones óptimas de extracción de polifenoles con el método supercrítico fueron de 400 bar, una proporción de cáscara:semilla de 1:3 y 6% co-solvente dando contenido de fenoles de 726,24 mg EAG/100g muestra seca. Por otro lado, para el método de extracción hidroalcohólico las mejores condiciones para la obtención de polifenoles

fueron de 3 horas de agitación, una proporción de cáscara:semilla de 1:3 y 3% p/v de soluto/solvente dando contenido de fenoles de 987,12 mg EAG/100g muestra seca. De acuerdo al análisis reológico los hidrogeles obtenidos con extractos hidroalcohólicos soportan un mayor esfuerzo de cizalla que los obtenidos por extractos supercríticos, por otro lado las dos muestras de hidrogeles exhibieron un comportamiento viscoelástico a lo largo de todo el intervalo de frecuencia predominando el comportamiento elástico dado por el módulo G' . De acuerdo al comportamiento térmico de los hidrogeles de los extractos supercrítico y hidroalcohólico, alrededor de los 60°C y 56 °C se produce el primer pico endotérmico correspondiendo respectivamente a la fusión de cada uno de los de hidrogeles de alginato. Por otro lado, se presentó un segundo pico correspondiente a un comportamiento exotérmico a los 210 °C y los 220 °C, para los hidrogeles obtenidos con extractos hidroalcohólicos y supercrítico, respectivamente.

Summary

Currently, there is great scientific and technological interest in the research and development of new applications of different bioactive compounds present in food and its industrial derivatives, which are usually considered as waste. The objective of this work is the obtaining of phenolic extracts of Hass avocado peel and seed by means of extraction with supercritical CO₂ and its comparison with hydroalcoholic extraction, also contemplating its concentration and antioxidant functionality in the form of crude extract as well as stabilized as alginate hydrogels. The extractions were optimized by studying the effect of some variables; for the supercritical extraction method (45 °C cte) were: pressure (200, 300 and 400 bar), ratio of shell:seed (1:2, 1:3 and 1:4 %) and cosolvent (2, 4 and 6% w/w); For the hydroalcoholic extraction method (50% water/50% ethanol), the variables studied ratio of shell:seed (1:2, 1:3 and 1:4 %), agitation time (1, 2 and 3 h) And solute/solvent fraction (3, 5 and 7% w/v); Both extraction methods were evaluated on the response content of total phenols (Y_{SC}: Supercritical and Y_{HH}: Hydroalcoholic). The Box-Behnken design was determined by the Design-Expert software with 3 independent variables and each with 3 work levels, the effect of these variables was analyzed according to a surface response study. The extractions were made from husks and seeds crushed and dried by fluidized bed. Once the extraction conditions were optimized, extracts with higher polyphenol contents were stabilized as hydrogels by the interaction of alginate and calcium, which were determined by optical microscopy, encapsulation performance, thermal stability by differential scanning calorimetry (DSC) and its flow and viscoelastic properties by rotational and oscillatory rheology, respectively. The main objectives of the study were: I. To determine the differences between the two extraction methods according to the total phenol content of the extracts obtained; II. The stabilization of the bioactive compounds and phenols present in the extract by the generation of alginate encapsulating hydrogels. III. Determination of the rheological and thermal properties of bioactive hydrogels. IV. The projection of the use of bioactive hydrogels as an ingredient in food and pharmaceutical formulations. The results indicated that the optimum polyphenol extraction conditions with the supercritical method were 400 bar, a ratio of shell: seed 1: 3 and 6% co-solvent giving phenol content of 726,24 mg EAG / 100 g dry sample . On the other hand, for the hydroalcoholic extraction method, the best conditions for obtaining polyphenols were 3 hours of agitation, a ratio of shell: seed of 1:3 and 3% w/v of solute/solvent giving phenol content of 987,12 mg EAG/100g dry sample. According to the rheological analysis the hydrogels obtained with hydroalcoholic extracts support a greater shear stress than those obtained by supercritical extracts, on the other hand the

two samples of hydrogels exhibited a viscoelastic behavior throughout the entire frequency range predominating the given elastic behavior By the module G' . According to the thermal behavior of the hydrogels of the supercritical and hydroalcoholic extracts, at about 60 °C and 56 °C the first endothermic peak corresponding to the melting of each of the alginate hydrogels occurs. On the other hand, a second peak corresponding to an exothermic behavior at 210 °C and 220 °C was presented for hydrogels obtained with hydroalcoholic and supercritical extracts, respectively.

Capítulo 1: Introducción

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe un gran interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales de compuestos antioxidantes y el estudio de sus efectos una vez que son adicionados en distintos productos alimentarios (Rodríguez Carpena et al., 2011). Además hoy en día existe en los consumidores una tendencia al consumo de productos naturales en lugar de los sintéticos, debido a los posibles efectos negativos en la salud (Mesa et al., 2010). Se sabe que existe una cantidad significativa de compuestos fenólicos en los alimentos que se consumen habitualmente, como frutas, verduras, entre otros; y estas son responsables de su calidad sensorial y nutricional (Ignat et al., 2011), por lo que hoy en día son ampliamente estudiados. Por otro lado, el gran desarrollo que ha alcanzado la actividad agroindustrial ha repercutido negativamente en el medioambiente (Chávez et al., 2011). Uno de los principales efectos es el incremento en la generación de residuos, esto ha impulsado a buscar nuevas técnicas o métodos para el aprovechamiento de los residuos. Cada residuo generado en el proceso agroindustrial puede ser aprovechado en otras aplicaciones, como la obtención de ingredientes funcionales destinados a la mejora de alimentos para consumo humano o animal (Galanakis, 2012). Específicamente la industria de la palta lo único que se aprovecha es el aceite de la pulpa, dejando de lado la cáscara y la semilla, que no son de interés ya que no son valorados como fuentes de aditivos funcionales para productos alimentarios, sin embargo estos residuos son ricos en polifenoles (Wijngaard y Brunton, 2010) y además poseen capacidad antioxidante y antimicrobiana (Rodríguez et al., 2011), por lo que se hace imprescindible la búsqueda de nuevos métodos de obtención de estos compuestos bioactivos provenientes de residuos. El proceso de extracción es importante en el aislamiento e identificación de los compuestos fenólicos; la capacidad de extracción depende del disolvente, la naturaleza y la preparación de material a extraer, la estructura química de los compuestos fenólicos, temperatura, tiempo de extracción, relación sólido-líquido, método de extracción empleado y la posible presencia de sustancias de interferencia (Bucić-Kojić y col., 2011).

Se ha informado en la literatura especializada sobre la extracción de polifenoles usando CO₂ supercrítico, la cual permite una rápida y selectiva extracción de compuestos naturales desde sustratos sólidos (Esquivel y Vargas, 2007). Sin embargo, ya que el CO₂ es un disolvente apolar no puede solubilizar compuestos polares (como los polifenoles) y la eficacia de la extracción de estos compuestos naturales es baja (Velasco et al., 2007). La solubilidad de compuestos naturales en CO₂ supercrítico puede mejorarse mediante la variación de las condiciones de extracción y en

particular mediante la adición de co-solventes polares, tales como etanol, metanol o agua en bajas concentraciones (Cháfer et al., 2005).

En base a lo expuesto, esta investigación tuvo como objetivo obtener extractos fenólicos de los residuos de semilla y cáscara de palta Hass, mediante CO₂ supercrítico y co-solvente etanol y comparar su capacidad antioxidante con la de extractos obtenidos con mezcla hidroalcohólica. Además, estos extractos fenólicos serán estabilizados en hidrogeles de alginato de propiedades reológicas y térmicas definidas.

Hipótesis

La semilla y cáscara de palta Hass contiene compuestos fenólicos con capacidad antioxidante factibles de extraer con CO₂ supercrítico y co-solvente etanol en función de su polaridad. Estos compuestos fenólicos son posibles de mantener en un sistema de hidrogeles de alginato de propiedades reológicas y térmicas definidas.

Objetivos generales

- Estudiar la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes de la cáscara y semilla de palta Hass mediante diferentes métodos de extracción y a la vez lograr su estabilización por medio de la generación de hidrogeles de alginato.

Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de las variables independientes, sobre el contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos por extracción supercrítica y extracción hidroalcohólica.
- Comparar los extractos obtenidos por el método de extracción supercrítica y por el método de extracción hidroalcohólica de acuerdo al contenido de fenoles totales.
- Seleccionar la mejor condición de cada método según su contenido de fenoles totales.
- Evaluar la eficiencia de encapsulación, el comportamiento reológico (Reología), térmico (DSC) y estructural (microscopía óptica) de los hidrogeles de alginato enriquecidos con los respectivos extractos seleccionados.

Capítulo 2: Antecedentes generales

CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES GENERALES

2.1 La Palta

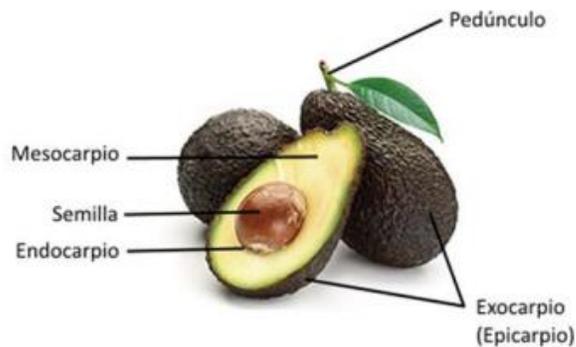
El palto (*Persea americana*) es un árbol de frutos tropicales distribuido en muchas partes del mundo (Figura 2.1). Perteneciente a la familia *Lauraceae*, el árbol se cree que es originario de México. En todo el mundo existen muchas variedades de palta (Yanty et al., 2011) pero según Dabas et al. (2011), la variedad Hass (Figura 2.2) es la más cultivada; eso porque una de las mayores virtudes de Hass es su prolongada estación de cosecha, factor que unido a su gran calidad ha permitido aumentar el consumo mundial de paltas. Además, la amplia aceptación de Hass en casi todos los mercados mundiales ha fortalecido la demanda por paltas de piel negra y rugosa en relación con las paltas de cáscara verde y lisa.

La palta se desarrolló en diversas subespecies debido a su aislamiento geográfico, originando finalmente diferentes tipos botánicos. A partir de la evidencia arqueológica encontrada en Tehuacán (México), se cree que este fruto apareció hace aproximadamente 12.000 años (Yahia, 2011). Al cultivar palta Hass se produce un fruto piriforme, de cáscara gruesa, un poco rugosa y de color verde que se torna negro conforme a su maduración. La palta Hass es una baya con mesocarpio y endocarpio carnosos que contiene una sola semilla (Bresanni, 2009) (Figura 2.2).

Figura 2.1. Árbol del palto.



Figura 2.2. Fruto del palto.



De acuerdo con la American Dietetic Association (ADA) la palta se clasifica como un alimento funcional, debido a sus altos beneficios de valor y de salud nutricional. Actualmente, los estudios han demostrado que la palta promueve la salud cardiovascular y la prevención del cáncer, además de controlar los niveles de glucosa en sangre (Jacobo y Hernández, 2012; Berasategi et al., 2012).

La presencia de micro y macro nutrientes, como minerales, fibra dietética, proteínas, lípidos, vitaminas y fitoquímicos en la pulpa del fruto es la principal razón para el aumento constante en la agricultura de las paltas (Dreher y Davenport, 2013). Por otra parte, si tomamos en cuenta que la semilla de palta Hass representa entre un 15 a 18% del total del fruto, es predecible que se produzca una enorme cantidad de desechos orgánicos provenientes de la industrialización (Ramos et al., 2007), los cuales representan un alto costo para las empresas dado los altos volúmenes que se generan. Por estos motivos están comenzando a ser material de estudios para evaluar su posible utilización, dado que existen antecedentes de que contienen algunos compuestos que podrían ser aprovechables (Undurraga et al, 2008). La semilla de palta es un subproducto que concentra compuestos biológicamente activos como los polifenoles; por lo cual, esta materia prima residual puede jugar un papel importante pudiendo llegar a ser un producto valorizado al ser procesado industrialmente (Bresanni, 2009). A su vez, la semilla o carozo es posible encontrar enzimas y sustancias de características antibióticas y antimicrobianas, estas últimas tendrían posibles utilidades en conservas de carne, en procesos de curado y en la preservación de cremas de confitería. También es factible la utilización de la semilla para extraer taninos y pigmentos. Además, la semilla de la palta parece tener algunos compuestos que evitan el pardeamiento del fruto (Canto, 1980). Kahn (1987) establece que la semilla de palta es potencial fuente de almidón, debido a su contenido cercano al 30%, señalando además que la evaluación microscópica de este elemento reveló que posee características similares a las de maíz, los rangos de gelatinización y viscosidad son del tipo C (de dilatación restringida), lo cual sugiere su posible uso en alimentos que deben ser calentados a 100 °C, como sopas y salsas.

Por otra parte habitualmente, las cáscaras de muchos frutos concentran compuestos biológicamente activos como los polifenoles, los cuales poseen reconocidas propiedades antioxidantes, y por ello pueden ser empleados en el desarrollo de ingredientes funcionales. En efecto, esto ha llevado a la funcionalización de alimentos orientados a problemas de salud como lo son la obesidad, diabetes, e hipertensión (Gursevak, 2005; Yu y Slavin, 2008). Según Ceballos y Montoya (2013), aunque las pulpas de palta presentan los niveles más altos de proteína, es importante resaltar que las semillas y las cáscaras también muestran valores muy altos, lo que representa una condición importante para su uso potencial como fuente de proteína para alimentación animal o suplementación agrícola, además, la cáscara del aguacate podría ser evaluada como fuente de carbohidratos insolubles, si se tiene en cuenta la importancia de la celulosa como fuente de obtención de glucosa, la cual tiene múltiples aplicaciones industriales.

Manal et al. (2013), evaluaron el efecto de los componentes bioactivos de kiwi y semilla de palta en la hipercolesterolemia en ratas, la extracción de los compuestos antioxidantes se realizó mediante extracción con solvente 50/50 v/v (etanol/agua), un tiempo de agitación de 10 h, el contenido de fenoles totales encontrados en la semilla fue de 285,43 mg GAE/100g, además los resultados demostraron que la semillas de aguacate fue la más alta en contenido fenólico y tiene un mayor efecto sobre la hipercolesterolemia en comparación con el kiwi. Por otro lado Vinha et al. (2013), determinaron el contenido de fenoles totales de extractos acuosos de pulpa, cáscara y semilla de palta, cuyos valores fueron de 410,2, 679,0 y 704,0 mg GAE/100 g respectivamente.

Las diferencias en los valores pueden deberse a diferencias en las condiciones geográficas del sitio del cultivo, composición química del suelo de cultivo, metodología de extracción y estados de madurez (Wang et al., 2010).

2.1.1 Caracterización química de la semilla y cáscara de la palta Hass

Según el análisis proximal realizado, la semilla y cáscara de palta Hass posee los siguientes valores expresados en %g.

Tabla 2.1. Caracterización química de la semilla y cáscara de palta Hass.

Materia prima	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas	Fuente
Semilla	1,99 ± 0,06	2,03 ± 0,30	25,03 ± 0,70	1,51 ± 0,01	Curaqueo (2013)
Cáscara	1,60 ± 0,07	1,10 ± 0,02	19,20 ± 0,22	1,80 ± 0,03	Velásquez (2014)

2.1.2. Principales compuestos fenólicos encontrados en la semilla y cáscara de palta Hass

Velásquez (2014), realizó el análisis por HPLC Masa Masa a extracto etanólico de cáscara y semilla de palta Hass, de la cual se identificaron diversos componentes químicos. La Tabla 2.2 nos muestra los fenoles principales encontrados en la cáscara (Anexo D, Tabla D-1) y la Tabla 2.3 nos muestra los fenoles principales encontrados en la semilla (Anexo D, Tabla D-2).

Tabla 2.2. Fenoles identificados en la cáscara de palta Hass

Fenol identificado cáscara palta Hass	Familia
--	---------

Proantocinidinas	Flavonoles-3
Epicatequinas	Catequinas
Delfinidinas	Antocianidina
Ácido cafeoilquínico	Ácido cafeoilquínico
Quercetina	Flavonol
Ramnetina	Flavonol O-metilado
Ácido quínico	Quinona
Dimetoxiflavanona	Flavonoides

Tabla 2.3. Fenoles identificados en la semilla de palta Hass

Fenol identificado cáscara palta Hass	Familia
Proantocinidinas	Flavonoles-3
Quercetina	Flavonol
Peonidina	antocianinas
ácido cafeico	hidroxicinámicos
Epicatequinas	Catequinas
Ácido quínico	Quinona

Rodríguez Carpena et al. (2011), caracterizaron la cáscara de palta Hass encontrando componentes similares al de este estudio clasificando los polifenoles en 5 grupos: catequinas, ácidos hidroxibenzoicos (OH-B), ácido hydroxycinnamic (OH-C), flavonoles y procianidinas. También se reveló con el análisis detallado de las subclases, diferencias adicionales entre los materiales de aguacate. Por ejemplo, las epicatequinas fueron los compuestos más abundantes (~98%) dentro del subgrupo de catequinas en las cáscaras, mientras que la proporción entre catequinas y epicatequinas fue igual (~50%) en el material de la semilla. Por otro lado, recientemente Wang et al. 2010, informaron la presencia de procianidinas y ciertas clorofilas en cáscara, pulpa y semilla de varios cultivares de aguacate.

2.2 Producción mundial y nacional

De acuerdo a estimaciones de la FAO, la producción mundial de paltas se ha cuadruplicado durante las últimas cuatro décadas, llegando a 3,6 millones de toneladas en el año 2007 (ODEPA, 2009). Del total producido en ese año, el 70% se originó en el continente americano. Siendo México el

que destaca como mayor productor con 1.2 mt. Cantidad que representa el 35% de la producción de este grupo mundial de palta. En el 2010 la producción total de aguacate en la República Mexicana reportó un poco más de 1 millón 77 mil toneladas lo que irá en aumento a medida que pasan los años (SFA, 2011). Chile es el segundo país productor, su producción alcanza 328 mil toneladas, alcanzando en el 2008 el 9 % de la producción mundial (SFA, 2011). En nuestro país, la superficie cultivada con paltos se distribuye mayoritariamente en las regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana, que concentran más de 90% de la superficie nacional plantada (ODEPA, 2009).

2.3 Actividad antioxidante

En los últimos años, hay un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes, ya que pueden inhibir la propagación de reacciones de radicales libres y retardar la rancidez oxidativa de lípidos en los alimentos (Liu et al., 2007).

La oxidación puede dañar las membranas, lípidos, lipoproteínas, e inducir la mutación del ADN (Albano et al., 2012). Los antioxidantes previenen la oxidación de las moléculas y juegan un papel importante en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, formación de cataratas, el proceso de envejecimiento, enfermedades inflamatorias y una amplia gama de trastornos neurológicos (Hussain et al., 2013).

Los antioxidantes son moléculas orgánicas de origen natural o sintético que pueden evitar o retardar el desarrollo de los procesos de oxidación que encontrándose en bajas concentraciones, respecto a la de los sustratos biológicos oxidables (como lípidos, proteínas, ADN e hidratos de carbono), es capaz de prevenir o retardar la oxidación radicalaria de dichos sustratos (Valenzuela et al., 1996; Jiménez et al., 2000). Se estima que la vida útil de muchos productos alimentarios aumenta entre un 15 y 200% al emplear antioxidantes (Halliwell, 1996).

Un antioxidante es definido como una sustancia que, relativamente en bajas concentraciones, inhibe efectivamente el grado de reacción con el oxígeno. Por otro lado, un antioxidante reacciona con cualquiera de los radicales libres iniciales o con uno formado en las etapas tempranas dando un intermediario que no es capaz de continuar con la reacción en cadena. (Zheng y Wang, 2001)

Los radicales libres se pueden definir como sustancias químicas reactivas que tienen un único electrón desemparejado en una órbita externa. La mayoría de los radicales libres que pueden dañar los sistemas biológicos son los radicales libres de oxígeno, conocidos normalmente como “especies

reactivas de oxígeno” (ROS). Las ROS pueden producirse durante la irradiación de la luz UV, por rayos-X y por rayos- γ , y también pueden ser producidas durante las reacciones de catálisis de un metal. Los radicales libres tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. El término “radical libre” enfatiza una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia (enlace por compartición de electrones) (González y Gómez, 2012).

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, considerada la actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades de origen cardiaco e inmunológico. Dentro de esta gran familia pueden encontrarse tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo estos últimos el grupo más común (Echavarría et al., 2009).

2.3.1. Antioxidantes sintéticos

Son definidos como conservadores alimenticios que retardan específicamente el deterioro, rancidez o decoloración, debido a la oxidación lipídica. Los más conocidos son los que se derivan de las estructuras fenólicas o los que tienen un grupo fenólico dentro de su estructura molecular, tales como BHA, BHT y TBHQ (Mesa et al., 2010; Albano et al., 2012)

Publicaciones recientes señalan que los antioxidantes sintéticos pueden estar implicados en problemas de salud, incluyendo carcinogénesis en animales de experimentación (Iqbal et al., 2007).

Muchos compuestos como la quercetina, α -tocoferol y el β -caroteno, entre otros, son antioxidantes naturales que presentan una actividad comparable con antioxidantes sintéticos de mayor uso, como el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) y el 2-terbutil-hidroxianisol (BHA); sin embargo, los antioxidantes sintéticos pese a sus propiedades antioxidantes presentan la desventaja de ser tóxicos (Mesa et al., 2010; Albano et al., 2012). Los antioxidantes sintéticos también son usados frecuentemente como un sistema de medición de la actividad antioxidante estándar para comparar con antioxidantes naturales y para ser incorporados en los alimentos, además pueden soportar varios tratamientos y condiciones, así como para prolongar la vida útil de un producto. Hoy en día, casi todos los alimentos procesados tienen antioxidantes sintéticos incorporados, que son reportados a ser seguros, aunque algunos estudios indican lo contrario (Carocho y Ferreira, 2013).

Normalmente, los antioxidantes sintéticos son compuestos polifenólicos que son más o menos liposolubles, y sospechosos de ser responsables de daños en el hígado y carcinogénesis, presentes

en los alimentos en concentraciones por lo general de hasta 100-200 µg/g, ya sea individualmente o en combinación (Li et al., 2014).

Estudios con TBHQ, registraron a dosis altas efectos negativos en animales de experimentación, tales como tumores gástricos y daño al DNA. Este antioxidante sintético se encuentra prohibido para su uso en alimentos en Japón, Canadá y Europa. De la misma forma, BHA y BHT han sido removidos de la lista de compuestos seguros para estas naciones (Suja et al., 2004; Iqbal et al., 2007).

2.3.2. Antioxidantes naturales

Los antioxidantes naturales más importantes tecnológicamente empleados en aceites son los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles), los extractos de especias, los ácidos ascórbico y cítrico, y sus sales (Tsimidou et al., 1995).

El más abundante y el más activo biológicamente es α -tocoferol. Esta inhibe la formación de radicales libres al reaccionar con el radical peroxil deteniendo la cadena de propagación y con el radical alcoxil inhibiendo la descomposición de los hidroperóxidos y disminuyendo la formación de aldehídos (Frankel, 1996).

El uso de especias y hierbas como antioxidantes en alimentos procesados constituyen una alternativa prometedora al uso de antioxidantes sintéticos (Madsen et al., 1998).

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, considerada la actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades de origen cardiaco e inmunológico. Dentro de esta gran familia pueden encontrarse tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo estos últimos el grupo más común (Echavarría et al., 2009).

2.3.3. Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula que presentan compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, y por lo general desempeñan diversas funciones de protección frente al ataque de agentes patógeno, así como para la defensa contra la

radiación ultravioleta. En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir a la amargura, la astringencia, color, sabor, olor y estabilidad oxidativa. Se han identificado más de 8.000 compuestos polifenólicos en diferentes variedades de plantas. Todos los compuestos fenólicos vegetales surgen a partir de un intermediario bioquímico común, la fenilalanina, u otro precursor como el ácido siquímico. Poseen estructura de anillos aromáticos y enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen, y sobre la base de sus elementos estructurales. Las principales clases de polifenoles son los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Bhooshan y Rizvi, 2009).

Ácido Fenólicos: Se dividen en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Éstos representan alrededor de un tercio de los compuestos polifenólicos en nuestra dieta, y se encuentran en material vegetal, particularmente en las frutas ácidas, entre los más comunes, el ácido cafeico, gálico y ferúlico.

Flavonoides: Son los polifenoles más abundantes en la dieta, se han identificado más de 4000 variedades de estos, la mayoría responsables de los colores atractivos de las flores, frutas y hojas. Su estructura base puede sufrir muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que son una gran familia de diversos compuestos pero siempre manteniendo las características polifenólicas y solubles en agua. Existen seis clases principales: las chalconas, flavonas, flavanoles, flavandioles, antocianinas y taninos condensados. Otros derivados son los isoflavonoides y neoflavonoides. Las diferencias individuales dentro de cada grupo surgen del número y disposición de los grupos hidroxilos, así como del grado de alquilación. Algunos de los más comunes son: la quercetina, miricetina y catequina. La catequina debido a su estructura posee en su molécula dos centros de quiralidad, por tanto tiene cuatro diastereoisómeros, dos son isómeros de configuración trans y se denominan catequina, y los otros dos son de configuración cis conocidos como epicatequina (Figura 2.3).

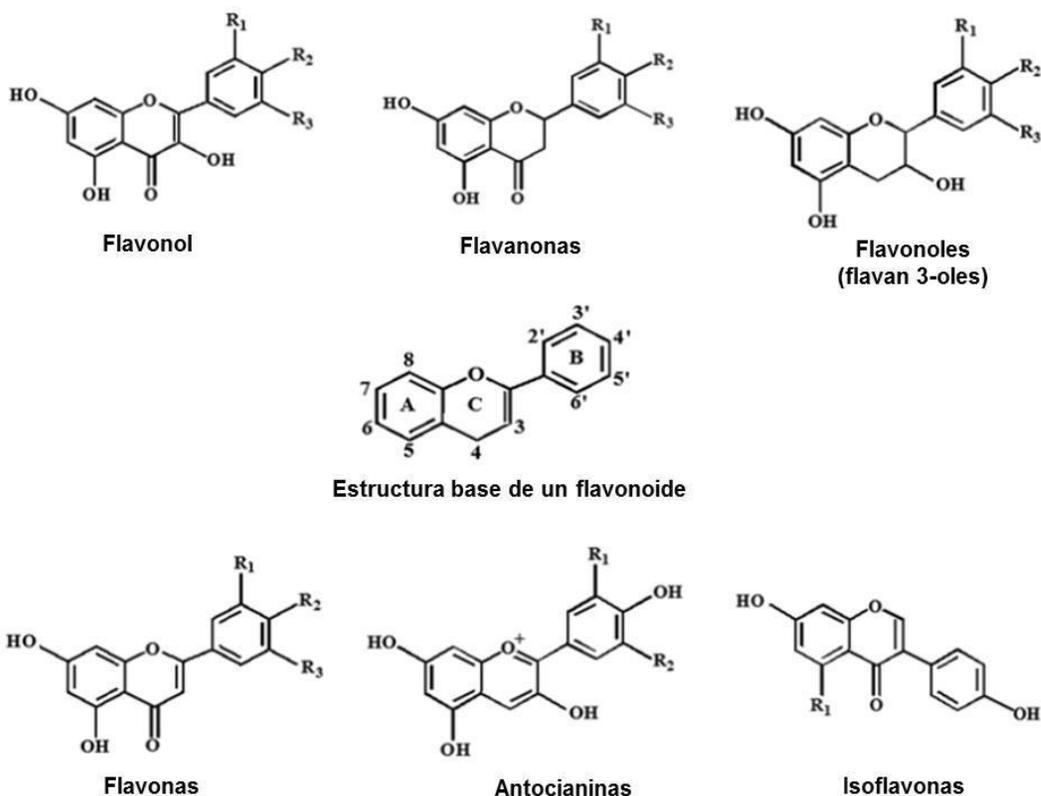


Figura 2.3. Estructura química de la sub-clase de los flavonoides (Bhooshan y Rizvi, 2009).

Estilbenos: son hidrocarburos aromáticos que contienen dos restos fenilos conectados por un puente de carbono metileno, la mayoría de estos actúan en las plantas como fitoalexinas, es decir, como compuestos antimicrobianos que se acumulan y sintetizan sólo en respuesta a una infección o lesión (Ej: el resveratrol).

Lignan: son compuestos difenólicos que se forma por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico. Son uno de los dos grupos principales de fitoestrógenos, que son antioxidantes. La otra clase de fitoestrógenos son las isoflavonas.

2.3.3.1. Mecanismo de acción de los fenoles

Los fenoles pueden actuar por varios mecanismos, entre los principales están:

- Como inhibidores, activadores o protectores de enzimas específicas.
- Como antioxidantes, propiamente tal, actuando como atrapadores de radicales libres.

- En forma indirecta, como agentes quelantes de iones de metales de transición, es decir, uniéndose a estos iones y reduciendo la capacidad de estos metales pesados de generar radicales libres.

Cada polifenol actuará por uno o más de estos mecanismos según sus propiedades particulares. (Hernández y Prieto, 1999).

2.3. Importancia de los residuos derivados de la industria de los alimentos

Una dieta rica en verduras y frutas frescas se recomienda generalmente para un estilo de vida saludable, ya que constituyen una importante fuente de nutrientes como antioxidantes, fitoesteroles, y la fibra. La transformación de una materia prima en alimento crea un "residuo" que comprende además la masa comestible que se pierde, desecha, o degrada en las diferentes etapas de la cadena de suministro de alimentos. Otros restos son cáscaras, tallos, núcleos, pieles, semillas, cáscaras, el salvado o la paja de cereales, piel de pescado, cabeza y huesos, etc. Los subproductos y desperdicios de la industria de alimentos han sido considerados como materiales indeseables que han sido eliminados de maneras costosas, a través de la alimentación animal, vertedero o incineración, sin embargo hoy en día, son considerados como fuentes prometedoras de nutraceuticos valiosos (Wijngaard y Brunton, 2010; Ayala-Zavala et al., 2011; O'Shea et al., 2012; Galanakis, 2012).

Este tipo de residuo posee un gran impacto ambiental debido a la carga orgánica que tiene. Además, posee un costo asociado a este tipo de desecho: manipulación, transporte y almacenamiento, entre otros. Por ejemplo, en la industria de la naranja se producen grandes cantidades de piel y semillas con un alto contenido de polifenoles. En las industrias de la manzana, pera y melocotón, se obtienen grandes cantidades de piel que incluso pueden tener mayor cantidad de compuestos fenólicos que los obtenidos en la pulpa (Balasundram et al., 2006). También, en los residuos de la producción de vino y cerveza se pueden encontrar compuestos fenólicos. Se han realizado diversos trabajos con la cáscara de nueces, con arroz y trigo. En ellos se hallan gran cantidad de polifenoles, entre los que cabe destacar el ácido cinámico (Guerrero et al., 2008).

En la industria de la palta hoy en día lo único que se aprovecha es la pulpa, dejando a un lado la cáscara y la semilla. Estas partes de la fruta son ricas en polifenoles y además posee capacidad antioxidante y antimicrobiana (Rodríguez-Carpena et al., 2011). Entre los polifenoles que posee están la (+)-catequina y (-)-epicatequina (Soong y Barlow, 2004). Los compuestos fenólicos son importantes componentes de la calidad de las frutas debido a su contribución al sabor y el color de la fruta (Veberic et al., 2008). En los últimos años, los compuestos fenólicos de origen natural han

sido objeto de interés en muchas investigaciones científicas debido a sus efectos positivos en la salud humana, atribuidas principalmente a sus actividades antioxidantes. En el artículo de revisión de Tsao y Deng (2004), se informó que los compuestos fenólicos y carotenoides son los grupos más importantes de antioxidantes naturales.

Existen estudios realizados donde los extractos obtenidos de residuos de aguacate son efectivos para evitar la oxidación y el crecimiento microbiano, por ejemplo Matsusaka et al. (2003), hallaron una actividad antioxidante importante en el extracto metanólico (MeOH) de las semillas de *Persea americana*. Rodríguez-Carpena et al., (2011), han reportado actividad antioxidante en extracto al 100% de acetato de etilo (EtOAc), extracto en 70% de acetona y en 70% de metanol (MeOH) de la piel, pulpa y semilla de *Persea americana*.

2.4. Fluidos supercríticos

El método de extracción mediante fluido supercrítico (EFS) es muy ventajosa y respetuoso del medio ambiente sobre otros métodos de extracción convencionales (Sahena et al., 2009). Los fluidos súper críticos son sustancias cuya presión y temperatura están por encima de los valores críticos (del Valle y Aguilera, 1999; Knez et al., 2014), cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su punto crítico, se encuentra en estado supercrítico, el cual se conoce como fluido supercrítico (Herrero et al., 2006). En la Figura 2.4 se puede apreciar el diagrama presión v/s temperatura, los tres estados de la materia están separados por líneas que representan los equilibrios sólido-líquido o de fusión, sólido-gas o de sublimación y líquido-gas o de vaporización. Además, aparecen dos puntos característicos: el punto triple, donde coexisten los tres estados, y el punto crítico, al final de la curva de vaporización, caracterizado por una presión crítica (P_c), y una temperatura crítica (T_c) (Cifuentes et al., 2004).

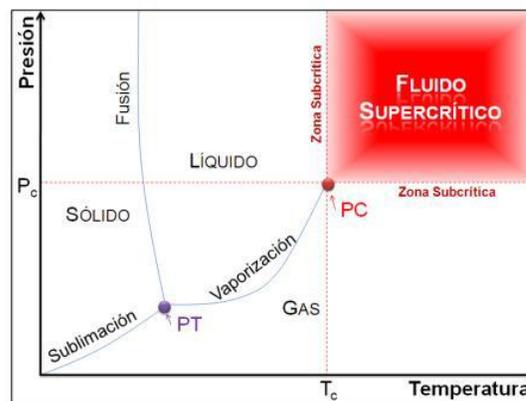


Figura 2.4. Diagrama de fases general para un fluido supercrítico (Vásquez, 2008).

En estas condiciones supercríticas varias propiedades del fluido se encuentran entre el gas y el líquido. La densidad de un fluido supercrítico es similar a la del líquido y su viscosidad es similar a la del gas (Sahena et al., 2009).

Al presentar el fluido supercrítico propiedades intermedias entre el gas y el líquido, este tiene gran capacidad de disolver compuestos que normalmente no disolvería o disolvería muy poco en el estado líquido o gaseoso (Esquivel y Vargas, 2007). La capacidad solvente de un fluido supercrítico se refiere al poder que tiene ese solvente para disolver un soluto determinado bajo condiciones específicas (Brunner, 2004). Esta capacidad solvente en un fluido supercrítico varía con su densidad, la cual puede ser tan alta como el líquido o baja como el gas, dependiendo de pequeñas variaciones en la presión o en la temperatura (Raventós et al., 2002), la densidad se incrementa a medida que la presión aumenta o la temperatura disminuye (del Valle y Aguilera, 1999), a la vez su viscosidad es mucho menor, lo que hace que los coeficientes de difusión de los solutos en los fluidos supercríticos sean mucho mayores que en un disolvente líquido. Así pues, cabe esperar que las extracciones con fluido supercrítico sean, en primer lugar tan completas como las llevadas a cabo con disolventes líquidos, debido a que ambos presentan similares características, y en segundo lugar, mucho más rápidas y eficientes, ya que su baja viscosidad favorece los fenómenos de transferencia de masa (transporte de los analitos) y la penetrabilidad de los poros de la matriz de la muestra (Valverde, 1995). Además los fluidos supercríticos se convierten en disolventes ideales puesto que su elevada difusividad les permite penetrar a través de materias porosas y su capacidad de solvatación modulable les permite una gran versatilidad y selectividad según las condiciones de presión y temperatura a las que se sometan (Fornari et al., 2012).

La extracción supercrítica tiene ventajas significativas sobre las técnicas de extracción de disolvente más convencionales. Además la no necesidad de la eliminación del disolvente a partir del producto final, la ausencia de luz y aire durante la extracción puede reducir el proceso de degradación que puede ocurrir cuando otras técnicas de extracción se emplean resulta en una mayor actividad antioxidante de los extractos (Ashraf-Khorassani y Tylor, 2004). En este contexto, es evidente, entonces, que EFS puede utilizarse para recuperar las biomoléculas a partir de residuos vegetales, tales como orujo de tomate, salvado de arroz, residuos de café, residuos de uva etc (Ghafoor et al., 2010).

Sin embargo, este tipo de extracción posee un inconveniente y es que frecuentemente es difícil la extracción de componentes polares, por lo que para minimizar este efecto es necesario usar modificadores orgánicos como el etanol en pequeñas cantidades (Brunner, 2004).

2.4.1. Extracción mediante CO₂ supercrítico

Uno de los fluidos supercríticos más utilizados en la extracción de compuestos es el dióxido de carbono, debido a que presenta ventajas comparativas, como su bajo costo, fácil obtención y propiedades críticas bajas (Presión: 73,89 bar; Densidad: 467,60 kg/m³; Temperatura: 32 °C) (Velasco et al., 2007), en comparación a otros solventes señalados en la Tabla 2.3.

El CO₂ puede actuar como solvente a temperaturas relativamente bajas y en condiciones adecuadas puede utilizarse para una extracción selectiva de múltiples componentes de productos naturales. Muchas razones lo hacen recomendable frente a los solventes convencionales. No es corrosivo en presencia de agua y no es inflamable, se puede obtener a partir de recursos renovables en grandes cantidades, con alta pureza y se pueden realizar extracciones a temperaturas moderadas protegiendo componentes sensibles al calor, es inerte y no reacciona degradando los componentes extraídos (del Valle y Aguilera, 1999). Es compatible con el cuidado del medio ambiente, no es tóxico en las cantidades utilizadas, se separa fácilmente del producto que se quiera extraer y se pueden utilizar en un rango amplio de temperaturas, variando de esta manera la selectividad (Esquivel y Vargas, 2007).

Las técnicas más convencionales de obtención de extractos de frutas, plantas, etc., son la hidrodestilación, maceración, extracción con disolvente, etc, pero tienen una serie de desventajas (Pereira et al., 2013), estos procedimientos realizados a alta temperatura pueden conducir a la degradación de compuestos termolábiles que resultan en la formación de compuestos indeseables y desagradables (Bocevskaja y Sovová, 2007). Además estas técnicas requieren altos tiempos de residencia, grandes cantidades de solvente y siempre dejan un residuo inherente en el extracto, particularmente cuando la extracción se realiza con hexano que es el disolvente comúnmente usado, sin embargo la legislación internacional restringe la cantidad de hexano que deben contener los productos extraídos y cada vez será más restrictiva, previéndose que en un futuro se limite su uso y se sustituya por otros disolventes como el CO₂ supercrítico (Velasco et al., 2007). Los antioxidantes como fenólicos, carotenoides, esteroides y alcaloides han sido revisados extensamente por su comportamiento de solubilidad en CO₂ supercrítico (Murga et al., 2002).

Tabla 2.3. Parámetros críticos de diferentes sustancias potencialmente útiles como fluidos supercríticos.

Fluido	T _c	P _c	ρ
--------	----------------	----------------	---

	°C	Bar	(Kg/m ³)
Acetileno	36,00	62,47	232,14
Acetona	235,00	47,00	278,00
Agua	374,00	220,90	322,60
<i>Dióxido de Carbono</i>	<i>31,00</i>	<i>73,86</i>	<i>467,60</i>
Etano	32,00	48,71	135,65
Etanol	240,40	61,40	276,00
Etileno	9,00	50,40	195,80
Metano	-83,00	45,95	161,43
Metanol	239,40	80,90	272,00
Propano	97,00	42,47	225,64
Propileno	91,80	46,00	232,00

Donde; Tc: Temperatura crítica, Pc: Presión crítica, ρ : densidad del fluido (Velasco et al., 2007).

2.4.2. Uso de etanol como co-solvente de extracción

La eficacia de la extracción de compuestos naturales aumenta con su solubilidad en el fluido supercrítico. Sin embargo, ya que el CO₂ es un disolvente no polar que no puede solubilizar compuestos polares, la eficacia de la extracción de compuestos polares naturales es baja. La solubilidad de compuestos naturales en CO₂ supercrítico podría mejorarse mediante la variación de temperatura de extracción y presión, y en particular mediante la adición de co-solventes polares (Danh et al., 2010), tales como etanol, metanol o agua en bajas concentraciones (Pimentel et al., 2012). Tanto el metanol y el etanol pueden ser usados como co-solventes debido a su capacidad para producir interacciones de enlaces de hidrógeno y dipolo-dipolo con compuestos de fenol. Teniendo en cuenta el uso potencial de extractos en la industria alimentaria, se prefiere el uso de etanol debido a sus efectos tóxicos inferiores (Cháfer et al., 2005).

Según la investigación realizada por De Melo et al. (2014) de un total de 166 publicaciones revisadas, un 53 % aplicaban tecnologías de extracción mediante CO₂ supercrítico y emplean etanol como co-solvente en sus investigaciones.

Un aspecto a destacar cuando se trabaja con extracción mediante CO₂ supercrítico adicionando un modificador, es la aplicación de dos formas distintas del co-solvente, donde el procedimiento más convencional consiste en la mezcla del CO₂ con el co-solvente en una proporción fija a lo largo del tiempo, lo que requiere de una bomba de alimentación independiente y una línea para cada fluido; mientras que otra alternativa es a través de la impregnación de la matriz con el co-solvente en el

inicio del experimento, seguido por una extracción pura con CO₂ supercrítico (De Melo et al., 2014).

La capacidad de extracción de los compuestos fenólicos depende el tipo del disolvente, la naturaleza y preparación de material de a extraer, la estructura química de los compuestos fenólicos, la temperatura, el tiempo de extracción, la relación de sólido-líquido, la extracción método empleado y la posible presencia de sustancias interferentes (Bucić-Kojić et al., 2011).

Manna et al. (2015), realizan extracción supercrítica de polifenoles de la cáscara y semilla de la uva, cambiando la polaridad del disolvente durante el proceso de extracción a través de la adición de co-solvente, en este caso el etanol, ya que es el más utilizado para aplicaciones en alimentos. Los polifenoles se extrajeron de la uva después de la adición de 5 a 25% p/p de co-solvente (etanol) al CO₂ supercrítico. Los rangos de temperatura y presión investigados fueron igual a 40 a 60 °C y 35 a 50 MPa. Por otro lado Babova et al. (2016), realizaron extracción de antocianinas y otros compuestos fenólicos del arándano, las extracciones se realizaron manteniendo una presión de 25 MPa y una temperatura de 45 °C, se variaron las concentraciones del co-solvente, en este caso etanol con agua, de 6 a 9 %p/p. Por otra parte Cavalcanti et al. (2011), aplican extracción supercrítica para la obtención de polifenoles de la Jabutucaba (fruto en forma de uva), el proceso de extracción mantiene constante la concentración de co-solvente en un 15%p/p, el rango de temperatura varía entre 50 y 60 °C y la presión entre 10 y 30 MPa.

2.5 Extracción de polifenoles con solvente orgánico

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuoso-orgánicos. La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del método de extracción (polaridad de los solventes), del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia. A veces se requieren pasos adicionales o previos a la extracción para eliminar sustancias no deseadas que pueden interferir en los análisis (grasa, carbohidratos, clorofilas) normalmente mediante extracción en fase sólida (Robins, 2003). En general cualquier proceso está basado en una primera extracción con disolventes orgánicos o la mezcla de algunos de ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, dimetilformamida, acetato de etilo) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos (Antolovich et al., 2000). Además de los disolventes, también el tiempo

de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento. Se han reportado tiempos de extracción desde 1 minuto a 24 horas (Price et al., 2008; Cork y Krockengerg, 1991), teniendo en cuenta que largos periodos de extracción pueden producir oxidaciones, que se minimizan añadiendo agentes reductores (Khanna et al., 1968).

La extracción por solventes es una operación de transferencia de masas en un sistema de 2 fases líquidas, que consiste en usar un solvente (un líquido capaz de disolver otra sustancia) para separar o retirar una sustancia de interés o un contaminante de manera selectiva (Robins, 2003).

La separación de un compuesto por extracción con solvente se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida. El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial (Robins, 2003).

2.6. Metodología de superficie de respuesta

La eficiencia de la extracción mediante fluido supercrítico depende de varios parámetros, tales como la presión, temperatura, caudal de disolvente, tamaño de partícula del sustrato y el uso de un co-solvente. Para optimizar las condiciones operacionales, la metodología de superficie de respuesta (MSR) ha sido ampliamente utilizada. En comparación con los métodos clásicos la MSR es más eficiente, requiere menos datos y proporciona efectos de la interacción de la respuesta, así como los efectos de los factores (Pereira et al., 2013). Se define interacción como la influencia que pueda tener el cambio de nivel de una variable en el efecto de otra variable sobre la respuesta de salida (Montgomery, 1991).

La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables y el objetivo es optimizar la respuesta. El primer paso de la MSR consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes (Ebadnejad et al., 2013). El objetivo eventual de la MSR consiste en determinar las condiciones de operación óptimas para un sistema o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación (Montgomery, 1991).

La metodología de superficie de respuesta implica tres pasos (Xu et al., 2008):

1. El diseño experimental, donde las variables independientes y sus respectivos niveles son establecidos en un diseño tal como el central compuesto.
2. El modelamiento de la superficie de respuesta a través del análisis de regresión.
3. La optimización mediante el uso de los modelos de superficie de respuesta.

El diseño Box-Behnken se utiliza como una herramienta para la metodología de superficie de respuesta debido a que permite (Yildiz-Ozturk et al., 2014):

1. La estimación de los parámetros del modelo cuadrático.
2. El desarrollo de diseños secuenciales.
3. La detección de falta de ajuste del modelo.

El diseño Box-Behnken es un diseño de segundo orden constituido de 3 niveles para ajustar una superficie de respuesta. Estos diseños se forman combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes suelen ser más eficientes en términos del número de corridas requeridas y son rotables. El diseño Box-Behnken no contiene puntos en los vértices de la región cúbica creada por los límites superior e inferior para cada variable. Esto podría ser ventajoso cuando los puntos en las esquinas del cubo representan combinaciones factor-nivel que son prohibitivamente costosos o imposibles de probar debido a restricciones físicas del proceso (Montgomery, 1991).

2.7. Secado por lecho fluidizado (SLF)

El calentamiento controlado de los productos alimenticios para evaporar la cantidad cuantificada de humedad que está presente originalmente se conoce como secado o deshidratación. El secado de productos alimenticios seleccionados es esencial para reducir el peso, para facilitar el transporte y para mejorar la vida útil del producto sin pérdidas de calidad durante un período prolongado de tiempo. El secado implica la aplicación simultánea de calor y la eliminación de la humedad de los alimentos (Sharada, 2013). En el proceso de secado, el aire caliente generado proporciona el calor necesario para evaporar la humedad y la lleva lejos de los materiales. La diferencia entre el núcleo y la humedad superficial crea un gradiente de presión que se convierte en la fuerza motriz para eliminar el agua de los alimentos (Richard y Earle, 2004).

Una alternativa interesante es el secado en lecho fluidizado los cuales son ampliamente utilizados para secar partículas en húmedo, materiales granulares que se pueden fluidizar y suspensiones. Los SLF se usan comúnmente en el procesamiento de diversos productos, tales como: productos

químicos, carbohidratos, comida, biomateriales, bebidas, cerámica, productos farmacéuticos en polvo o en forma aglomerada, productos para el cuidado de la salud, pesticidas y productos agroquímicos, colorantes y pigmentos, detergentes y agentes tensioactivos, fertilizantes, polímeros y resinas, taninos, productos para calcinación, combustión, incineración, procesos de gestión de residuos, y procesos de protección ambiental. Un proceso de lecho fluidizado proporciona varias ventajas importantes, tales como una buena mezcla de sólidos, altas tasas de transferencia de calor y masa, y fácil transporte de material (Law y Mujumdar, 2015). Además permite un tratamiento térmico rápido y homogéneo con aire caliente, debido al mezclado de los sólidos fluidizados, eliminando el sobrecalentamiento de los mismos (Tosi et al., 1982; Abu-Hamdeh y Othman, 2004) y en consecuencia evitando que la calidad del sustrato se dañe. El SLF ofrece ventajas significativas como, la reducción uniforme de la humedad con menos tiempo de secado y alta tasa de secado (Kassem et al., 2011). Los SLF aumentan la eficiencia de estos procesos al permitir que toda la superficie del producto se comporte de tal forma que la mezcla de los materiales sólidos se realiza de manera eficiente con el aire de secado. Proporcionan una temperatura uniforme del lecho a lo largo del periodo de secado y prolongan el periodo de velocidad de secado constante. Sin embargo, el flujo estratificado y la formación de puntos calientes en los SLF pueden provocar un alto daño de la variación de humedad al producto con pérdida de calidad. Los materiales adhesivos muy húmedos y los productos higroscópicos pegajosos necesitan aditivos especiales para ser manejados en el SLF (Patil y Dattatreya, 2012).

2.8. Encapsulación y generación de hidrogeles

La encapsulación es una de las técnicas más usadas en el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceúticos. Esta tecnología ha tenido un crecimiento importante aumentando cada vez el número de patentes y la publicación de artículos científicos, derivados de la investigación básica y aplicada (Gouin, 2004; Boh et al., 2008).

Los polifenoles son muy sensibles al calor ya la luz y, cuando están en su forma libre, muestran baja solubilidad en agua y una alta tasa de metabolismo, eliminándose rápidamente del cuerpo humano. Todos estos factores contribuyen a la escasa estabilidad y a la baja biodisponibilidad, y por lo tanto reducen drásticamente su eficacia (Crozier et al., 2009; Oroian y Escriche, 2015); una manera de preservar las propiedades promotoras de la salud de los polifenoles a partir de extractos naturales es encapsular dentro de una matriz o una membrana en forma de partículas (Fang y Bhandari, 2010). Los procesos de encapsulación se realizan generalmente con el fin de preservar la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el procesamiento y almacenamiento, y también

para evitar interacciones no deseadas con matrices de alimentos, contribuyendo así a un aumento de la estabilidad y también la promoción de una liberación controlada del compuesto encapsulado (Desai y Park, 2005; Nedovic et al., 2011). Además, la encapsulación se puede utilizar para enmascarar malos sabores y para garantizar que los compuestos activos se mantienen en una forma bioactiva dentro del tracto gastrointestinal (Stojanovic et al., 2012 y McClements, 2015).

Recientemente, la encapsulación se ha realizado con éxito el fin de aumentar la estabilidad de los polifenoles y por lo tanto preservar su bioactividad. Los biopolímeros, tales como alginato de sodio han demostrado proporcionar una protección eficaz cuando se utiliza como material de recubrimiento, resultando en valores de eficiencia alta de encapsulación de compuestos fenólicos extraídos de fuentes naturales (Deladino et al., 2008, Belscak-Cvitanović et al., 2011, Stojanovic et al., 2012 y Deladino et al., 2013).

2.8.1. El alginato y la formación de hidrogeles

El alginato es un polielectrolito aniónico natural extraído de diversas especies de algas pardas (Phaeophyceae) y de bacterias (*Azobacter vinelandii*). Se compone de copolímeros binarios no ramificados de ácido (1 → 4) vinculada β-D-manurónico (M) y α-L-gulurónico (G) de residuos de composición muy variable y la secuencia (Draget y Taylor, 2011). En alginatos de alto contenido en M, las cadenas son lineales, y tienen la función de ayudar a dar conformación tridimensional aguantando las cadenas G. Por esta razón dan lugar a un tipo de gel dúctil, flexible, elástico y con poca sinéresis. Mientras que, en alginatos de alto contenido en G, las cadenas tienen estructura de zig-zag y permiten una unión más fácil del calcio dándose la forma conocida como “caja de huevos” que proporciona un gel consistente, rígido, quebradizo y con sinéresis (Cubero et al., 2002), lo cual se muestra en la Figura 2.5.

Este polímero cuenta con varias cualidades que lo convierten en un material de opción para la encapsulación, tales como bajo costo, simplicidad de uso, biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad para someterse a la asociación de la cadena y formar tres geles bidimensionales en presencia de cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}) (Desai y Park, 2005 ; Fang et al., 2008).

Por lo anterior, el desarrollo de sistemas de vehiculización, estabilización, protección y liberación controlada de extractos de cáscara y semilla de palta constituye un medio para la obtención de ingredientes naturales, que puedan ser empleados en la formulación de alimentos con actividad antioxidante incrementada.

La formación de hidrogeles es una de las técnicas de encapsulación más empleadas en la actualidad y continuamente se buscan alternativas que permitan su implementación a escala industrial (Champagne et al., 2007; Gouin, 2004). Esta técnica consiste en el goteo de la solución de hidrocoloide a través de un capilar o boquilla. Las gotas se reciben en una solución dispersante, en la que ocurre la reacción. Se utiliza principalmente alginato de sodio como gelificante y la combinación con iones divalentes como el calcio, para inducir la gelificación (Draguet, 2000; Goh et al., 2012).

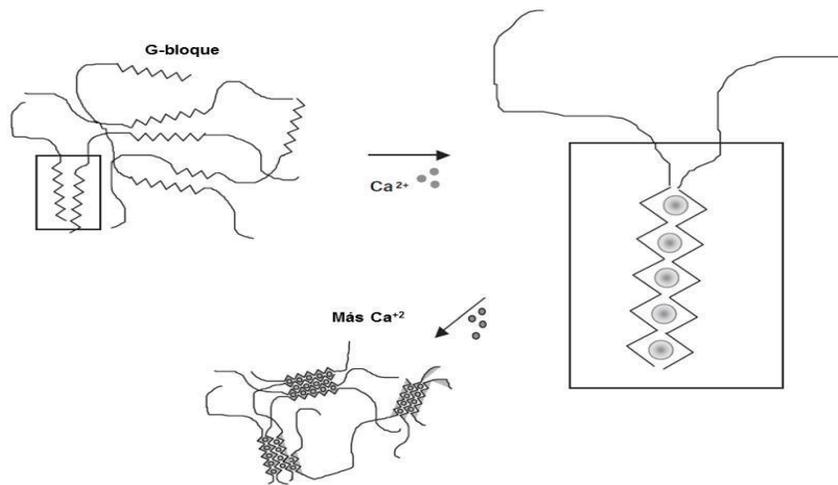


Figura 2.5. Gelificación del alginato con calcio. Modelo “caja de huevos” (Imeson, 2010).

2.8.2. Encapsulación por extrusión

La técnica más empleada ha sido la microencapsulación por extrusión, ésta técnica consiste en la formación de gotas de la solución de alginato que contiene el componente a encapsular, dicha solución se hace pasar por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado, estas gotas formadas caen sobre un baño que contiene la fuente del ion divalente, quien induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa (Chan et al., 2009). La principal limitación presentada por esta técnica es el gran tamaño de las cápsulas o esferas formadas, comparado con aquél obtenido por emulsificación, y que depende fundamentalmente del diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor, además existe, la dificultad de producción a gran escala debido a que la formación de las cápsulas se logra una a una o de pocas en pocas lo cual trae como consecuencia largos tiempos de gelificación (Mofidi et al., 2000).

Adicionalmente, hay que considerar aspectos que influyen en la forma esférica y tamaño de las esferas, como la distancia de separación de la boquilla al baño, el efecto de la gravedad y la tensión

superficial de la solución que induce la gelificación (Chan et al., 2009). A pesar de todos estos factores, la técnica de encapsulación por extrusión ha sido empleada tradicionalmente al permitir la producción de cápsulas o esferas con tamaños uniformes, empleando desde una simple jeringa hasta dispositivos extrusores más sofisticados.

Recientes estudios demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores (Champagne et al., 2000), inyectoros con impulsos vibratorios (Dohnal y Štěpánek, 2010) e incluso con flujo de aire incorporado (Mark et al., 2009), todos diseñados con el mismo objetivo, la producción masiva de cápsulas. Como ejemplo, en la Figura 2.6, se muestran diferentes tipos de dispositivos extrusores para la preparación de cápsulas.

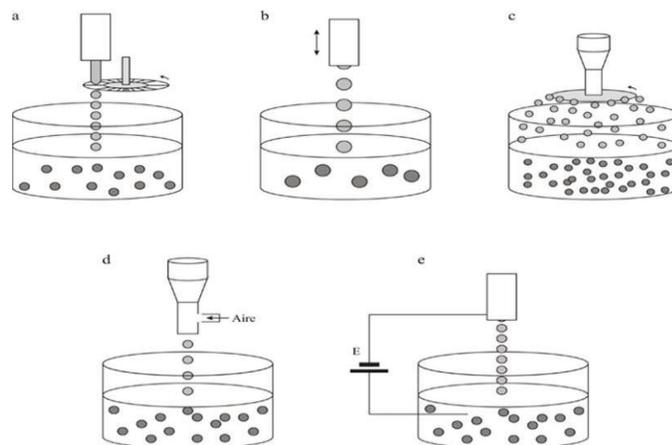


Figura 2.6. Tipo de dispositivos extrusores. (a) Atomizador con corte sistemático del chorro, (b) Boquilla vibratoria, (c) Disco atomizador, (d) Flujo de aire coaxial, y (e) Potencial electrostático. (Zuidam y Shimoni, 2010).

2.9. Análisis térmico

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se basa en la medición de un flujo de calor que debe suministrarse a una velocidad constante, independientemente, a una muestra y a una referencia estándar, para que ambas sigan el mismo programa de temperatura (Sierra et al, 2009). La transmisión de calor debe ser instantánea, por lo cual se trabaja con muestras muy pequeñas que son colocadas en crisoles cerrados herméticamente para impedir que se produzcan cambios de humedad durante el proceso. Es muy importante que el contenido de agua de las muestras permanezca constante durante la determinación de una transición, puesto que la cantidad de agua

tiene una gran influencia sobre la temperatura a la cual se produce dicho efecto térmico (Martínez, 1998). En la Figura 2.7 se observa un esquema del funcionamiento del calorímetro diferencial de barrido.

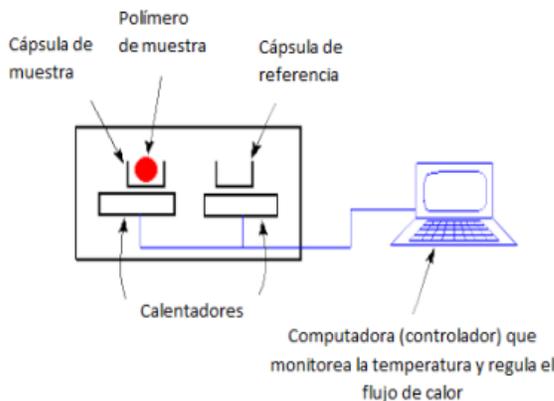


Figura 2.7. Esquema del funcionamiento del calorímetro diferencial de barrido. (Macrogalleria (2005)).

2.9.1. Utilización de la calorimetría diferencial de barrido en la Ciencia de los Alimentos

La calorimetría diferencial de barrido ha sido utilizada en los últimos años como una metodología de trabajo fundamental para el estudio de temas tales como: transiciones inducidas térmicamente en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, determinación de producción de calor por células vivas, microorganismos; y además, es frecuente su uso en análisis de combustibles, polímeros y en el ámbito farmacéutico en el análisis de sustancias. Debido a su capacidad de analizar sistemas complejos; poco a poco ha sido introducida en el campo de la ciencia de los alimentos como una herramienta útil y de precisión para realizar un estudio, debido a que en los alimentos dada su compleja composición y su carácter multifásico, pueden tener lugar transiciones de primer o segundo orden en el intervalo de temperaturas y presiones a las que son manipulados: fusión o transiciones entre formas polimórficas de grasas, gelatinización de almidón, desnaturalización de proteínas, cristalización de hielo o azúcares, transiciones vítreas de fases amorfas con biopolímeros o solutos moleculares y baja proporción de agua (Martínez, 1998). Es por eso que en el ámbito de la Ciencia de los alimentos destacan estudios en DSC realizados en almidón (Ghanni et al., 1999), sobre las propiedades térmicas asociadas a la temperatura de gelatinización. Nicoletti et al, (2006) presenta el estudio de las transiciones de fase durante el proceso de liofilización de pulpa y piel de ciruela. También encontramos trabajos realizados en gelatinas bovinas como el descrito por Shafiur et al, (2010), donde presenta resultados sobre puntos de congelación y transiciones vítreas. Anbinder et al, (2011), estudiaron el comportamiento térmico de los polifenoles de la hierba mate

encapsulados en sistemas de alginato y quitosano, identificando los picos endotérmicos y exotérmicos de los hidrogeles.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es probablemente la técnica más utilizada en la determinación de las propiedades térmicas de encapsulados, ésta ofrece información relevante acerca del estado físico del compuesto activo dentro de la matriz del polímero. La técnica de DSC mide la diferencia de temperatura entre la muestra y una referencia, causada por un cambio de fase. Las transiciones de primer orden producen picos y las de segundo orden ocasionan un salto en el flujo calórico (Alipour et al., 2010; Gabbott, 2008).

La Tabla 2.4. Describe las aplicaciones más comunes dentro del área de alimentos.

Tabla 2.4. Muestra de alimentos típicos y sus aplicación en el DSC.

Tipo de Muestra	Tipo de Información
Aceites, grasas y alimentos untables	Temperatura inicial de Fusión/ Cristalización/ Comportamiento Polimórfico. Estabilidad a la oxidación
Harinas y almidón de arroz	Retrogradación/ Gelatinización/ Transición Vítrea (Tg).
Polvos vegetales	Transición Vítrea (Tg)
Pastas y geles que contiene polisacáridos o gomas	Calor específico (Cp), temperatura inicial de fusión y cristalización
Proteínas	Desnaturalización/agregación
Azúcares	Temperatura de Cristalización/ Fusión/ Transición Vítrea.
Productos Congelados	Transición Vítrea/ Temperatura de Cristalización. Estabilidad de fase congelación

Fuente: PerkinElme, (2011).

2.10. Reología

La ciencia de la reología tiene muchas aplicaciones en los campos de la aceptabilidad, manipulación y procesamiento de alimentos, estos últimos, sin embargo, son materiales complejos en cuanto a su estructura y a su comportamiento reológico, y en muchos casos existen mezclas de sólidos, así como componentes estructurales fluidos. La reología se refiere a la deformación y al

flujo de sustancias y en particular, a su comportamiento en la zona transitoria entre sólidos y líquidos (viscoelasticidad). Por otra parte, esta ciencia intenta definir una relación entre la tensión que actúa sobre un material dado y la deformación resultante y/o el flujo que tiene lugar (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005). La reología se ocupa del cómo los materiales responden a fuerzas aplicadas y deformaciones. Conceptos básicos como el estrés (fuerza por unidad de superficie) y la velocidad de deformación son claves para todas las evaluaciones reológicas. El estrés o cizalla (σ) es una medida de la fuerza por unidad de área de superficie y se expresa en unidades de Pascal (Pa) (Ecuación 2.1), mientras que la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) corresponde a un gradiente aplicado sobre la muestra (Ecuación 2.2).

$$\sigma = F/A \quad \text{Ecuación (2.1)}$$

$$\dot{\gamma} = dv/dy \quad \text{Ecuación (2.2)}$$

Por otro lado, se definen a los fluidos como las sustancias que fluyen sin desintegrarse cuando se aplica presión, lo cual incluye a gases, líquidos y ciertos sólidos. En especial, para el caso de los líquidos se requieren diferentes esfuerzos de cizalla, para permitir que las moléculas de una capa pasen a otra, a cierta velocidad. La relación entre el esfuerzo de cizalla requerido para inducir una determinada velocidad de deformación, caracteriza el comportamiento reológico de un fluido. En los fluidos llamados newtonianos, el esfuerzo de cizalla es directamente proporcional a la velocidad de deformación (Ecuación 2.3) o en otras palabras, la velocidad de cizalla y la constante de proporcionalidad corresponden a la viscosidad (Ramírez, 2006).

$$\sigma = \mu * \dot{\gamma} \quad \text{Ecuación (2.3)}$$

Esta fórmula se denomina *Ley de Newton*, que es aplicable actualmente aún para algunos fluidos con comportamiento newtoniano (agua y glicerina, por ejemplo).

Sin embargo, muchos fluidos alimentarios, como la palta, se desvían de este comportamiento típico de fluidos como el agua; estos pertenecen al grupo de los fluidos no-newtonianos, en los cuales el término índice de consistencia (k) es equivalente a una viscosidad no-newtoniana. Pero para definir el flujo, se requiere de otros parámetros tales como el índice de comportamiento al flujo (n) y el esfuerzo de fluencia, el cual representa la tensión mínima de deformación (σ_0).

La relación entre esfuerzo de cizalla y la velocidad de deformación para fluidos no newtonianos no es lineal, además, estos entre sí, se diferencian en fluidos dependientes y no dependientes del tiempo. Dentro de los fluidos independientes del tiempo, se encuentran los fluidos pseudoplásticos,

los cuales se caracterizan por una disminución de su viscosidad y de su cizalla, con la velocidad de deformación. Su comportamiento se representa con la siguiente ecuación:

$$\sigma = k * \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación (2.4)}$$

(Ley de la Potencia)

Donde:

n: Índice de Fluidéz (adimensional), con $0 < n < 1$

Para un líquido newtoniano $n = 1$, para un fluido dilatante $n > 1$ y para un fluido pseudoplástico $n < 1$.

A partir de dicha relación matemática (Ecuación 2.4), se han derivado otras que intentan explicar el comportamiento reológico de otros fluidos, tales como:

$$\sigma = k * \dot{\gamma}_n + \sigma_n \quad \text{Ecuación (2.5)}$$

(Cuerpo Plástico de Bingham)

$$\sigma = k * \dot{\gamma}^n + \sigma_o \quad \text{Ecuación (2.6)}$$

(Herschel - Bulkley)
Con $\sigma_o > 0$ y $0 < n < \infty$

Existen varios modelos para evaluar el comportamiento de los fluidos no newtonianos independientes del tiempo, tales como: Casson (1959), Casson modificado (1972), Ellis (1927), Vocadlo (1968), Carreau (1968), Cross (1965) entre otros, los cuales presentan diferentes ecuaciones para relacionar las distintas variables que caracterizan al fluido en estudio (Steffe, 1996). En la Figura 2.8, se ilustran diversos reogramas obtenidos a partir del comportamiento reológico de variados materiales:

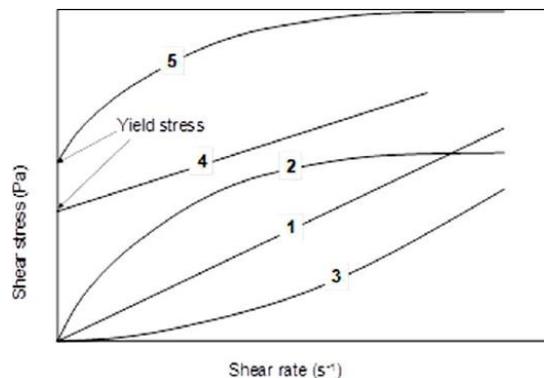


Figura 2.8. Reograma para diversos fluidos (Fuente: Zhong y Daubert, 2013)

En donde (1) representa un fluido newtoniano, (2) pseudoplástico, (3) dilatante, (4) plástico de Bingham y (5) fluido Herschel – Bulkley (Shear rate: velocidad de deformación; Shear Stress: esfuerzo de cizalla).

Además de este tipo de análisis reológico, denominados *estacionarios (rotatorios)*, se encuentran los análisis *dinámicos (oscilatorios)*. Estos son estudios apropiados para materiales como los alimentos, que presentan ciertas características viscoelásticas. Con ensayos reológicos dinámicos (oscilatorios) y pruebas en el rango lineal viscoelástico (RLV), se pueden obtener los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G''). G' , es un valor que representa la energía de deformación almacenada en la muestra durante el proceso de cizallamiento, además representa el comportamiento elástico de la muestra. Por el contrario, el valor G'' es una medida de la energía de deformación utilizada en la muestra durante el cizallamiento y la pérdida de energía de la muestra posteriormente, representando el comportamiento viscoso de la muestra (Mezger, 2002). Si G' es mucho mayor que G'' , el material se comporta más como un sólido; es decir, las deformaciones serán esencialmente elástica implicando que el material se pueda recuperar. Sin embargo, si G'' es mucho mayor que G' , la energía utilizada para deformar el material viscoso se disipa, por ende, el material tiene un comportamiento más líquido (Rao, 1999). Por otro lado, el factor de pérdida $\tan\delta$ revela la relación entre la porción viscosa y elástica de un material luego de una deformación dada. Un ángulo de fase $\delta = 0^\circ$ o $\tan\delta = 0$ corresponde a una respuesta elástica y $\delta = 90^\circ$ o $\tan\delta = 1$ es una respuesta viscosa. Si el ángulo de fase está dentro de los límites de $0 < \delta < 90$, el material se denomina viscoelástico (Steffe, 1996; Mezger, 2002). Por otro lado, la viscosidad compleja (Ecuación 2.7) es otro parámetro usado en los análisis oscilatorios.

$$|\eta^*| = \frac{G^*}{\omega} \quad \text{Ecuación (2.7)}$$

El modulo complejo (G^*) se relaciona con los módulos elástico y viscoso a través de la siguiente ecuación:

$$[G^*]^2 = [G']^2 + [G'']^2 \quad \text{Ecuación (2.8)}$$

Se pueden realizar varios tipos de pruebas dinámicas, y una de ellas (acorde al estudio a realizarse) son estudios de barrido de frecuencia de G' y G'' a temperatura fija o en relación a un rango de frecuencia establecida (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

Capítulo 3: Materiales y métodos

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de trabajo

La primera parte de esta investigación consistió en el análisis químico, análisis físico y extracción de compuestos fenólicos de la semilla y cáscara de Palta Hass, el cual se llevó a cabo en las dependencias de la Universidad de Chile, Facultad de Química y Farmacia, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química.

3.2. Materiales

3.2.1. Materia prima

La materia prima que se utilizó corresponde a palta Hass, cultivada en la Región de Valparaíso.

Específicamente la materia prima fue obtenida en la ciudad de Quillota, Latitud 2° 52' 0" S, Longitud 71° 14' 0" N (Instituto Geográfico Militar de Chile, IGM).



Figura 3.1. Mapa de la comuna de Quillota, V Región de Valparaíso.

3.2.2. Equipos e instrumentos

- Minipimer (Philipps)
- Moledor de café (BOSCH, MKM6000)
- Lecho fluidizado (AGSENS, Burkard FBD-200S)
- Tamiz vibratorio Ro-Tap, (Gilson Company, INC, Estados Unidos)
- Balanza analítica, sensibilidad $\pm 0,0001g$, (Ohaus MJ-510, Corporation Estados Unidos)

- Estufa de aire forzado marca WTC Binder, modelo 1924030000200, Alemania
- Extractor supercrítico Spe-ed EFS-2 modelo 7071 (Applied Separations, Allentown, PA)
- Rotavapor Büchi, modelo R – 205. Suiz
- Espectrofotómetro ATI Unicam UV/Vis Spectrometer UV3-200
- Molinillo café BOSCH MKM6000, potencia 180W y cuchillas de acero inoxidable
- Tamices de la serie de Tyler
- Balanza granataria, sensibilidad $\pm 0,1$ (Shimadzu, modelo ELB600S, Japón)
- Bomba HPLC (Knauer modelo K-501, Alemania)
- Sistema enfriador (licuificador de CO₂), Recirculating Cooler marca Julabo modelo F-200 (Julabo USA Inc., Allentown, PA)
- Encapsulador , *encapsulator B-395 pro*
- Reómetro Haake RheoStress 1 (Haake, Karlsruhe, Germany)
- Circulador de agua Thermo scientific (SC 100, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany).
- Calorímetro, *Perkin Elmer* modelo DSC 6000
- Microscopio óptico (Olympus, CX-31)
- Agitador orbital (Lab-Line Instruments, EE.UU)

3.2.3. Reactivo

- CO₂ líquido 99,99% pureza
- Etanol 99,8% pureza
- Folin-Ciocalteu Merck p.a
- Ácido gálico p.a, 99,9%, Merck
- Carbonato de sodio 99,9%, Merck

- DPPH (*1,1-difenil-2-picrilhidracil*), p.a, Aldrich
- CaCl₂ p.a, 99,9%, Merck
- Alginato de sodio al 2% p/v (Sigma– Aldrich, EE.UU)
- Nitrógeno de alta pureza (99,999%)
- Citrato de sodio, p.a, 99,9%, Merck

3.2.4. Materiales de vidrio y otros

- Micropipetas de 100 (volúmenes de 10-100 µL), 1000 (volúmenes de 100-1000 µL) y 5000 (volúmenes de 1000-5000µL).
- Cubetas de cuarzo
- Papel filtro
- Algodón de vidrio
- Papel aluminio
- Bolsas ziploc
- Gotario
- Capsulas metálicas
- Balones de 250 mL
- Parafilm
- Cápsulas de aluminio
- Vasos precipitados de 250 mL
- Viales de vidrio
- Matraz aforado

3.2.5. Pretratamiento de las muestras

3.2.5.1. Molienda

Una vez obtenidas las paltas estas fueron lavadas y se comenzó a retirar la cáscara y la semilla, evitando dejar cualquier residuo de pulpa, posteriormente se realizó la molienda, la cual fue ejecutada en una Minipimer (Philipps) a su velocidad de máxima por 3 minutos, posteriormente las materias primas fueron almacenaron a 5 °C para su posterior uso.

3.2.5.2. Secado por lecho fluidizado

Las cáscaras y semillas se molieron utilizando un molidor de café (BOSCH, MKM6000), para posteriormente someterlas al secado por lecho fluidizado (AGSENS, Burkard FBD-200S), para esto se pesaron 100 g de muestra y se depositaron sobre la rejilla de soporte poroso ubicada en el fondo del recipiente de secado, las condiciones se mantendrán una temperatura de 35°C por 20 min.

3.2.6. Caracterización física del sustrato

3.2.6.1 Distribución del tamaño de partícula

Para este análisis las cáscaras y semillas fueron sometidas previamente a trituración y secado por lecho fluidizado, luego se determinó la distribución del tamaño de partícula por medio de tamices de distintas aberturas, manteniendo una agitación por 15 min en tamiz vibratorio Ro-Tap, (Gilson Company, INC, Estados Unidos). Los tamices a utilizados fueron de una abertura de malla de: 2,36 mm, 1,68 mm, 1,19 mm, 0,841 mm, 0,60 mm, 0,595 mm, 0,30 mm y 0,149 mm. Luego se sometieron a vibración por 15 min en el agitador de tamices Ro-Tap. Las muestras tamizadas se almacenaron en bolsas de papel y polietileno y almacenadas en un refrigerador (5 °C) hasta su posterior uso. El promedio del tamaño de partículas se determinó por la ecuación de Sautier (Povh et al., 2001), Ecuación 3.1.

$$\overline{dp} = \frac{l}{\sum_{i=1}^k \frac{\Delta x_i}{dp_i}} \quad \text{Ecuación (3.1)}$$

Donde:

\overline{dp} : Diámetro de partícula (mm)

dp_i : Diámetro de la malla i (mm)

Δx_i : Fracción de masa retenida por la malla i

i : 1,2,3,...k

3.2.6.2. Determinación de humedad

La humedad de las muestras, se determinó por medio del método gravimétrico (AOAC, 1990), basado en la diferencia de pesada mediante secado en estufa (WTC Binder, modelo 1924030000200, Alemania), hasta alcanzar un peso constante. Se pesó $1 \pm 0,001$ g de la muestra en una capsula metálica y se llevó a la estufa para secar a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Al cabo de este tiempo se retira la capsula de la estufa, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y se pesó en la balanza analítica (Ohaus MJ-510, Corporation Estados Unidos). Nuevamente se llevó la muestra a la estufa por 1 h, y nuevamente se enfrió y pesó. Se repitió este procedimiento hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedieran los 2 mg, finalmente se expresa el peso perdido por la muestra como porcentaje de humedad. Esta determinación se realizó en triplicado.

Para la determinación porcentual de humedad en base húmeda se utilizaró la Ecuación 3.2, que se muestra a continuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{[m_i - m_f]}{m_i} \times 100 \quad \text{Ecuación (3.2)}$$

Donde:

m_i : Peso de la muestra inicial, húmeda (g)

m_f : Peso de la muestra final, seca (g)

3.2.6.3. Densidad aparente (ρ_{ap})

La densidad aparente se obtuvo dividiendo la masa (kg) de sustrato cargado en una probeta de volumen predeterminado (m^3). Esto se efectuó dejando caer la muestra en una probeta de 50 mL sin aplicar presión mecánica. Las mediciones se realizaron en triplicado.

3.3. Métodos

3.3.1 Extracción Supercrítica

Los ensayo de extracción supercrítica se realizaron en un extractor supercrítico Spe-ed EFS-2 modelo 7071 (Applied Separations, Allentown, PA). El equipo opera con control de presión, temperatura y flujos ajustables, y trabaja con un sistema enfriador (licuificador de CO_2): Recirculating Cooler marca Julabo modelo F-200 (Julabo USA Inc., Allentown, PA). Como solvente se utilizó CO_2 líquido 99,99% pureza, suministrado por la empresa AGA y se realizó la

extracción con co-solvente, para lo cual se utilizó una bomba hplc Knauer modelo K-501 (Alemania), como co-solvente se utilizó etanol líquido 99,8% pureza, además el equipo consta de una cámara de calentamiento, un vaso de extracción, un regulador de presión, recipientes para recibir el extracto y un medidor de flujo de salida de CO₂.

3.3.1.1. Adición de co-solvente

Para la extracción supercrítica se debió realizar un pretratamiento a la materia prima que consistió en agregar el co-solvente o modificador; para ello, las muestras se colocaron en un vaso precipitado de 250 mL, se agregarán 10 mL de etanol absoluto con pipeta graduada y gota a gota, tratando de humectar en forma uniforme el sustrato. Luego el vaso se cubrió con parafilm y se dejó reposar por 16 horas hasta el momento de la extracción supercrítica.

3.3.1.2. Condiciones de extracción

Para cada ensayo de extracción se utilizaron 20g de sustrato humectado, los experimentos se llevaron a cabo en una unidad supercrítica y se cargaron a un recipiente de extracción de 50 mL. Como solvente se utilizó CO₂ que circula a una velocidad superficial de 1 mm/s, como co-solvente se empleó etanol p.a. La temperatura de extracción utilizada fue constante a 45 °C, se informa que de Melo et al. (2014), donde se sugiere que en la mayoría de los trabajos de investigación sobre extracción con fluido supercrítico a partir de matrices vegetales utilizan rangos de temperatura de 40-60 °C. Las condiciones variables en esta extracción fueron la proporción cáscara:semilla, que ira de 1:2, 1:3 y 1:4 %, las presiones de extracción que fueron de 200, 300 y 400 bar y cantidad de co-solvente que fueron de 2, 4 y 6%, estos dos últimos parámetros son controlados en el extractor supercrítico. Análisis previos realizados por Velazquez. (2014), determinaron que un incremento sobre el 6% de co-solvente, no representan un aumento significativo en el contenido de fenoles totales en extractos de cáscara de palta Hass. Los tiempos de extracción fueron de 60 min. Se midió el contenido de fenoles totales por el método del folin-Ciocalteau y se le determinó la capacidad antioxidante a las mejores condiciones por el método del DPPH.

3.3.2. Extracción hidroalcohólica

Esta extracción se llevó a cabo utilizando 100 mL de solvente hidroalcohólico que se encontraba a una concentración 50% etanol p.a/50% agua destilada (concentración determinada según ensayos

previamente realizados). Las condiciones variables en esta extracción fueron la proporción cáscara:semilla que fue de 1:2, 1:3 y 1:4 %, el tiempo de agitación que fue de 1, 2 y 3 h y finalmente la fracción soluto/solvente fue de 3, 5 y 7 % p/v, la muestra que se utilizó en esta extracción será húmeda. La mezcla soluto-solvente fue puesta en balones de 250 mL para su posterior agitación.

3.3.3. Contenido de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó según el método del Folin-Ciocalteu, según Borden y Scarpa, (2000).

Reactivos:

- Solución reactivo Folin-Ciocalteu Merck p.a.
- Solución estándar de ácido gálico p.a, 99,9%, Merck.
- Solución de carbonato de sodio (99,9%, Merck) al 20% p/v: utilizar agua destilada caliente para disolver 20g de carbonato, aforar a 100 mL. Filtrar y guardar en oscuridad.

Procedimiento:

Se adicionó 0,1 mL de extracto de cáscara y semilla de palta Hass en un matraz aforado de 10 mL, se añaderán 4,9 mL de agua destilada y 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, se dejó reposar por 3 minutos. Luego se agregaron 1,7 mL de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3), se mezcló y completó el aforo a 10 mL con agua destilada. Se dejó reposar 30 minutos. Conjuntamente se preparó un blanco, sin la muestra, agregando 5 mL de agua destilada, 0,5 mL de Folin-Ciocalteu y 1,7 mL de solución de carbonato de sodio, finalmente se aforó a 10 mL con agua destilada, siguiendo los mismos tiempos de reposo de los matraces con muestras.

Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (ATI Unicam UV/Vis Spectrometer UV3-200) a 765 nm y se elaboró una curva de calibración de Ácido Gálico (Anexo E, Figura E-1), lo que permitió transformar los datos a mg GAE/100g.

Preparación de la curva de calibración: La curva de calibración de ácido gálico se realizó pesando 25 mg de ácido gálico en matraz aforado de 25 mL, se agregó 1 mL de etanol para disolver el ácido gálico y se aforó con agua destilada. Se prepararon soluciones patrones entre 50 y 400 μg de ácido gálico/mL. Se realizó la reacción de Folin-Ciocalteu con cada solución.

3.3.4. Capacidad antioxidante por el método del DPPH (Captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil).

La capacidad antioxidante se basa en la medida del secuestro de radicales libres por los compuestos antioxidantes, es decir, se determina la capacidad donante de protones o de captación de radicales mediante el ensayo con el radical estable 1-1-difenil-2-picrihidrazil (DPPH), que se decolora en presencia de compuestos con capacidad de captación de radicales libres (Von-Gadow et al., 1997). Este método descrito por Brand-Williams (1995) utiliza el radical libre estable DPPH, el cual posee una absorción medible a 517 nm que luego decrece a medida que se reduce por un compuesto antioxidante.

Procedimiento según Brand-Williams (1995):

Para determinar la capacidad antioxidante de los distintos extractos se preparó una solución etanólica de radical DPPH (p.a, Aldrich) de 20 mg/L. Se pesó 0,005g de DPPH y se aforó a 250 mL de metanol. Luego se leyó contra un blanco (metanol) a 517 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia del DPPH debe ser mayor a 0,5 y menor a 0,8. Posteriormente a la batería de tubos se les agregó 150 µL de cada solución de extractos y 5,850 mL de DPPH. En el caso del blanco de cada muestra, también se agregó 150 µL de cada solución de extractos y 5,850 µL de etanol. En ambos casos (tubos con las muestras y blanco), la reacción se preparó en triplicado, los tubos se dejaron en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se leyeron en espectrofotómetro contra blanco.

Además, se realizó un control, que consiste en un tubo al cual se agrega 100 µL de metanol y 3900 µL de DPPH, también se leyeron a 517 nm contra blanco, en este caso etanol.

El cálculo del % de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres) se determinó empleando la ecuación 3.3:

$$\% \text{Decoloración} = [(Ab_{\text{control}} - Ab_{\text{muestra}}) / (Ab_{\text{control}})] * 100 \quad \text{Ecuación (3.3)}$$

Donde:

Abs control: absorbancia del control

Abs muestra: absorbancia de la muestra

El grado de decoloración indica la eficiencia de las sustancias como captadoras de radicales libres. Los resultados del ensayo DPPH expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para

disminuir la concentración inicial de DPPH al 50% (Deng et al., 2011). Se elaboró una curva de calibración de Ácido Gálico (Anexo E, Figura E-1), lo que permitió transformar los datos a mg GAE/100g.

3.3.5. Cálculo de la eficiencia de encapsulación (%EE)

La eficiencia de encapsulación (%EE) de las diferentes formulaciones, fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \left(\frac{m_c}{m_e} \right) \times 100$$

Donde m_c corresponde a la masa de polifenoles totales encapsulados, y m_e es la masa de polifenoles totales presente en el extracto en el cual se originó la formulación. El valor de m_c se determinó disolviendo una cantidad conocida de cápsulas en una solución de citrato de sodio (5% p/v) durante 2h, en un agitador orbital (Lab-Line Instruments, EE.UU) a 37°C y 125 rpm. El citrato de sodio actúa como quelante desintegrando el gel de alginato de calcio completamente (Draguet, 2000). La masa de polifenoles en ambos casos fue medida por el método de Folin-Ciocalteu.

3.3.6. Diseño experimental

3.3.6.1. Diseño experimental general para los métodos de extracción

Los experimentos se llevaron a cabo de forma aleatoria para minimizar el error de variables externas no controladas sobre las respuestas. Para poder expresar la variable respuesta (Y_{SC} e Y_{HH}) en función de las variables independientes, los resultados se ajustaron a una ecuación de segundo orden (Ecuación 3.4), utilizando solo componentes significativas pero manteniendo los coeficientes de primer grado, para así conservar la jerarquía del modelo.

$$Y (SC \text{ o } HH) = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{23}X_2X_3 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2 \quad \text{Ecuación (3.4)}$$

Donde A_0 es una constante; A_1 , A_2 y A_3 son coeficientes lineales; A_{12} , A_{13} y A_{23} son coeficientes para la interacción de variables; y A_{11} , A_{22} y A_{33} son coeficientes cuadráticos. Las gráficas de superficie de respuesta se generaron para dos variables dentro del rango experimental y manteniendo constante la otra variable en el valor central.

La significancia ($p < 0,05$) de los coeficientes de la ecuación se determinaron mediante un análisis de varianza, empleando el software Design Expert Versión 6.0.1, (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN), el cual entregó finalmente el diseño y las condiciones experimentales.

Para que el software logre interpretar la variable proporción cáscara:semilla, se utilizarán en reemplazo de las condiciones 1/2, 1/3 y 1/4 los números 2, 3 y 4 respectivamente.

3.3.6.2. Diseño experimental para el método de extracción supercrítica

Los ensayos de extracción se realizaron en base a un diseño Box-Behnken con tres variables independientes, presión (P, codificada X_1), proporción cáscara:semilla (CS, codificada X_2), y cantidad de co-solvente (C, codificada X_3), obteniendo las ecuaciones ajustadas 3.5, 3.6 y 3.7. Los tres niveles de cada variable totalizaron 15 ensayos que incluyen 3 repeticiones del punto central. Como variables de respuesta se midió el contenido de fenoles totales (Y_{SC} o Y_{HH}).

$$P = \frac{X_1 - 300}{100} \quad \text{Ecuación (3.5)}$$

$$CS = \frac{X_2 - 3}{1} \quad \text{Ecuación (3.6)}$$

$$C = \frac{X_3 - 4}{2} \quad \text{Ecuación (3.7)}$$

Las variables independientes con y sin codificación se muestran en la Tabla 3.1 y las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 3.2. Los resultados experimentales se analizaron mediante la metodología superficie de respuesta, la cual utiliza una secuencia de experimentos diseñados para obtener una buena respuesta, así como para asegurar que los experimentos sean mejor interpretados (Shao et al., 2014).

Tabla 3.1. Variables independientes y sus niveles para diseño Box-Behnken.

Variable independiente	Unidades	Símbolos	Niveles
------------------------	----------	----------	---------

		No codificada	Codificada	No codificada	codificada
Presión	bar	P	X_1	200	-1
				300	0
				400	+1
Cáscara/semilla	%	CS	X_2	1:2	-1
				1:3	0
				1:4	+1
Co-solvente	%	C	X_3	2	-1
				4	0
				6	+1

Tabla 3.2. Diseño experimental Box-Behnken para extracción supercrítica.

Set	Presión bar	Cáscara:Semilla	Co-solvente % (p/p)	X_1	X_2	X_3
1	200	1:4	4	-1	1	0
2	400	1:4	4	1	1	0
3	200	1:2	4	-1	-1	0
4	400	1:2	4	1	-1	0
5	200	1:3	2	-1	0	-1
6	400	1:3	2	1	0	-1
7	200	1:3	6	-1	0	1
8	400	1:3	6	1	0	1
9	300	1:2	2	0	-1	-1
10	300	1:2	2	0	-1	-1
11	300	1:4	6	0	1	1
12	300	1:2	6	0	-1	1
13	300	1:3	4	0	0	0
14	300	1:3	4	0	0	0
15	300	1:3	4	0	0	0

3.3.6.3. Diseño experimental para el método de extracción hidroalcohólica

Los ensayos de extracción se realizaron en base a un diseño Box-Behnken con tres variables independientes, tiempo de agitación (T, codificada X_1), proporción cáscara:semilla (CS, codificada X_2), y fracción soluto solvente (SS, codificada X_3), obteniendo las Ecuaciones ajustadas 3.8, 3.9 y

4.0. Los tres niveles de cada variable totalizaron 15 ensayos que incluyen 3 repeticiones del punto central. Como variables de respuesta se medirá el contenido de fenoles totales (Y_{SC} o Y_{HH}).

$$\mathbf{T} = \frac{\mathbf{x}_1 - 2}{1} \quad \text{Ecuación (3.8)}$$

$$\mathbf{CS} = \frac{\mathbf{x}_2 - 3}{1} \quad \text{Ecuación (3.9)}$$

$$\mathbf{SS} = \frac{\mathbf{x}_3 - 5}{2} \quad \text{Ecuación (3.10)}$$

Las variables independientes con y sin codificación se muestran en la Tabla 3.3 y las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 3.4. Los resultados experimentales se analizaron mediante la metodología superficie de respuesta.

Tabla 3.3. Variables independientes y sus niveles para diseño Box-Behnken.

Variable independiente	Unidades	Símbolos		Niveles	
		No codificada	Codificada	No codificada	codificada
Tiempo	Horas	T	X_2	1	-1
				2	0
				3	+1
Cáscara/semilla	%	CS	X_2	1:2	-1
				1:3	0
				1:4	+1
Soluto/solvente	%	SS	X_3	3	-1
				5	0
				7	+1

Tabla 3.4. Diseño experimental Box-Behnken para extracción hidroalcohólica.

Set	Tiempo agitación	Cáscara :Semilla	soluto/solvente	X_1	X_2	X_3
	h	%	%			
1	1	1:2	5	-1	-1	0
2	3	1:2	5	1	-1	0
3	1	1:4	5	-1	1	0
4	3	1:4	5	1	1	0
5	1	1:3	3	-1	0	-1
6	3	1:3	3	1	0	-1
7	1	1:3	7	-1	0	1
8	3	1:3	7	1	0	1
9	2	1:2	3	0	-1	-1
10	2	1:4	3	0	1	-1
11	2	1:2	7	0	-1	1
12	2	1:4	7	0	1	1
13	2	1:3	5	0	0	0
14	2	1:3	5	0	0	0
15	2	1:3	5	0	0	0

3.3.7. Elaboración de los hidrogeles (encapsulación por extrusión)

El ensayo fue realizado en el laboratorio de química y farmacia, perteneciente a la facultad de Ciencias químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Análisis previos demostraron que el contenido de etanol en las muestras evitaban que se formara el complejo alginato-calcio por lo tanto los extractos fueron previamente rotaevaporados (Rotavapor Büchi, modelo R – 205. Suiza), por 20 min 40°C.

Como material gelificante se utilizó alginato de sodio al 2% p/v (Sigma– Aldrich, EE.UU), el cual fue agitado por 2 horas a temperatura ambiente hasta homogeneizar toda la mezcla. Posteriormente se mezcló la solución de alginato con los extractos polifenólicos (80mL) de las mejores condiciones de la extracción supercrítica y extracción hidroalcohólica por separado, estos se llevaron a agitación por 2 horas a temperatura ambiente, una vez homogeneizadas las mezclas se depositaron en jeringas de 60 mL. La encapsulación se llevó a cabo en el equipo *encapsulator B-395 pro*, mediante goteo en una solución de CaCl₂ al 2%p/v, el cual estuvo en constante agitación. Se utilizó una medida de boquilla (nozzle) de 250 µm (recomendada por otros investigadores), las condiciones de encapsulación que se digitaron en la pantalla del equipo fueron de una frecuencia de 3000 Hz, un voltaje de 1400 V y una velocidad de goteo de 5 mL por minuto. Las cápsulas permanecieron en la solución de cloruro de calcio por 30 min, se filtraron y lavaron con solución buffer acético/acetato pH 5,5 para eliminar el exceso de iones calcio (Deladino et al., 2008).

3.3.8. Comportamiento reológico de los hidrogeles

Para los análisis reológicos se utilizó el equipo Haake RheoStress 1 (Haake, Karlsruhe, Germany) versión 2.3. Con este equipo se realizaron análisis tanto rotatorios como oscilatorios en la muestra (hidrogeles de algianto con extracto). Durante las determinaciones de flujo se trabajó a una temperatura de 25 °C, por medio de un sistema de agua circulante marca Thermo scientific (SC 100, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany).

3.3.8.1. Análisis Rotatorios

En cuanto a los análisis rotatorios, se caracterizó la muestra en base a la relación entre el esfuerzo de cizalla (σ) y viscosidad (η) respecto a la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), con el fin de ajustar su comportamiento a algún modelo reológico conocido.

3.3.8.2. Análisis Oscilatorios (Dinámicos)

En cuanto a los análisis oscilatorios, se busca encontrar posibles cambios de la matriz de la muestra cuando se le aplica cizallamiento, para ello estimando los respectivos módulos de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y módulo complejo (G^*), con los cuales se puede definir si la muestra presenta comportamientos elásticos o no.

Por lo tanto, para los análisis oscilatorios, se estimaron las siguientes relaciones:

- Barrido de deformación: G' , G'' , G^* vs Deformación (-) (0,01 – 100%), con una frecuencia de 1 Hz. Se llevó a cabo con el fin de buscar el *rango lineal viscoelástico (RLV)*.
- Barrido de frecuencia: G' , G'' , G^* vs Frecuencia (1/s) (1 – 100 Hz). Se realizó con el objetivo de determinar si la muestra tenía comportamientos elásticos por sobre lo viscoso o viceversa, y en qué grado.

Se pesaron cerca de 30 gramos de geles en balanza granataria que fueron traspasados a la copa, la cual contiene la matriz a tratar en el equipo. Posterior a esto, se comencaron los análisis reológicos con el uso del sensor Z34 DIN (cilindro coaxial). Todos estos datos serán trabajados en el Software *Rheowin 4 Job Manager* (version 4.30.0016, Haake) y analizados en el Software *Rheowin 4 Data Manager*.

3.3.9. Análisis térmico

El ensayo térmico fue realizado en el laboratorio de Procesos de Alimentos, perteneciente a la facultad de Ciencias químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

El equipo a utilizado es un sistema de análisis térmico *Perkin Elmer* modelo DSC 6000, con modelación de temperatura MT-DSC y principio de *Heat flux*. Se usó nitrógeno de alta pureza como gas de purga (99,999%) a flujo de 20 mL/min. El tratamiento de datos fue realizado con el programa computacional *Software Pyris player*.

El procedimiento se realizó según Lupo et al. (2015), con algunas modificaciones; las muestras (3-5 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio y se cerraron herméticamente mediante una

prensa para cápsulas. Como referencia se empleó una cápsula vacía. Las muestras fueron calentadas a una velocidad de 10 °C/min, desde 25 hasta 300 °C.

3.3.9.1. Programa térmico

- Llevar desde estado basal hasta 25°C.
- Mantener a 25 °C isotérmicamente por 5 min.
- Calentar desde 25 °C hasta 300 °C, a 10 °C/min.
- Mantener a 300 °C isotérmicamente por 5 min.
- Enfriar de 300 °C hasta 25 °C a 30 °C/min.

3.3.10. Dimensiones y la forma de los geles de alginato de calcio

Las dimensiones y la forma de los geles fueron evaluadas utilizando un microscopio óptico (Olympus, CX-31). Para cada muestra, se seleccionaron al menos 50 esferas para determinar los diámetros medios utilizando software *ImageJ 1.45*.

3.3.11. Resumen metodología

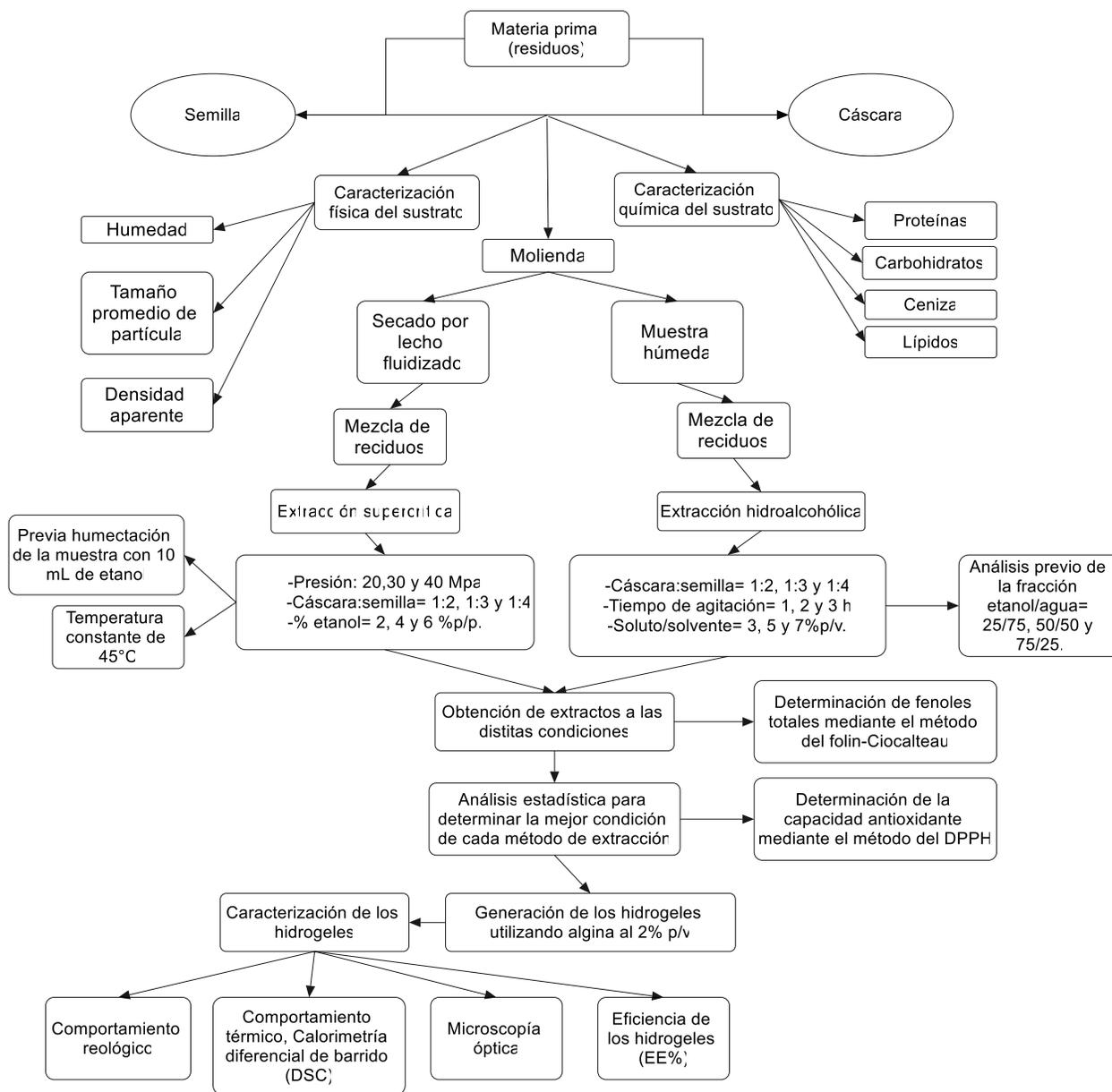


Figura 3.2. Resume metodología.

Capítulo 4: Resultados y discusiones

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Caracterización física del sustrato

Inicialmente se determinó el contenido de humedad del sustrato húmedo, la cual fue para la cáscara de un de un $76,10\% \pm 0,57$. (Anexo A, Tabla A-1), y para la semilla fue de un $69,67\% \pm 0,06$ (Anexo A, Tabla A-2).

En el mecanismo de extracción supercrítica la presencia de agua puede causar efectos indeseables tales como la formación de hielo en las tuberías debido a la rápida descompresión, y la hidrólisis de algunos compuestos (Fornari et al., 2012). Por esta razón es que frecuentemente se realiza una etapa de secado preliminar antes de llevar a cabo el proceso de extracción supercrítica (de Melo et al., 2014).

Posteriormente el sustrato fue sometido a molienda y tamizado, donde se determinó la distribución del tamaño de partícula promedio (d_p , mm) y densidad aparente (ρ_{ap} , kg/m^3).

La densidad aparente del sustrato entrega información sobre la capacidad de carga y el grado de empaque en el extractor supercrítico, para la cáscara el valor fue de $402,53 \pm 0,50 \text{ kg/m}^3$ con una capacidad de carga en el recipiente de extracción de 20,13 g de sustrato (Anexo A, Tabla A-3), y para la semilla el valor fue de $402,85 \pm 0,28 \text{ kg/m}^3$ con una capacidad de carga en el recipiente de extracción de 20,14 g de sustrato (Anexo A, Tabla A-4).

Por otro parte se realizó la determinación del tamaño de partícula promedio de los sustratos por separado (cáscara y semilla de palta Hass molida y secada por lecho fluidizado), mediante la ecuación de Sauter, donde resultó en un tamaño promedio de partícula de 1,603 mm para el sustrato cáscara, donde aproximadamente un 25% de las partículas quedaron retenidas en el tamiz de diámetro $<1,68 \text{ dp} > 1,19 \text{ mm}$, seguido por un 22% que quedó retenido en el tamiz de diámetro $<1,19 \text{ dp} > 0,841 \text{ mm}$ (Anexo A, Tabla A-5, Figura A-1).

Por otro lado el tamaño promedio de partícula para la semilla resulto de 1,404 mm, donde aproximadamente un 32% de las partículas quedaron retenidas en el tamiz de diámetro $<1,68 \text{ dp} > 1,19 \text{ mm}$, seguido por un 24% que quedó retenido en el tamiz de diámetro $<1,19 \text{ dp} > 0,841 \text{ mm}$ (Anexo A, Tabla A-6, Gráfica A-2).

Pourmortazavi y Hajimirsadeghi (2007), indican que en el mecanismo de extracción supercrítica al disminuir el tamaño de las partículas sólidas, aumenta la superficie de contacto con el solvente, favoreciendo la eficiencia de extracción; sin embargo, partículas muy finas obstaculizan la

extracción debido a la re-absorción de analitos en la superficie de la matriz y al compactarse dificultan el flujo de solvente a través del extractor. Por esta razón es que se determinó la distribución del tamaño de partícula, cuyo propósito fue conocer el tamaño promedio de partícula. Además, la extracción supercrítica de sustratos sólidos está controlada por la difusión de los componentes internos, por lo que para efectos de análisis se tomaron porciones de cada tamiz, con el motivo de hacer homogénea y adecuada la composición de las muestras y así evitar el uso de partículas muy grandes, ya que la velocidad de extracción se hace más lenta.

4.2. Análisis estadístico

4.2.1. Análisis estadístico del efecto de las variables sobre las respuestas polifenoles (Y_{SC}) totales obtenidos mediante extracción supercrítica

Con la finalidad de obtener extractos con alto contenido en polifenoles se llevó a cabo un diseño de experimentos Box-Behnken para la optimización de las variables de diseño y la obtención de las mejores condiciones de operación dentro del rango de trabajo.

En la Tabla 4.1 se muestra el contenido de fenoles totales obtenido en las 15 experiencias realizadas, los cuales se obtuvieron respecto de las combinaciones de las variables independientes codificadas (X_1 : Presión de extracción (bar), X_2 : proporción cáscara:semilla, X_3 : co-solvente utilizado (% p/p)), sobre las respuestas contenido de polifenoles totales obtenidas mediante extracción supercrítica (Y_{SC}). Las respuestas son expresadas como un valor promedio resultante de mediciones en triplicado para la respuesta Y_{SC} mediante el método del Folin-Ciocalteu.

En la Tabla 4.1 se puede observar que el contenido de fenoles de los extractos de las mezclas de cáscara y semilla de palta extraídas mediante la técnica de con CO_2 supercrítico se encuentra en un rango entre 91,66 y 726,24, expresados en mg EAG/100g de muestra húmeda. Donde la mayor cantidad de polifenoles se obtuvo bajo las condiciones de extracción de 400 bar, una proporción de cáscara:semilla de 1:3 y 6% co-solvente, correspondientes al punto de diseño N° 8.

Los resultados experimentales de la Tabla 4.1 se ajustaron a un modelo de segundo orden para describir la respuesta Y_{SC} , como una función de las variables presión, proporción cáscara:semilla y cantidad de co-solvente. En la Tabla 4.2 se observan los indicadores a partir del análisis de varianza aplicado al modelo. Estos indicadores son el valor F, el coeficiente de determinación (R^2), la falta de ajuste, la relación señal/ruido, el coeficiente de variación (CV) y el promedio.

Tabla 4.1. Contenido de fenoles totales en función de las variables presión, proporción cáscara:semilla, y uso de co-solvente.

	P	CS	C	Y_{SC}
Set	Bar	%	% (p/p)	mg EAG/100g
1	200	1:2	4	121,94± 1,08
2	400	1:2	4	437,39± 2,28
3	200	1:4	4	158,49± 4,20
4	400	1:4	4	564,99± 0,53
5	200	1:3	2	91,660± 0,60
6	400	1:3	2	373,39± 1,25
7	200	1:3	6	304,83± 3,26
8	400	1:3	6	726,24± 3,57
9	300	1:4	2	167,01± 0,92
10	300	1:4	2	231,36± 4,04
11	300	1:2	6	476,19± 1,39
12	300	1:4	6	512,99± 2,44
13	300	1:3	4	232,66± 1,69
14	300	1:3	4	231,33± 1,74
15	300	1:3	4	225,66± 2,41

Donde= P: presión (bar), CS: proporción cáscara:semilla (%) y C :co-solvente (%p/p).

Tabla 4.2. Indicadores estadísticos del análisis de varianza del modelo de segundo orden seleccionado.

Indicadores estadísticos	Y_{SC} (mg EAG/100g)
F	336,82 (p<0,001)*
R^2	0,9844
Falta de ajuste	18,23 (p=0,053) ns
Razón señal/ruido	63,05
CV	3,86
Desv.Std	12,51
Promedio	323,84

*: Significante (p<0,05); ns: No-significante (p>0,05).

En la Tabla 4.2 se observa que el modelo cuadrático para describir la respuesta Y_{SC} es adecuado. Esto se debe principalmente al valor p descrito por las variables independientes significativas ($p < 0,05$). Al ser el valor p muy pequeño nos indica que tenemos una respuesta robusta, lo que se traduce en un sistema controlado con pocas opciones al error experimental. El análisis de varianza del modelo cuadrático de predicción fue significativo para la respuesta con valores de F tales que existe una probabilidad menor al 0,05 de que este modelo pudiera fallar debido a perturbaciones experimentales. Además reportó un coeficiente de correlación R^2 mayor a 0,90, lo que sugiere que el modelo explica de manera adecuada el comportamiento de las respuestas con respecto a las variables independientes estudiadas.

Como se mencionó anteriormente el valor F para la respuesta Y_{SC} resultó significativo ($p < 0,05$). El valor del coeficiente de determinación (R^2) para la respuesta extracción de polifenoles fue de 0,9844. El R^2 indica la relación que existe entre los valores experimentales y los valores predichos por la respuesta, este valor fue alto y cercano a 1 lo que demuestra que el modelo es significativo, por lo tanto se concluye que el modelo se ajusta a los resultados experimentales en términos de variación.

La falta de ajuste es no significativa para la respuesta Y_{sc} ($P > 0,05$), por lo que se puede concluir que el modelo propuesto se ajusta adecuadamente a los datos (Montgomery, 1991).

La relación señal/ruido mide la calidad de la respuesta y esta debe ser superior a 4 para que el ruido (error no controlable) sea mínimo. Para este caso la señal/ruido fue mayor a 4 (64,05), lo que indica que las respuestas son consistentes en el tiempo a pesar de las fuentes de ruido. Al mismo tiempo, el coeficiente de la variación (CV) fue baja (3,86), lo que indica un alto grado de precisión y los datos experimentales eran muy fiables. Este hecho también se puede corroborar con valores predichos por el modelo (Anexo B, Tabla B-1).

Para complementar la información, se graficaron los valores experimentales *versus* los valores predichos (Figura 4.1).

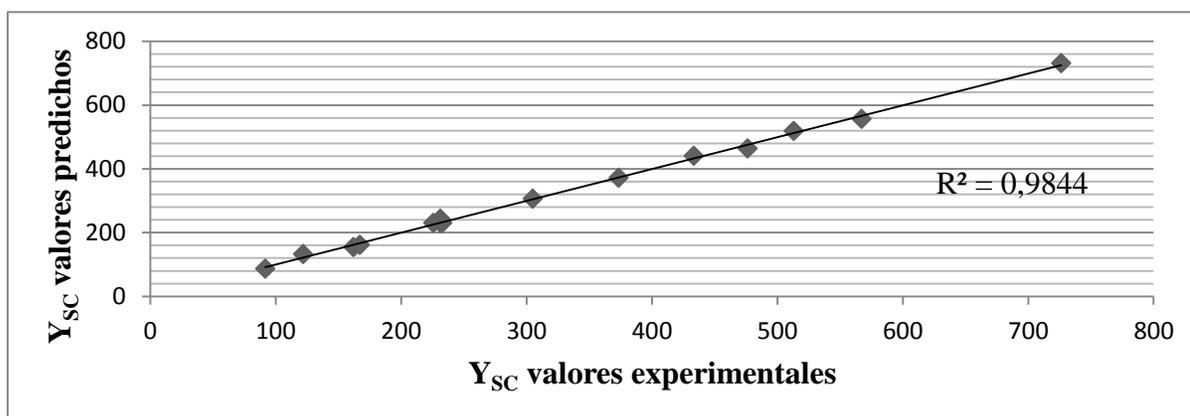


Figura 4.1. Valores predichos v/s valores experimentales obtenidos en el mecanismo de extracción supercrítico.

En este gráfico se observa que los valores predichos son similares a los reales, donde los puntos se encuentran próximos a la recta. Esto se refleja en el cálculo de la pendiente de la recta de regresión, que es cercana a 1.

En función de los resultados obtenidos, es posible afirmar que nuestro modelo es idóneo para describir la respuesta contenido de fenoles totales (Y_{SC}) en función de las variables independientes presión (P), proporción cáscara:semilla (CS) y co-solvente (C).

4.2.1.1 Análisis de varianza y MSR para polifenoles obtenidos por extracción supercrítica.

En la Tabla 4.3 se puede observar el análisis de varianza para la respuesta Y_{SC} .

Tabla 4.3. Análisis de varianza del modelo cuadrático para respuesta Y_{SC} .

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Valor F experimental	Probabilidad
X_1	251993,46	1	251993,46	1609,22	< 0,0001*
X_2	9433,58	1	9433,58	60,24	0,0006*
X_3	167281,85	1	167281,85	1068,25	< 0,0001*
X_1^2	12922,42	1	12922,42	82,52	0,0003*
X_2^2	3785,14	1	3785,14	24,17	0,0044*
X_3^2	26669,40	1	26669,40	170,31	< 0,0001*
X_1X_2	2199,63	1	2199,63	14,05	0,0133*

X_1X_3	4877,70	1	4877,70	31,15	0,0025*
X_2X_3	189,75	1	189,75	1,21	0,3211ns

X_1 : Presión de extracción (P), X_2 : proporción cáscara:semilla (CS), X_3 : co-solvente utilizado (C).

*: Significante ($p < 0,05$) y ns: no significativo ($p > 0,05$).

Para la respuesta Y_{SC} , se obtuvo la Ecuación 4.1, la cual indica la relación causa/efecto que existe con las variables independientes (presión, cáscara:semilla y % de co-solvente).

$$Y_{SC} = 229,88 + 177,48X_1 + 34,34X_2 + 144,60X_3 + 59,16X_1^2 + 32,02X_2^2 + 84,99X_3^2 + 23,45X_1X_2 + 34,93X_1X_3 - 0,89X_2X_3 \quad \text{Ecuación (4.1)}$$

Se puede observar que el coeficiente lineal de la presión ($A_1 = +177,48$), y el coeficiente lineal del co-solvente ($A_3 = +144,60$) son los mayores coeficientes en magnitudes, los cuales tienen una gran contribución en la respuesta contenido de fenoles totales (Y_{SC} , mg GAE/100g). De acuerdo a los signos positivos que acompañan a estos coeficientes se puede inferir que su comportamiento es directamente proporcional, es decir, a medida que aumentan la presión y la cantidad de co-solvente aumenta también el contenido de fenoles totales.

De las interacciones entre variables la que presentó una mayor contribución en la respuesta ($p < 0,05$) fue la interacción Presión-co-solvente ($A_{13} = +34,93$) y la interacción presión-cáscara:semilla ($A_{12} = 23,45$). De acuerdo al análisis de varianza, el coeficiente cuadrático del co-solvente ($A_3^2 = 84,99$) y de la presión ($A_1^2 = +59,16$) también tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) en el contenido de fenoles.

Para ver más claramente este fenómeno, se construyó una gráfica de superficie de respuesta (Figura 4.1). En ella se observa más detalladamente el efecto de la interacción entre la presión y co-solvente (X_1X_3) y el efecto de la presión y el co-solvente en sus componentes lineales (X_1 y X_2 respectivamente) los cuales se destacan por su alto efecto significativo sobre la respuesta.

Los diagramas de superficie de respuesta para el modelo 3D se obtuvieron mediante el software Design-Expert. Las representaciones gráficas de superficie de respuesta representan las interacciones entre dos variables respecto de la respuesta. Es evidente que estos diagramas en 3D

proporcionan una interpretación visual de la interacción entre dos variables y facilita la ubicación de las condiciones experimentales óptimas.

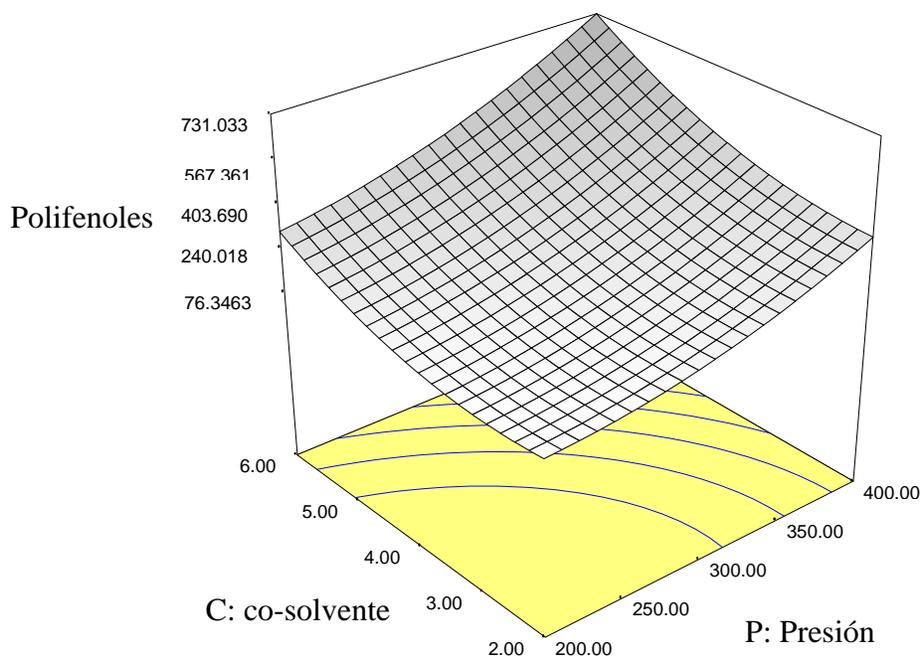


Figura 4.2. Superficie de respuesta de contenido de fenoles totales (Y_{SC}) como una función de la presión (P) y co-solvente (C), a un valor medio de cáscara:semilla (CS) de 1:3.

En la Figura 4.2. Se puede observar que a altos niveles de presión mayor es el efecto sobre la respuesta, donde mediante la utilización de la ecuación ajustada, manteniendo una alta presión (400 bar) y variando en co-solvente de 2 a 6 %p/p, el contenido de polifenoles varía de 371,98 a 731,03 mg GAE/100g respectivamente, por el contrario al mantener una baja presión (200 bar) y variando el contenido de co-solvente de 2 a 6 %p/p, el contenido de polifenoles es menor, variando entre 86,87 y 306,23 mg GAE/100g respectivamente. Por lo tanto, al utilizar altas presiones y altos % de co-solvente se obtiene un mayor efecto en el contenido de fenoles totales de extractos de cáscara y semilla de palta Hass molida, esto se debe según Escribano y Santos (2003), principalmente al aumento en la densidad de CO_2 , es decir, aumento en el poder de solvatación con el aumento de la presión.

Por otro lado, se entiende que las propiedades lipófilas de CO_2 supercrítico hacen de este disolvente poco adecuado para la extracción de compuestos polares, tales como compuestos fenólicos. Sin embargo, al adicionar pequeñas cantidades de co-disolventes tales como agua o etanol pueden

aumentar la polaridad de CO₂ supercrítico mediante la mejora de la solubilidad de los compuestos más polares (Garmus et al., 2015). Sin embargo, no sólo las solubilidades de algunos componentes aumentan con el uso de co-solvente, sino también el número de componentes solubilizados por el disolvente, lo que reduce la selectividad del proceso y aumenta el rendimiento global (Mazzutti et al., 2012). Por lo tanto, la adición de modificador puede mejorar altamente la capacidad de extracción por fluido supercrítico, pero se debe tener en cuenta la selectividad que ejerce el mecanismo de extracción.

Como se dijo anteriormente a medida que aumenta la cantidad de co-solvente existe un incremento en el contenido de fenoles totales, Según Danh et al. (2010) el aumento de la concentración de etanol y la elevación de la presión resultaron en un aumento de la densidad de disolvente mixto. La alta densidad aumenta la magnitud de las interacciones físicas entre soluto y moléculas de disolvente, y por lo tanto conduce a una mejora de solubilidad global. Esto debido al aumento de las interacciones de fenol-alcohol (Cháfer et al., 2004). Además, el etanol y el metanol son capaces de generar enlace hidrógeno, dipolo-dipolo, y otras interacciones de polaridad con fenoles, y pueden aumentar la extracción de ellos (Lang y Wai, 2001, Maróstica-Junior et al., 2010 y Murga et al., 2000). Por lo tanto, la adición de mayores cantidades de modificadores en el sistema pueden promover la extracción de moléculas polares (Medeiros et al., 2016).

Por otro lado, la interacción de la presión y la proporción cáscara:semilla (X_1X_2) fue también significativa, en la siguiente imagen se puede observar el efecto de estas variables sobre el contenido de fenoles totales.

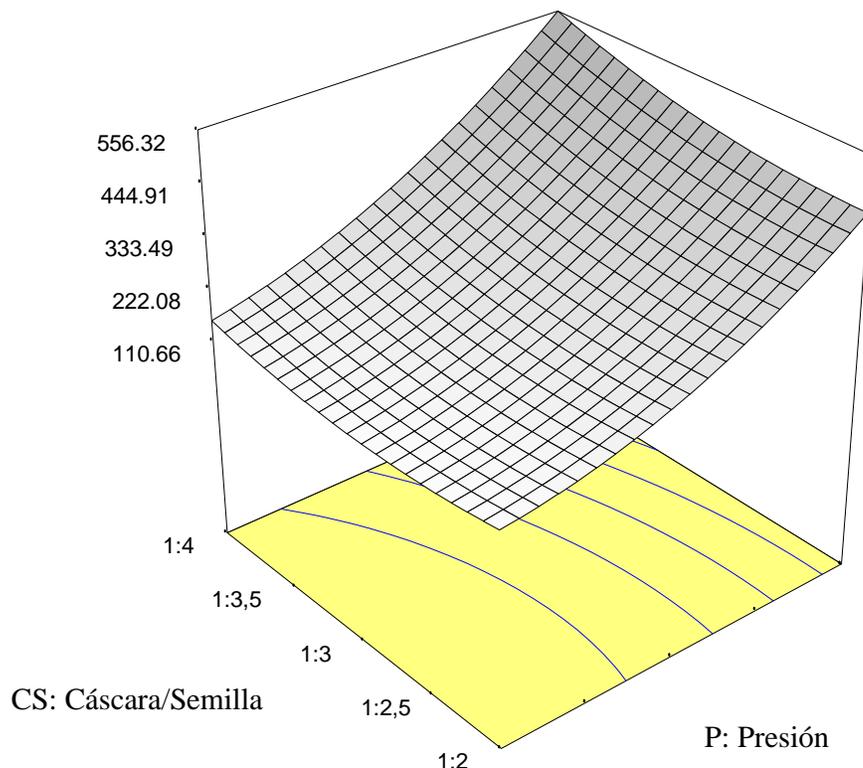


Figura 4.3. Superficie de respuesta de contenido de fenoles totales (Y_{SC}) como una función de la presión (P) proporción cáscara:semilla (CS), a un valor medio de co-solvente de 4% p/p.

Se puede observar en la Figura 4.3. Al mantener una alta presión de 400 bar y un valor medio de co-solvente de 4%, al aumenta la proporción cáscara:semilla de 1:2 a 1:4 el contenido de fenoles totales incrementa desde 440,79 a 556,36 mg GAE/100g respectivamente, lo que demuestra que en este caso durante el mecanismo de extracción supercrítica al aumentar el contenido de semilla el contenido de fenoles totales incrementa. Esto puede deberse a que en estudios realizados por Soong y Barlow, (2004) quienes establecen que la capacidad antioxidante de distintas frutas es determinada por la contribución de las semillas o carozos, quienes aportan principalmente a la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos de las frutas (Soong y Barlow, 2004).

Por otro lado también se puede explicar este fenómeno debido al conocido sinergismo presente en los polifenoles, según Jacobs et al, (2009), un sinergismo es cuando una combinación de nutrientes en un alimento proporciona un mayor (por ejemplo, antioxidante) efecto beneficioso de lo que sería de forma individual. Además, los extractos (fracciones) pueden ser más beneficioso que los

componentes aislados, ya que un componente bioactivo individual puede cambiar sus propiedades en presencia de otros compuestos presentes en los extractos (Borchers et al., 2004).

De acuerdo con Liu, (2003), los efectos sinérgicos de los fitoquímicos de las frutas y verduras son responsables de sus potentes propiedades bioactivas, y el beneficio de una dieta rica en frutas y verduras se atribuye a la compleja mezcla de fitoquímicos presentes en los alimentos enteros.

4.2.2. Análisis estadístico del efecto de las variables sobre las respuestas polifenoles totales (Y_{HH}) obtenidos mediante extracción hidroalcohólica.

En la Tabla 4.4 se muestra el contenido de fenoles totales obtenidos de las 15 experiencias realizadas, los cuales se obtuvieron respecto de las combinaciones de las variables independientes codificadas (X_1 tiempo de agitación, X_2 : proporción cáscara:semilla, X_3 : % soluto/solvente) sobre las respuestas contenido de polifenoles totales obtenidos por extracción hidroalcohólica (Y_{HH}). Las respuestas son expresadas como un valor promedio resultante de mediciones en triplicado para la respuesta Y_{HH} mediante el método del Folin-Ciocalteu.

Análisis previos realizados por Velásquez, (2014), indican que la mezcla etanol/agua fue más eficiente en la extracción de los fenoles de la cáscara de palta, indicando que la polaridad intermedia presentada por esta mezcla de solventes fue afín con los fenoles de la cáscara; los mismos resultados fueron encontrados por Curaqueo, (2013) en semillas de palta Hass. Chew et al. (2011), encontró que se tienen mejores resultados de extracción cuando se adiciona cierta cantidad de etanol al agua. Sin embargo también concluyeron que una mezcla sobre un 60% de etanol, reduce el rendimiento de la extracción, siendo lo óptimo un 50%.

En la Tabla 4.4 se puede observar que el contenido de fenoles de los extracto de las mezclas de cáscara y semilla de palta obtenidas mediante extracción hidroalcohólica, se encuentra en un rango entre 323,31 y 987,12, expresados en mg EAG/100g de muestra húmeda. Donde la mayor cantidad de polifenoles se obtuvo bajo las condiciones de extracción de 3 horas, una proporción de cáscara:semilla de 1:3 y 3% p/v de soluto/solvente, correspondientes al punto de diseño N° 6.

Los resultados experimentales de la Tabla 4.4 se ajustaron a un modelo de segundo orden para describir la respuesta Y_{HH} , como una función de las variables presión, proporción cáscara:semilla y cantidad de co-solvente. En la Tabla 4.5 se muestran los indicadores estadísticos a partir del análisis de varianza aplicado al modelo de segundo orden. Estos indicadores son el valor F, el

coeficiente de determinación (R^2), la falta de ajuste, la relación señal/ruido, el coeficiente de variación (CV) y el promedio.

Tabla 4.4. Contenido de fenoles totales en función de las variables tiempo de agitación, proporción cáscara:semilla, y % soluto/solvente.

Set	T	CS	SS	Y_{HH}
	H	%	%p/v	mg EAG/100g
1	1	1:2	5	359,91± 0,01
2	3	1:2	5	738,46± 0,01
3	1	1:4	5	459,53± 0,02
4	3	1:4	5	694,11± 0,01
5	1	1:3	3	323,31± 0,01
6	3	1:3	3	987,12± 0,01
7	1	1:3	7	397,21± 0,04
8	3	1:3	7	677,08± 0,01
9	2	1:2	3	718,15± 0,01
10	2	1:4	3	920,95± 0,01
11	2	1:2	7	581,01± 0,01
12	2	1:4	7	580,29± 0,02
13	2	1:3	5	551,34± 0,01
14	2	1:3	5	590,60± 0,01
15	2	1:3	5	586,02± 0,02

Donde T: tiempo de agitación (horas), CS: proporción cáscara:semilla (%) y SS: fracción soluto solvente (%p/v).

Tabla 4.5. Indicadores estadísticos del análisis de varianza del modelo de segundo orden seleccionado.

Indicadores estadísticos	Y_{HH} (mgEAG/100g)
F	10,69 (p=0,0089)*
R^2	0,9506
Falta de ajuste	17,10 (p=0,0557) ns
Razón señal/ruido	11,806
CV	11,47
Desv.Std	70,11
Promedio	611,01

*: Significante (p<0,05); ns: No-significante (p>0,05).

En la Tabla 4.5. Se observa que el modelo cuadrático para describir la respuesta Y_{HH} es adecuado. El análisis de varianza del modelo cuadrático de predicción fue significativo para las dos respuestas con valores de F tales que existe una probabilidad menor al 0,05 de que este modelo pudiera fallar debido a perturbaciones experimentales. Como se puede ver en la Tabla 4.5 el valor F (11,02) para la respuesta Y_{HH} resultó significativo (p<0,05). La falta de ajuste es no significativa con un valor de 17,10 (p=0,0660).

Para este caso la señal/ruido fue mayor a 4 (11,806), lo que indica que las respuestas son consistentes en el tiempo a pesar de las fuentes de ruido. Al mismo tiempo, el coeficiente de la variación (CV) fue baja (11,47), lo que indica un alto grado de precisión y los datos experimentales eran muy fiable.

Además reportó un coeficiente de correlación R^2 : 0,9506 lo que sugiere que la relación que existe entre los valores experimentales y los valores predichos por la respuesta son cercanos. Este hecho también se puede corroborar con valores predichos por el modelo (Anexo B, Tabla B-2).

Para complementar la información, se graficaron los valores experimentales *versus* los valores predichos (Figura 4.6).

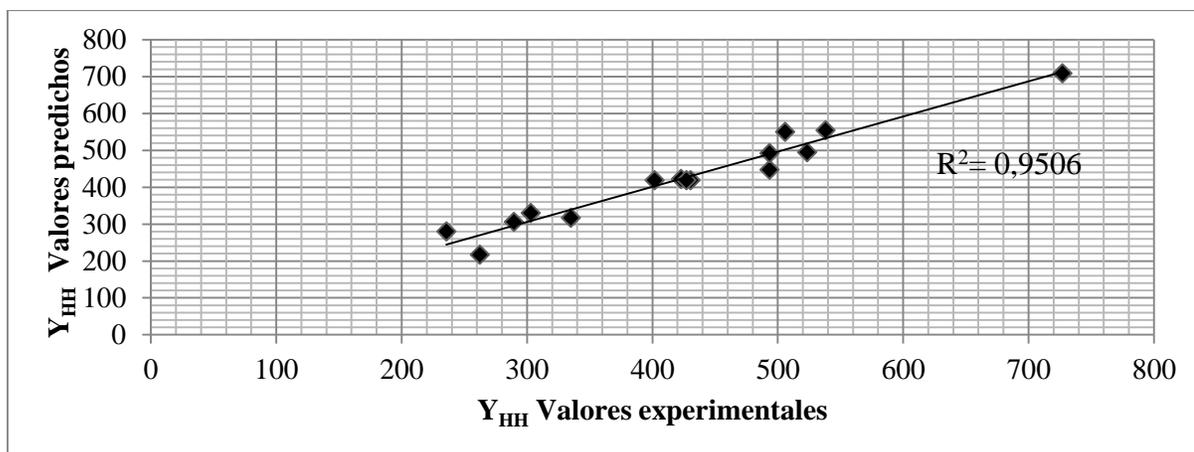


Figura 4.6. Valores predichos v/s valores experimentales obtenidos en el mecanismo de extracción hidroalcohólica.

En este gráfico se observa que los valores predichos son similares a los reales, donde los puntos se encuentran próximos a la recta. Esto se refleja en el cálculo de la pendiente de la recta de regresión, que es cercana a 1.

En función de los resultados obtenidos, es posible afirmar que nuestro modelo es idóneo para describir la respuesta contenido de fenoles totales (Y_{HH}) en función de las variables independientes tiempo de agitación (T) proporción cáscara:semilla (CS) y % soluto/solvente (SS).

4.2.2.1 Análisis de varianza y MSR para los polifenoles obtenidos por hidroalcohólica

En la Tabla 4.6 se puede observar el análisis de varianza para la respuesta Y_{HH} .

Tabla 4.6. Análisis de varianza del modelo cuadrático para respuesta Y_{HH} .

Fuente	Suma de cuadrados	grados de libertad	Varianza	Valor F experimental	Probabilidad
X_1	302961,03	1	302961,03	61,64	0,0005*
X_2	8278,08	1	8278,08	1,68	0,2510ns
X_3	63713,26	1	63713,26	12,96	0,0155*
X_1^2	12615,78	1	12615,78	2,57	0,1700ns
X_2^2	7632,95	1	7632,95	1,55	0,2679ns
X_3^2	22837,37	1	22837,37	4,65	0,0837ns
X_1X_2	5181,33	1	5181,33	1,05	0,3516ns
X_1X_3	36853,51	1	36853,51	7,50	0,0409*
X_2X_3	10353,65	1	10353,65	2,11	0,2064ns

X_1 : Tiempo de agitación (T), X_2 : proporción cáscara:semilla (CS), X_3 : % soluto/solvente (SS). *: Significante ($p < 0,05$) y ns: no significativo ($p > 0,05$).

Para la respuesta Y_{HH} , se obtuvo la Ecuación 4.2, la cual indica la relación causa/efecto que existe con las variables independientes (tiempo de agitación, cáscara:semilla y % soluto/solvente).

$$Y_{HH} = 575,99 + 194,60X_1 + 32,17X_2 - 89,24X_3 - 58,45X_1^2 + 45,47X_2^2 + 78,65X_3^2 - 35,99X_1X_2 - 95,99X_1X_3 - 50,88X_2X_3 \quad \text{Ecuación (4.2)}$$

Se puede observar que el coeficiente lineal del tiempo ($A_1 = +194,60$), y el coeficiente lineal del % soluto/solvente ($A_3 = -89,24$) son los mayores coeficientes en magnitudes, los cuales tienen una gran contribución en la respuesta contenido de fenoles totales (Y_{HH} , mg GAE/100g). De acuerdo a los signos positivos que acompañan al coeficiente A_1 se puede inferir que su comportamiento es directamente proporcional, es decir, a medida que aumentan el tiempo aumenta también el contenido de fenoles totales, por el contrario el signo negativo que acompaña al coeficiente A_3 indica que dentro del rango de trabajo el contenido de fenoles totales disminuye con el aumento de la fracción soluto/solvente, donde manteniendo un valor medio de proporción cáscara:semilla (1:3)

y un tiempo de extracción de 3 horas, el contenido de fenoles disminuye notablemente con el aumento del porcentaje soluto/solvente.

De las interacciones entre variables la que presentó una mayor contribución en la respuesta ($p < 0,05$) fue la interacción tiempo-soluto/solvente ($A_{13} = -95,99$).

Para ver más claramente este fenómeno, se construyó una gráfica de superficie de respuesta (Figura 4.7). En ella se observa más detalladamente el efecto de la interacción entre el tiempo-soluto/solvente (X_1X_3) y el efecto de cada una en sus componentes lineales (X_1 y X_3 respectivamente) los cuales se destacan por su alto efecto significativo sobre la respuesta.

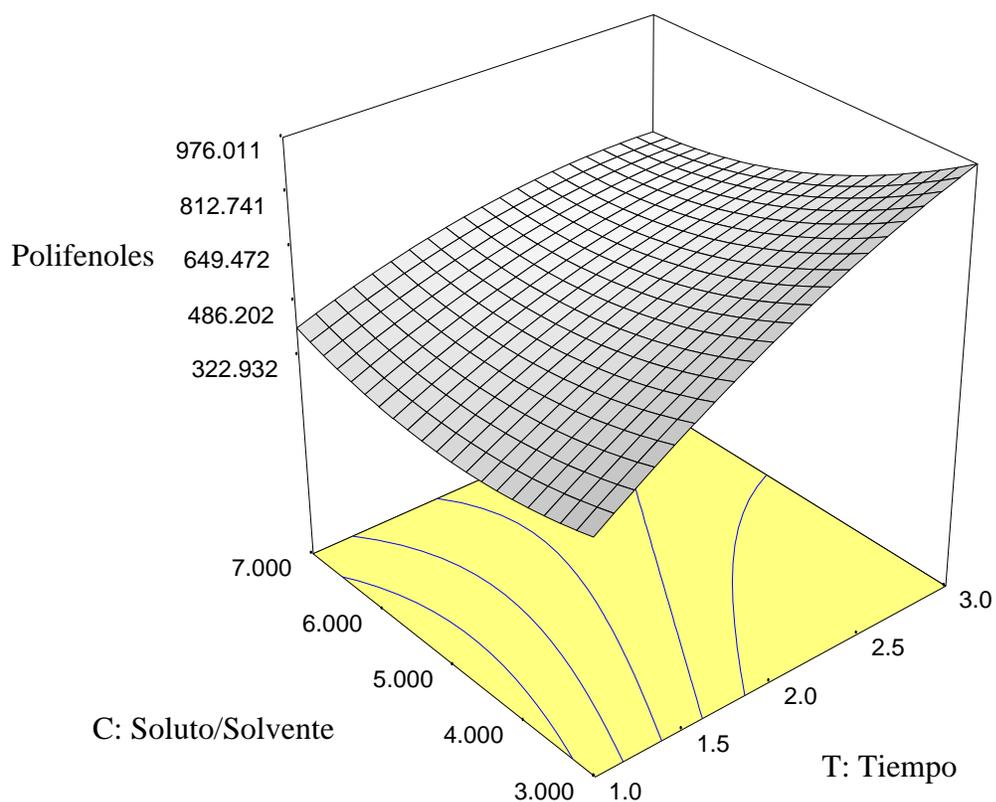


Figura 4.7. Superficie de respuesta de contenido de fenoles totales (Y_{HH}) como una función de la fracción soluto/solvente (SS) y tiempo de extracción (T), a un valor medio de cáscara:semilla (CS) de 1:3.

En la Figura 4.3 se puede observar el comportamiento de la interacción entre el tiempo y % de soluto/solvente, donde mantenido un valor medio de proporción cáscara:semilla de 1:3, un tiempo de 3 horas y aumentado % de soluto/solvente de 3 a 7 %p/v, el contenido de fenoles descendió de

976,01 a 605,55 mgEAG/100g, por ende se puede apreciar que en el mecanismo de extracción hidroalcohólica a medida que aumenta el % soluto/solvente existe una disminución en el contenido de fenoles de los extractos de cáscara y semilla de palta Hass. Este efecto se puede explicar ya que teniendo una menor cantidad de soluto y mayor cantidad de solvente en este caso 3 gramos de sustrato en 100 mL de solvente (etanol/agua 50/50), existe una mayor interacción o mayor superficie de contacto entre estos dos componentes permitiendo una mejor extracción de los polifenoles de la matriz. Por otro lado se puede observar el tiempo en su componente lineal, donde se puede observar que a medida que se incrementa el tiempo de extracción mejor es la liberación de los polifenoles de la matriz. Sin embargo los análisis previos que se realizaron demuestran que al sobrepasar las 3 h de agitación no existe un aumento significativo del contenido de fenoles totales, así mismo lo justifica la ecuación estadística, donde manteniendo las condiciones óptimas de cáscara:semilla, % soluto/solvente y aumentado las horas de extracción no existe un incremento en los fenoles, incluso a partir de las 5 h comienza a decaer su contenido, debido a la degradación de los polifenoles.

4.3. Capacidad antioxidante por el método del DPPH para las mejores condiciones seleccionadas en cada método.

Una vez determinadas las mejores condiciones de extracción de los métodos hidroalcohólico y supercrítico se estableció la capacidad antioxidante de los extractos mediante el análisis del DPPH, determinando la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}).

El IC_{50} mide la efectividad de un compuesto para inhibir una actividad biológica y/o bioquímica (Joshi et al., 2010). En este trabajo se midió la concentración de los extractos vegetales activos necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH, teniendo en cuenta que un IC_{50} bajo, está directamente asociado con una actividad antioxidante alta (Zhu et al., 2011) Se encontró un IC_{50} de $243,86 \pm 0,54$ mg EAG/100g base seca y un IC_{50} de $327,17 \pm 0,87$ mg EAG/100g base seca, para extractos obtenidos por extracción hidroalcohólica y supercrítica respectivamente.

El extracto que tiene el contenido fenólico más alto (hidroalcohólico) mostró la IC_{50} más baja demostrando la correlación positiva entre la actividad de eliminación de radicales y el contenido fenólico total. Curaqueo. (2013), presentó valores de actividad antioxidante para extractos hidroalcohólicos de semilla de palta Hass de un IC_{50} de 12,02 mg EAG/g, por otro lado

Velázquez. (2014), presentó valores de actividad antioxidante para extractos hidroalcohólicos de cáscara de palta Hass secado por liofilización de un de IC₅₀ de 70,5 mg EAG/g.

Una vez obtenida la capacidad antioxidante de las mejores condiciones se procedió a la elaboración de los hidrogeles, para su posterior caracterización.

4.4. Cálculo de la eficiencia de encapsulación

Se obtuvieron hidrogeles de alginato conteniendo extracto de cáscara y semilla de palta Hass. Se analizó la eficiencia de encapsulación de los extractos obtenidos por extracción supercrítica y extracción hidroalcohólica. Previo a la encapsulación los extractos fueron rotaevaporados, y se midió nuevamente el contenido de fenoles totales. Los resultados de eficiencia de encapsulación se presentan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Eficiencia de encapsulación para extractos obtenidos por extracción hidroalcohólica y extracción supercrítica.

Método de extracción	m_e en mgGEA/100g	m_c en mgGEA/100g	%EE
Supercrítico	1034±5,80	770,00±9,25	74,47
Hidroalcohólica	1342±8,83	1018,75±4,79	75,91

Donde, m_c : Masa de polifenoles totales encapsulados; m_e : Masa de polifenoles totales presente en el extracto en el cual se originó la formulación; %EE: Eficiencia de encapsulación.

En la Tabla 4.7 se puede observar la eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos de cáscara y semilla de palta Hass mediante la formación de hidrogeles de alginato, donde para los hidrogeles obtenidos con extractos supercríticos se obtuvo una eficiencia de un 74,47 % y para los obtenidos con extractos hidroalcohólicos se obtuvo una eficiencia de encapsulación de 75,91 %. En la encapsulación de polifenoles de pétalos de *Clitoria ternatea* los resultados mostraron que el porcentaje de eficiencia de encapsulación oscilaba entre $74,97 \pm 0,84$ y $84,83 \pm 0,40\%$ y se demostró que la eficiencia de encapsulación de los hidrogeles mejoró al aumentar la concentración de alginato de sodio, además los resultados también encontraron que la concentración de CaCl₂ no tenía ningún efecto sobre el aumento de la eficacia de la encapsulación (Pasukamonset et al., 2016). Por otro lado Belščak et al. (2011), realizaron encapsulación de compuestos fenólicos obtenidos de hierbas medicinales, mediante una mezcla de alginato-quitosano, donde se logró una alta eficiencia

de encapsulación, que varió de 80,88% para los hidrogeles obtenidos con extracto de ortiga hasta 89,39% para los de hoja de olivo.

No obstante al éxito alcanzado por diferentes investigaciones, se han encontrado variados estudios que han empleado tratamientos especiales para elevar la eficiencia de encapsulación. Entre ellos, el uso de sistemas combinados de alginato-almidón (Lupo et al., 2012).

4.4. Análisis reológico de los hidrogeles de alginato

4.4.1. Ensayos reológicos rotatorios de los hidrogeles de alginato para los distintos mecanismos de extracción

En la Figura 4.8. Se puede apreciar un comportamiento similar entre las dos muestras, donde se puede distinguir un crecimiento del esfuerzo muy rápido hasta alcanzar un valor máximo (sobreesfuerzo), para luego alcanzar un crecimiento que se va amortiguando paulatinamente y que tiende a alcanzar un valor constante. Estos tipos de fluidos no fluyen hasta que son sometidos a un esfuerzo cortante limite determinado llamando umbral de fluencia (Ramirez, 2006).

Los resultados mostraron que en todas las muestras la relación de esfuerzo cizalla versus velocidad de deformación es no lineal y que a medida que aumenta la gradiente de velocidad, los valores de esfuerzo de cizalla aumentan. Este comportamiento es típico de los fluidos que muestran un carácter no newtoniano de tipo pseudoplásticos también llamado reofluidificante con esfuerzo umbral, lo cual era de esperar, debido a otras investigaciones que encontraron similares resultados (Lupo et al., 2015)

Como se aprecia en la gráfica los hidrogeles obtenidos por extracción hidroalcohólica necesitan un mayor esfuerzo de cizalla, es decir necesitan un mayor esfuerzo cortante para que el fluido se coloque en movimiento en comparación con los resultados obtenidos en hidrogeles de extractos supercríticos, este efecto puede ser atribuido a una mayor cantidad de compuestos fenólicos de los extractos hidroalcohólicos presentes en la matriz polimérica lo cual produce una mayor interacción de éstos con el alginato mediante puente de hidrógeno, lo que permite un aumento de la tensión interfacial entre acuoso y fase orgánica (Goh et al., 2012 y Mane et al., 2015) disminuyendo la permeabilidad de la cápsula (Anbinder et al., 2011) y aumenta la rigidez, por ende es necesario un mayor esfuerzo de cizalla. Según Lee et al, (2015), el gel se vuelve menos permeable con el aumento de la rigidez. Por otro lado, los hidrogeles obtenidos con extractos supercríticos al tener menor cantidad de polifenoles en la matriz, existe un mayor cantidad de agua en las cápsulas, según los resultados obtenidos por Anbinder, et al (2011), en la encapsulación de polifenoles de hierba

mate con alginato, este último al ser hidrofílico es más afín con el agua lo que produce una mayor permeabilidad de los hidrogeles. Por lo tanto los hace en este caso menos resistentes al esfuerzo de cizalla.

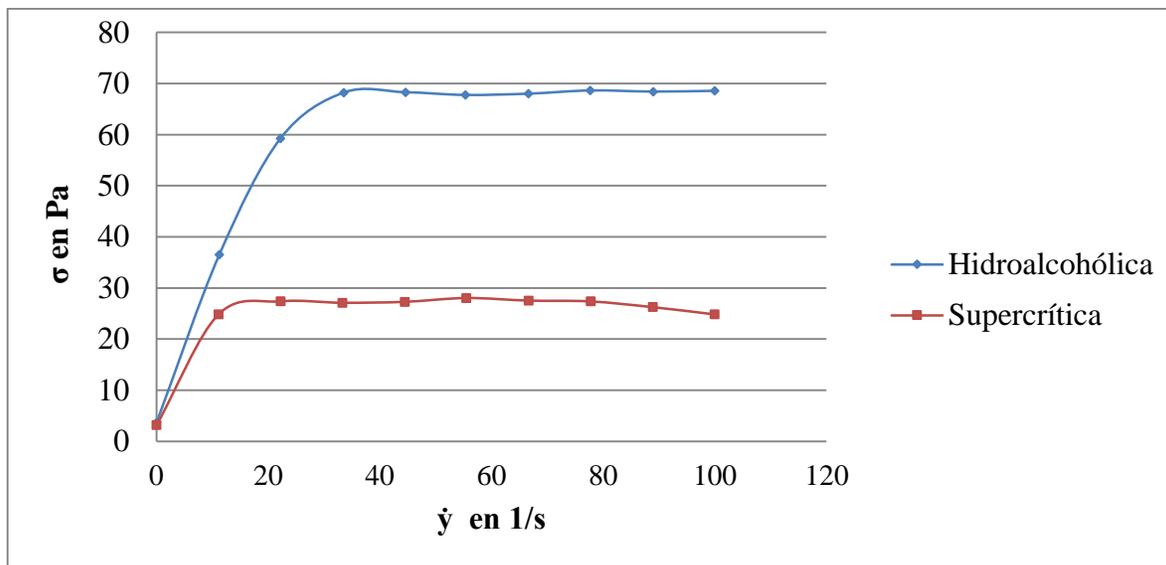


Figura 4.8. Curva de fluidez en ensayos rotatorios para hidrogeles de alginato mezclados con extractos polifenólicos.

4.4.1.1. Viscosidad aparente

La viscosidad es la característica principal de las soluciones de alginato y junto a su reactividad frente a los cationes polivalentes, es la que genera características como espesante, estabilizante y gelificante. Con el fin de preparar soluciones efectivas de alginato, es necesario dispersar y disolver completamente las partículas de alginato en el sistema, lo que puede lograrse mediante la adición lenta y progresiva del polímero durante un mezclado con alta cizalladura (Imeson, 2010).

En la Figura 4.9, se muestra la curva de viscosidad aparente para ambos métodos de extracción, donde se puede observar un comportamiento similar, en el cual se puede visualizar que en todos puntos la viscosidad desciende drásticamente en la medida en que la gradiente de velocidad aumenta, lo cual es confirmado por Calvo, (2004). El comportamiento observado corrobora los resultados obtenidos para la influencia sobre el esfuerzo cortante mostrando un comportamiento de tipo pseudoplástico.

Este comportamiento es una consecuencia de las largas cadenas de polímero y la rigidez de las moléculas hidratadas. A bajas velocidades de cizalla, como por ejemplo durante el almacenamiento

o muy baja velocidad de agitación, las moléculas de alginato se encuentran distribuidas al azar debido al movimiento browniano. Al aumentar la velocidad de cizallamiento, las moléculas comienzan a ubicarse en forma paralela ordenándose en la dirección del flujo y disminuyendo, por tanto, la resistencia al fluir. Como resultado, la viscosidad aparente disminuirá cuando la velocidad de cizallamiento se incrementa más allá de la zona newtoniana primaria del sistema (Imeson, 2010). Por consiguiente, los hidrogeles de alginato tienen un comportamiento no newtoniano de tipo pseudoplástico, es decir, que la viscosidad decrece al aumentar el gradiente de velocidad.

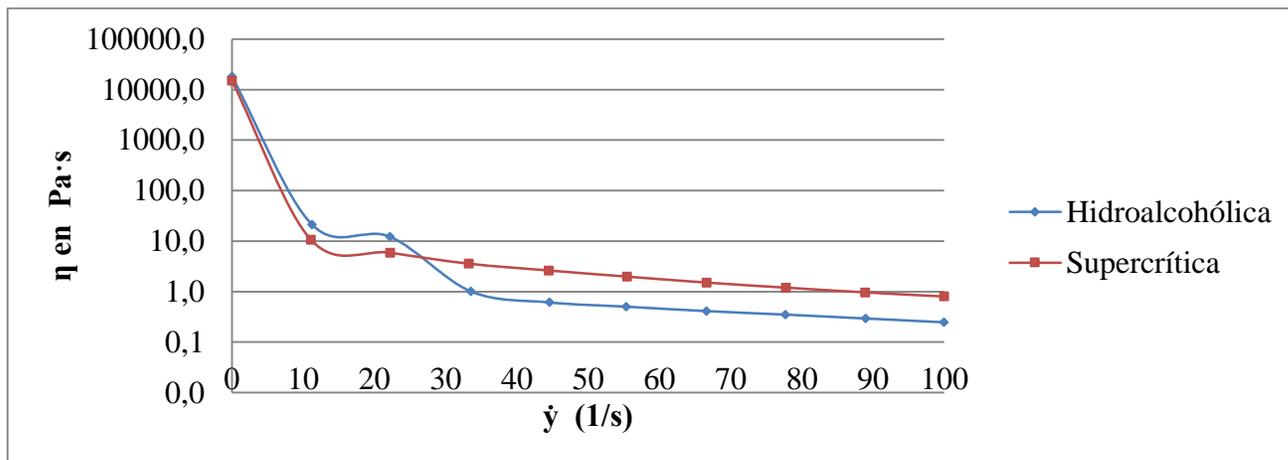


Figura 4.9. Viscosidad aparente de los hidrogeles de alginato.

4.4.1.2. Modelación del comportamiento reológico.

Luego de construir las Figuras 4.8 y 4.9 se analizan las curvas obtenidas en los ensayos reológicos estacionarios mediante las expresiones matemáticas que se utilizan corrientemente en el estudio de la reología. Se ajustaron los diferentes modelos (Anexo C, Tabla C-4), y el que mejor representó el conjunto de datos experimentales fue el modelo de Herschel-Bulkley, el que se observa en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Rangos de los parámetros estadísticos del modelo Herschel-Bulkley para hidrogeles de alginato con extractos hidroalcohólicos y supercríticos.

Hidroalcohólico	Supercrítico
$R^2= 0,999$	$R^2= 0,999$
$Chi^2=1,141E+10$	$Chi^2=2,460E+6$

La Tabla 4.7 muestra los dos parámetros estadísticos determinados (χ^2 y R^2) para la validación de los cuatro modelos reológicos utilizados en este estudio. Los modelos de Bingham, Ostwald de

Waele, Casson y Herschel-Bulkley fueron los más adecuados, siendo el modelo de Herschel-Bulkley ($\sigma = \sigma_0 + k\dot{\gamma}^n$) el que mejor describió el comportamiento del flujo de hidrogeles de alginato en los dos casos. Otras investigaciones sobre las mermeladas de fresa y albaricoque también mostraron que el comportamiento de flujo puede ser descrito por el modelo de Herschel - Bulkley (Costell et al., 1987; Villarroel y Costell, 1989).

4.4.2. Ensayos reológicos dinámico de los hidrogeles de alginato para los distintos mecanismos de extracción

4.4.2.1. Barrido de deformación

Para establecer la región lineal de los hidrogeles se realizaron barridos de deformación, éste permitió determinar el rango lineal, donde las propiedades viscoelásticas de las muestras son independientes de la deformación (Rodríguez, 2002).

En las Figura 4.10 y 4.11. Se observan los módulos G' y G'' en función de la deformación relativa para las muestras obtenidas por extracción supercrítica y por extracción hidroalcohólica respectivamente, en función de la deformación relativa (0,01 a 100) para ambas muestras. Se analizaron las zonas donde los módulos de almacenamiento y pérdida presentan comportamiento constante frente a las variaciones de deformación, lo que asegura que no existan cambios estructurales durante las mediciones (Steffe, 1996). Lo que demostró que, en el rango de 0,01 a 0,1% de deformación se presenta un comportamiento lineal para las dos muestras.

Por otro lado se define como punto de gel al tiempo al cual se produce el cruce entre G' y G'' ($G' = G''$) (Pilosof, 2000). Se puede observar que el punto de gel o cruce entre los módulos (G' y G'') de los hidrogeles con extractos hidroalcohólicos se produce a los 661, 44 Pa, por otro lado en los hidrogeles con extractos supercríticos se obtiene a un punto de cruce a los 465,37 Pa. Este lugar de cruce indica que a medida que aumentó la deformación el gel se fue destruyendo llegando al punto de gel, donde la estructura comenzó a comportarse como líquido.

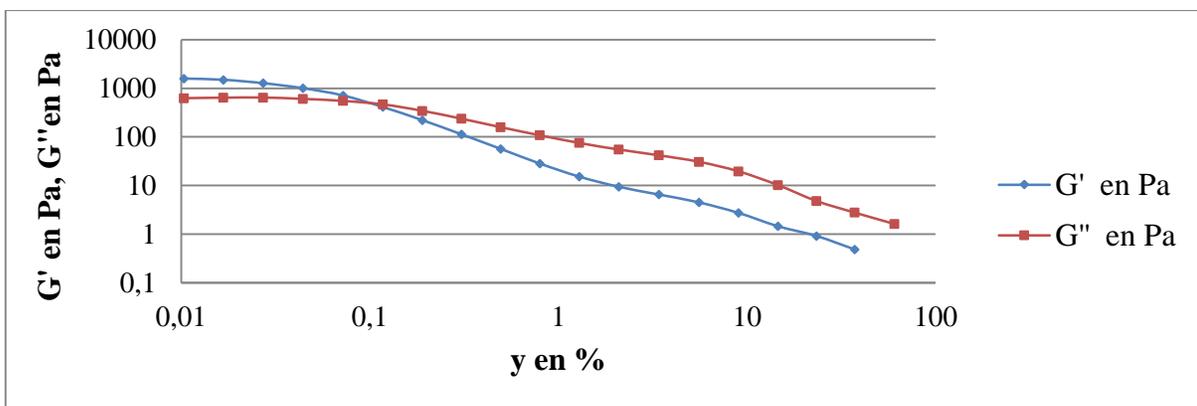


Figura 4.10. Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función de la deformación relativa para los hidrogel elaborados con extracto Supercríticos.

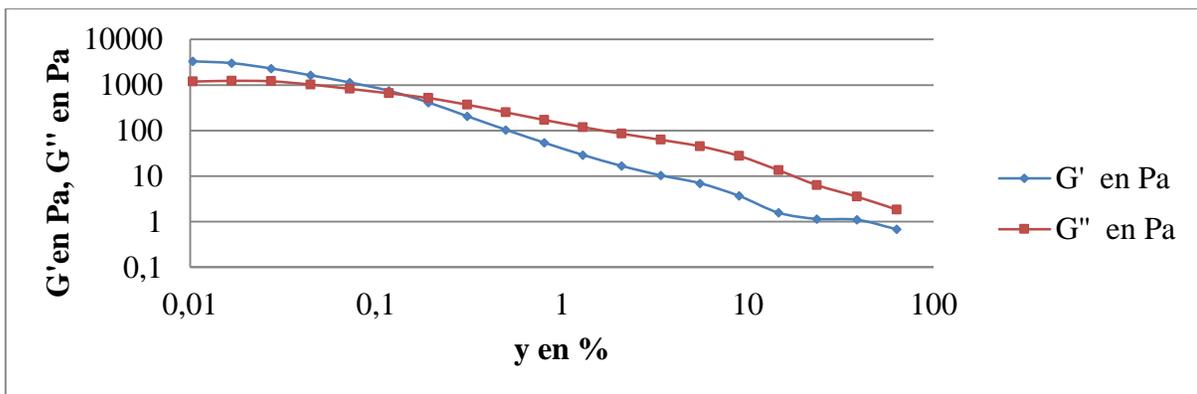


Figura 4.11. Módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función de la deformación relativa para los hidrogel elaborados con extracto Hidroalcohólico.

4.4.2.1.1. Visualización de la zona lineal viscoelástica

Una vez determinado la región lineal viscoelástica, se determinó que el porcentaje de deformación a utilizar para los hidrogel con extractos supercríticos es de 0,0171 % y para los hidrogel con extractos hidroalcohólicos fue de 0,0182 %, lo que puede ser observado en las Figuras 4.12 y 4.13. De los barridos de deformación se pudo fijar las condiciones a utilizar en los siguientes barridos.

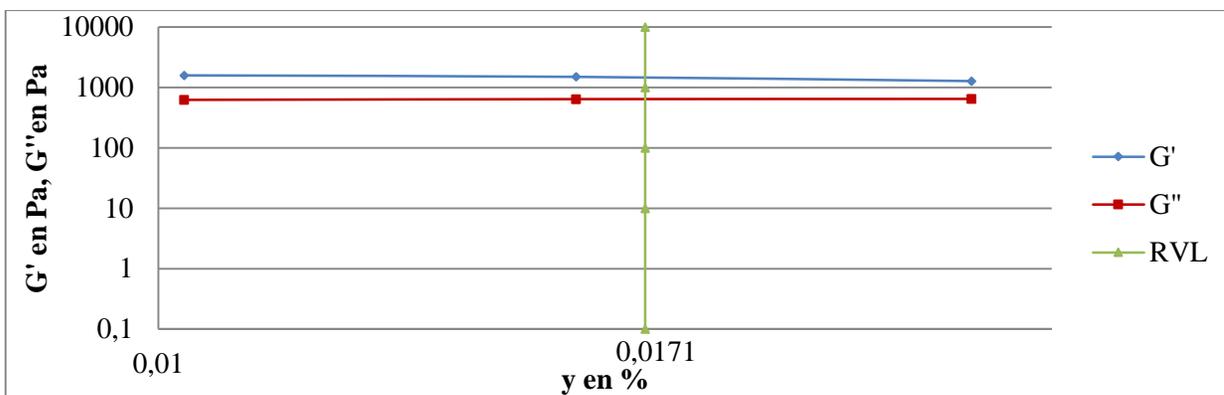


Figura 4.12. Amplificación de la zona lineal viscoelástica del barrido de deformación relativa para los hidrogeles elaborados con extractos supercríticos.

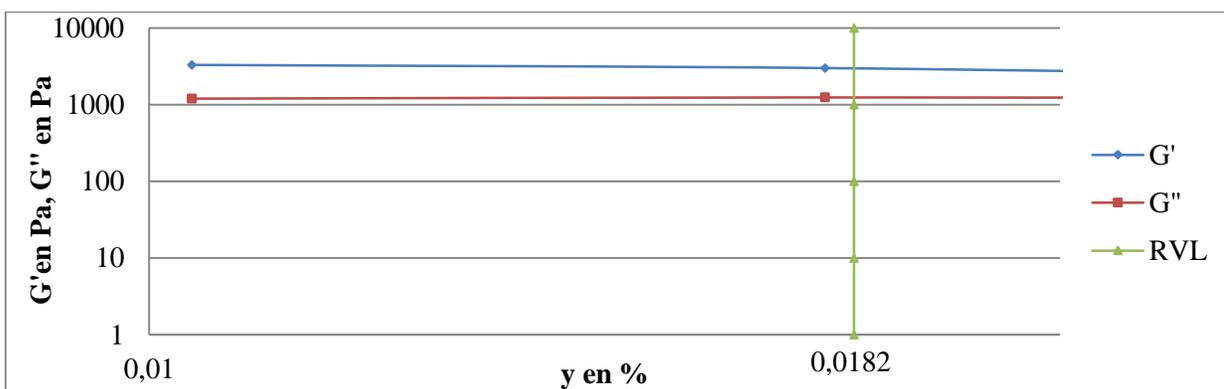


Figura 4.13. Amplificación de la zona lineal viscoelástica del barrido de deformación relativa para los hidrogeles elaborados con extractos hidroalcohólicos.

4.4.2.2. Barrido de frecuencia

Para determinar las características viscoelásticas de los hidrogeles se utilizó un rango de frecuencia de 1 a 100 Hz.

Las Figuras 4.14 y 4.15. Muestran los valores de módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'').

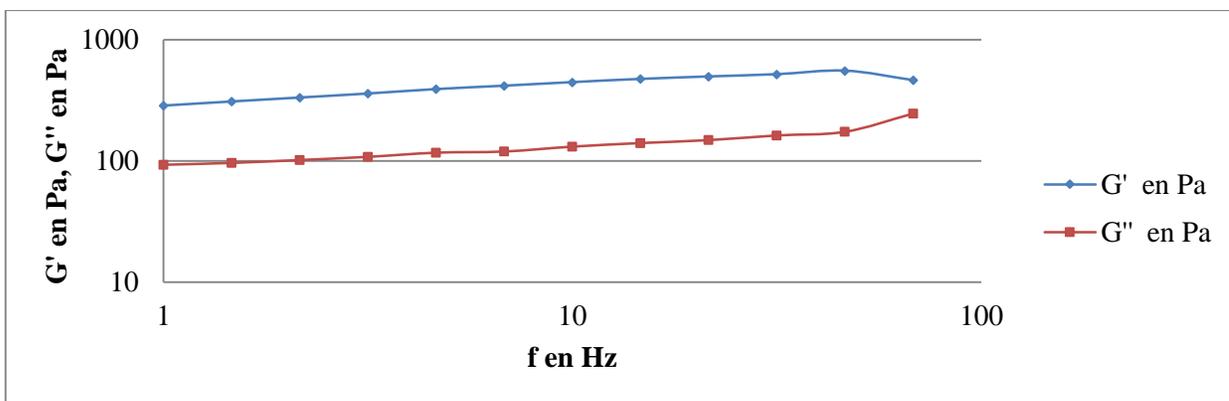


Figura 4.14. Barrido de frecuencia hidogeles con extractos supercríticos.

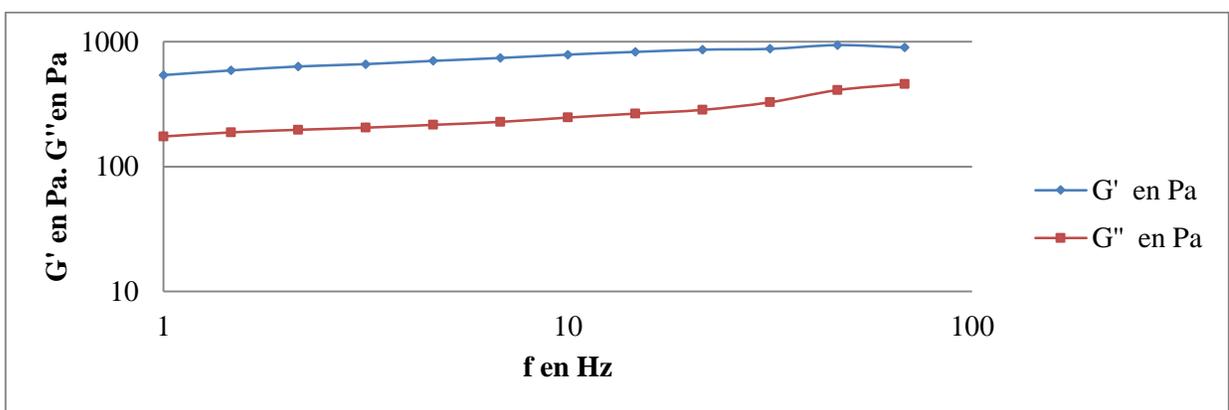


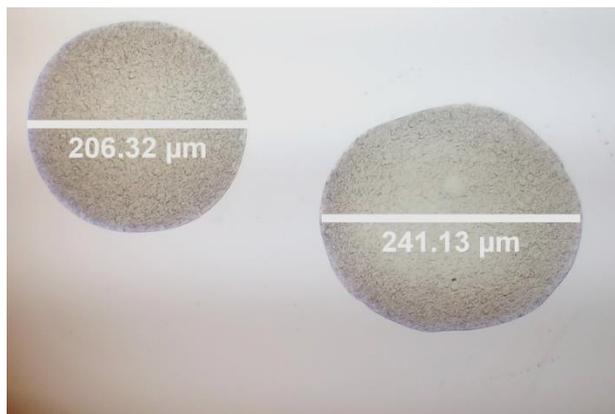
Figura 4.15. Barrido de frecuencia hidogeles con extractos hidroalcohólicos.

Como se puede ver en las Figuras 4.14 y 4.15. Las dos muestras exhibieron un comportamiento viscoelástico con valores de G' superiores a los valores de G'' a lo largo de todo el intervalo de frecuencia predominando el comportamiento elástico, otorgándole la característica de firmeza a los hidogeles (Steffe, 1996), lo que indica que ocurrió la transición de fase de comportamiento líquido a sólido. De hecho, existe un orden de magnitud que separa G' y G'' una vez que se produce la gelificación, lo cual confirma esta hipótesis, este fenómeno es característico de los alginatos (Mancini et al., 1999). Este resultado es muy similar al que arrojo en el estudio realizado por Mun et al. (2009) sobre la viscoelasticidad de la mayonesa.

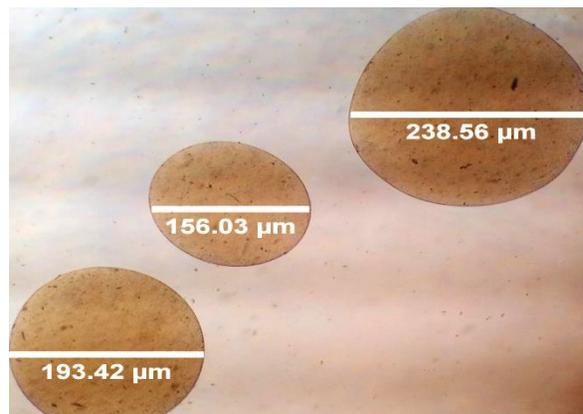
Por otro lado, dado el comportamiento en el que los módulos alcanzan meseta con barrido de frecuencia, se puede predecir una alta estabilidad del gel, la presencia de esta meseta o "plateau" es más patente en polímeros de alto peso molecular, y según algunos autores está relacionada con el enmarañamiento o entrelazamientos entre cadenas poliméricas (García, 2008).

4.5. Análisis microscópico

(Figura 4.16)



(Figura 4.17)



Fotografías obtenidas mediante microscopía óptica de hidrogeles o microesferas de alginato elaboradas con extractos supercríticos mediante una boquilla de 250 μm (Figura 4.16). Fotografías obtenidas mediante microscopía óptica de hidrogeles o microesferas de alginato elaboradas con extractos hidroalcohólicos mediante una boquilla de 250 μm (Figura 4.17).

El método de extrusión es una técnica eficaz para producir hidrogeles de diámetro deseado y aparece como esferas regulares de un tamaño uniforme (Manojlovic et al., 2008). El tamaño y la forma de las esferas son controlados por muchos factores tales como el diámetro de la aguja, la distancia entre la aguja y la solución colectora y la tensión superficial (Lee, Ravindra y Chan, 2013).

Según las Figuras 4.16 y 4.17. En ambos casos el aspecto es esférico. Sin embargo, las microesferas preparadas con extractos supercríticos muestran una superficie más rugosa con bordes irregulares y un promedio de diámetro de partícula de $235,33 \pm 2,4 \mu\text{m}$, por otro lado las microesferas obtenidas con extractos hidroalcohólicos muestran una superficie más lisa con bordes definidos y un promedio de diámetro de partícula de $194,33 \pm 2,8 \mu\text{m}$. Esta diferencia puede deberse a que según El-Kamel et al, (2010), de acuerdo al tamaño de las microesferas, los polifenoles pueden establecer extensas uniones de hidrógeno (a través de grupos hidrófilos fenólicos hidroxilo) con alginato polielectrolito, lo que permite un aumento de la tensión interfacial entre acuoso y fase orgánica, lo que conduce a disminuir el tamaño de los hidrogeles (Goh et al., 2012 y Mane et al., 2015).

4.6. Calorimetría diferencial de barrido

El comportamiento térmico de las microcápsulas se muestra en las Fig. 4.18 y 4.19, los termogramas indican que alrededor de los 56 °C y los 60°C, para los hidrogeles con extractos supercríticos e hidrogeles con extractos hidroalcohólicos, respectivamente, se produce el primer pico endotérmico que evidencia una deshidratación del polímero (Rajendran y Basu, 2009). Posteriormente se encontró en los dos termogramas el segundo pico correspondiente a un comportamiento exotérmico a los 220 °C y los 210 °C, para los hidrogeles con extractos supercríticos e hidrogeles con extractos hidroalcohólicos, respectivamente, lo cual está atribuido a la descomposición de la estructura molecular del biopolímero (Cozic et al., 2009), mismos resultados fueron encontrados por Belščak et al, (2011), en la encapsulación con alginato de extractos polifenólicos de diente de león. También, Stoica et al, (2013), encapsularon polifenoles en hidrogeles de alginato, los cuales encontraron un pico de deshidratación endotérmica a los 89 °C y un pico de degradación exotérmica a los 252 °C.

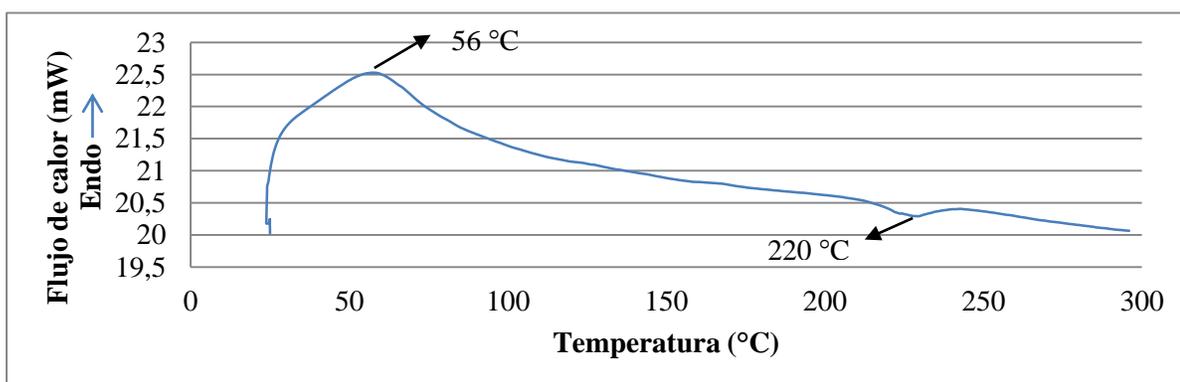


Figura 4.18. Termograma DSC de hidrogeles de alginato con extractos supercríticos.

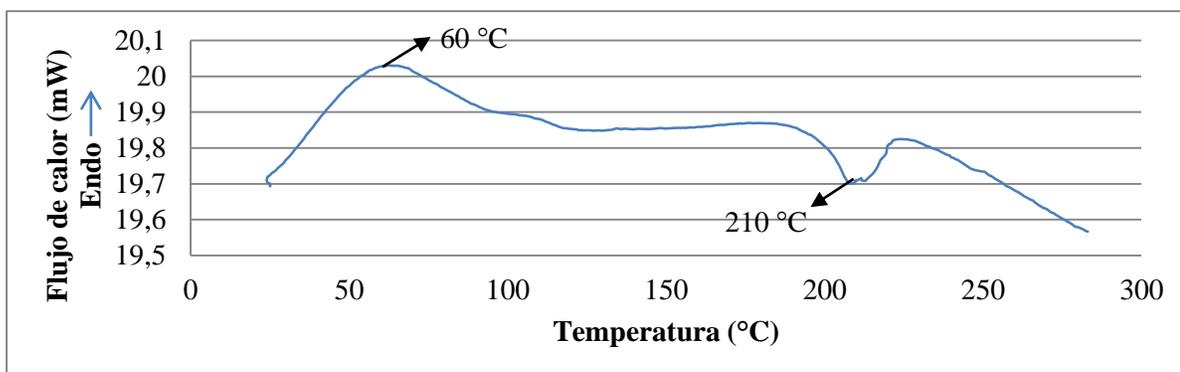


Figura 4.19. Termograma DSC de hidrogeles de alginato con extractos hidroalcohólicos.

Capítulo 5: Conclusiones

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Los compuestos fenólicos de palta Hass son fuentes naturales importantes de sustancias bioactivas y el método de extracción con CO₂ supercrítico con etanol como co-solvente, es un método innovador, limpio y eficiente para la obtención de extractos residuos de palta Hass, además se puede presentar este método como innovador para la industria ya que se obtienen extractos libres de residuos tóxicos.

Las mejor condiciones de extracción de polifenoles con el método supercrítico fueron de 400 bar, una proporción de cáscara:semilla de 1:3 y 6% co-solvente dando contenido de fenoles de 726,24mg EAG/100g de muestra seca, por otro lado, con el método hidroalcohólico las mejores condiciones para la obtención de polifenoles fueron de 3 horas de agitación, una proporción de cáscara:semilla de 1:3 y 3% p/v de soluto/solvente dando contenido de fenoles de 987,12 mg EAG/100g de muestra seca.

De acuerdo al análisis reológico los hidrogeles obtenidos con extractos hidroalcohólica necesitan un mayor esfuerzo de cizalla que los obtenidos por extractos supercríticos, por otro lado las dos muestras de hidrogeles exhibieron un comportamiento viscoelástico con valores de G' superiores a los valores de G'' a lo largo de todo el intervalo de frecuencia predominando el comportamiento elástico.

De acuerdo al comportamiento térmico de los hidrogeles, alrededor de los 60°C y los 56 °C se produce el primer pico endotérmico; el segundo pico correspondiente a un comportamiento exotérmico es a los 210 °C y los 220 °C, para los hidrogeles obtenidos con extractos hidroalcohólicos y con extractos supercríticos, respectivamente.

Para futuras investigaciones se puede utilizar la aplicación de estos encapsulados en formulaciones de alimentos, lo cual podría proporcionar ventajas para la preservación de sustancias dispuestas a la oxidación o susceptibles a contaminación microbiana.

Anexos

6. Anexos

Anexo A. Caracterización física de sustrato.

Tabla A-1. Contenido de humedad de la cáscara.

Réplicas	Peso cápsula vacía	Peso muestra húmeda	Peso cápsula + muestra seca	Peso muestra seca	Contenido de humedad
	(g)	(g)	(g)	(g)	
1	32,005	1,009	32,579	0,574	0,756
2	32,056	1,003	32,623	0,567	0,767
3	31,702	1,006	32,274	0,572	0,759
					76,10 ± 0,57

Tabla A-2. Contenido de humedad de la semilla.

Réplicas	Peso cápsula vacía	Peso muestra húmeda	Peso cápsula + muestra seca	Peso muestra seca	Contenido de humedad
	(g)	(g)	(g)	(g)	
1	32,026	1,009	32,620	0,594	0,697
2	32,060	1,003	32,651	0,591	0,696
3	31,709	1,002	32,300	0,591	0,697
					69,67 ± 0,06

Tabla A-3. Densidad aparente de la cáscara

Réplicas	Peso muestra	Volumen	Densidad	Densidad
	(g)	(mL)	g/mL	kg/m³
1	20,100	50	0,402	402,00
2	20,130	50	0,403	402,60
3	20,150	50	0,403	403,00
				402,53±0,50

Tabla A-4. Densidad aparente de la semilla

Réplicas	Peso muestra	Volumen	Densidad	Densidad
	(g)	(mL)	g/mL	kg/m³
1	20,142	50	0,4028	402,84
2	20,129	50	0,4026	402,58
3	20,157	50	0,4031	403,14
				402,85±0,28

Tabla A-5. Determinación del tamaño de partícula de cáscara molida y secada por lecho fluidizado

Serie de tamices	Diámetro de Abertura de malla	Diámetro abertura de malla real (dpi)	Masa retenida	Fracción de masa ($\Delta\phi_i$)	Diámetro medio (Dm)	Df _{i m} ($\Delta\phi_i * D_m$)	Fracción de masa acumulada f	% de retención
	mm	mm	g		mm	mm	g	%
2,36	<3,5 dp > 2,36	2,93	7,052	0,068	2,930	0,200	0,068	6,81
1,68	<2,36 dp > 1,68	2,02	22,026	0,213	2,475	0,527	0,281	21,28
1,19	<1,68 dp > 1,19	1,435	25,913	0,250	1,728	0,432	0,531	25,03
0,841	<1,19 dp > 0,841	1,0155	22,799	0,220	1,225	0,270	0,751	22,02
0,595	<0,841 dp > 0,595	0,718	12,260	0,118	0,867	0,103	1,120	11,84
0,3	<0,595 dp > 0,30	0,4475	12,009	0,116	0,583	0,068	0,986	11,60
0,149	<0,30 dp > 0,149	0,2245	1,088	0,011	0,336	0,004	0,996	1,05
0	<0,149 dp > 0	0,0745	0,373	0,004	0,150	0,001	1,000	0,36
			103,520	1	1,603			100

Tabla A-6. Determinación del tamaño de partícula de semilla molida y secada por lecho fluidizado

Serie de tamices	Diámetro de Abertura de malla	Diámetro abertura de malla real (dpi)	Masa retenida	Fracción de masa ($\Delta\phi_i$)	Diámetro medio (Dm)	Dfi m ($\Delta\phi_i * Dm$)	Fracción de masa acumulada f	% de retención
	mm	mm	g		mm	mm	g	%
2,36	<3,5 dp > 2,36	2,93	3,1806	0,022	2,930	0,065	0,022	2,219
1,68	<2,36 dp > 1,68	2,02	16,528	0,115	2,475	0,285	0,138	11,531
1,19	<1,68 dp > 1,19	1,435	45,3728	0,317	1,728	0,547	0,454	31,655
0,841	<1,19 dp > 0,841	1,0155	34,4027	0,240	1,225	0,294	0,694	24,002
0,595	<0,841 dp > 0,595	0,718	22,1558	0,155	0,867	0,134	1,165	15,457
0,3	<0,595 dp > 0,30	0,4475	17,7995	0,124	0,583	0,072	0,973	12,418
0,149	<0,30 dp > 0,149	0,2245	1,5124	0,011	0,336	0,004	0,983	1,055
0	<0,149 dp > 0	0,0745	2,383	0,017	0,150	0,002	1,000	1,663
			143,335	1		1,404		100

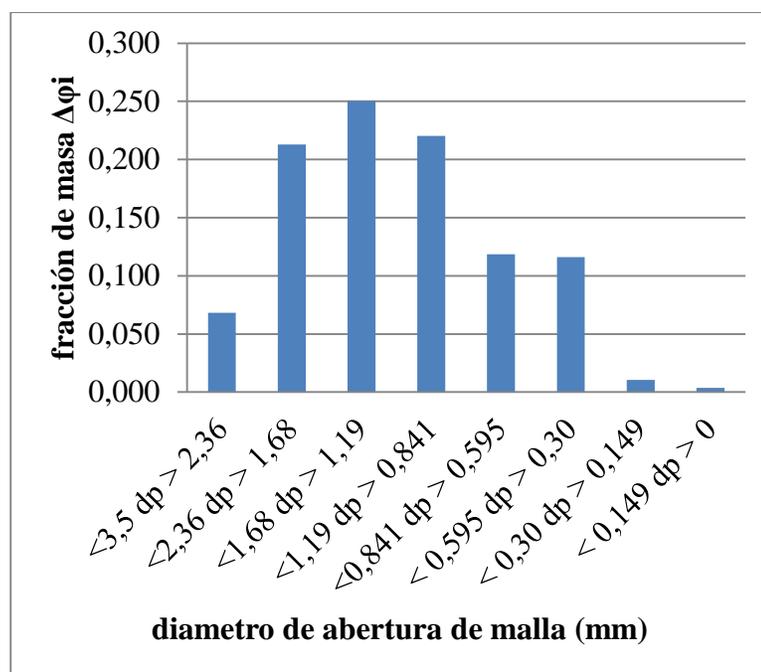


Figura A-1. Distribución del tamaño partícula obtenido del tamizado de muestra de cáscara de palta Hass.

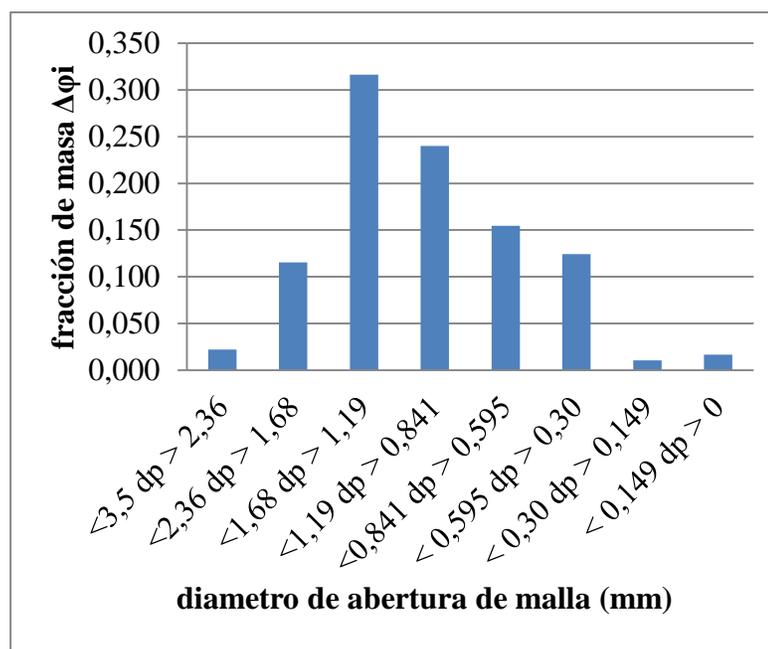


Figura A-2. Distribución del tamaño partícula obtenido del tamizado de muestra de semilla de palta Hass.

Anexo B: Análisis estadístico

Tabla B-1. Valores actuales y predichos para las respuestas contenido de fenoles totales (Y_{SC}).

Tabla B-2. Valores actuales y predichos para las respuestas contenido de fenoles totales (Y_{HH}).

Tabla B-1			Tabla B-2		
Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Standard Order	Actual Value	Predicted Value
1	81,83	82,67	1	262,20	270,28
2	272,72	271,01	2	537,96	533,91
3	95,55	97,25	3	476,25	480,30
4	308,01	307,17	4	505,65	497,57
5	47,44	45,87	5	478,05	490,63
6	213,71	214,68	6	485,15	509,87
7	179,25	178,27	7	347,82	323,11
8	406,15	407,72	8	597,34	584,76
9	107,23	107,96	9	523,16	502,51
10	135,97	135,84	10	670,90	654,28
11	273,06	273,20	11	504,50	521,13
12	296,78	296,05	12	522,38	543,04
13	136,53	135,89	13	544,10	561,47
14	135,76	135,89	14	575,80	561,47
15	135,37	135,89	15	564,51	561,47

Anexo C. Datos comportamiento reológico de los hidrogeles

Tabla C-1. Análisis Rotatorio y viscosidad

Hidroalcohólica			Supercrítica		
$\dot{\gamma}$ en 1/s	σ en Pa	η en Pa·s	$\dot{\gamma}$ en 1/s	σ en Pa	η en Pa·s
0,0017	3,15	15003,08	0,0002	3,62	18060,68
11,10	24,79	10,54	11,25	36,50	21,23
22,22	27,35	5,87	22,19	59,22	12,23
33,29	27,08	3,56	33,53	68,23	1,01
44,48	27,26	2,61	44,58	68,29	0,61
55,50	28,00	1,97	55,34	67,75	0,50
66,66	27,50	1,50	66,62	68,01	0,41
77,76	27,34	1,19	77,70	68,63	0,35
88,91	26,21	0,96	88,95	68,42	0,29
99,98	24,80	0,80	99,95	68,56	0,25

Tabla C-2. Barrido de deformación

Hidroalcohólica			Supercrítica		
$\dot{\gamma}$ en %	G' en Pa	G'' en Pa	$\dot{\gamma}$ en %	G' en Pa	G'' en Pa
0,01	3289,87	1197,62	0,01	1593,32	624,18
0,02	2995,15	1243,65	0,02	1505,15	639,05
0,03	2289,74	1214,64	0,03	1280,46	643,70
0,04	1622,52	1031,06	0,04	1009,28	603,50
0,07	1130,40	828,13	0,07	716,05	549,33
0,12	739,71	661,08	0,12	414,34	465,37
0,19	411,97	520,97	0,19	221,94	343,44
0,31	205,45	372,22	0,31	113,48	236,24
0,50	103,63	252,92	0,49	56,96	158,19
0,80	53,89	172,07	0,80	28,38	107,88
1,30	29,08	119,79	1,29	15,28	74,99

2,10	16,67	85,82	2,09	9,42	54,88
3,40	10,37	63,18	3,41	6,53	41,81
5,53	6,96	45,38	5,56	4,51	30,78
9,00	3,66	27,82	9,01	2,74	19,60
14,62	1,58	13,57	14,59	1,46	10,22
23,52	1,15	6,40	23,39	0,92	4,80
38,66	1,10	3,55	37,31	0,49	2,77
63,21	0,68	1,86	60,62	0,04	1,62
102,33	0,36	1,08	101,03	0,18	0,82

Tabla C-3. Barrido de frecuencia

Hidroalcohólica			Supercrítica		
f en Hz	G' en Pa	G'' en Pa	f en Hz	G' en Pa	G'' en Pa
1,00	541,24	174,44	1,00	541,24	174,44
1,47	590,13	188,21	1,47	590,13	188,21
2,15	634,88	197,45	2,15	634,88	197,45
3,16	662,93	205,37	3,16	662,93	205,37
4,64	704,04	216,32	4,64	704,04	216,32
6,81	742,72	228,53	6,81	742,72	228,53
10,00	790,27	247,49	10,00	790,27	247,49
14,68	831,05	266,27	14,68	831,05	266,27
21,54	866,33	285,44	21,54	866,33	285,44
31,62	878,90	328,44	31,62	878,90	328,44
46,42	942,18	411,36	46,42	942,18	411,36
68,13	901,83	460,67	68,13	901,83	460,67
100,00	662,28	840,33	100,00	662,28	840,33

Tabla C-4. Rangos de los parámetros estadísticos de los modelos reológicos determinados para la curva de flujos de hidrogeles de alginato con extractos hidroalcohólicos y supercríticos.

Extracto	Parámetro estadístico	<i>Bingham</i>	<i>Ostwald</i>	<i>Casson</i>	<i>Herschel-Bulkley</i>
Hidroalcohólico	R ²	0,4978	0,7702	0,5796	0,999
	Chi ²	1,714E+15	9,267E+14	1,52E+15	1,520E+10
Supercrítico	R ²	0,9855	0,8550	0,9117	0,999
	Chi ²	9,797E+10	3,100E+8	5,606E+10	2,460E+10

Anexo D. Composición fenólica de extractos hidroalcohólicos de residuos de palta Hass.

Tabla D-1. Tabla de composición fenólica de extractos de cáscara de palta Hass.

Polaridad positiva					
Peak	Tr (min)	Identificación	Peak	Tr (min)	Identificación
3	2,8	Proantocianidina trímero A	14	14,3	Fragmento de proantocianidina
		Proantocianidina trímero A			Quercetina
		Fragmento de procantocianidina dímero A			Delfinidina
4	8,1	Luteolina-O-glucósido	15	15,7	Proantocianidina trímero A
		Cianidina-O-glucósido			Quercetina
		Canferol-O-glucósido			Delfinidina
		8-C-glicosil-7-O-metil-aloesol	16	15,4	Proantocianidina trímero A
5	8,8	Proantociandina dímero A			Proantocianidina dímero A
		Fragmento de ácido cafeico			Pentahidroxi flavona-O-glucurónido
7	9,7	Fragmento de ácido cafeico			Quercetina-O-glucurónido
		Ácido cafeoilquínico ([M+Na] ⁺)			Delfinidina-O-glucurónido
		Ácido cafeoilquínico ([M+H] ⁺)			Fragmento de proantocianidina dímero A
9	10,4	Proantocianidina trímero A			Fragmento de proantocianidina dímero A
		Proantocianidina dímero A			Quercetina
		Ácido cafeoilquínico+Na			Delfinidina

		Ácido cafeoilquínico	17	16,3	Proantocianidina trímero A
		Quercetina			Proantocianidina dímero A
		Delfinidina			Fragmento de proantocianidina dímero A
10	11,1	Fragmento de ácido cafeico Proantocianidina dímero A (Epi)catequina	18	17,1	Canferol Luteolina Proantocianidina trímero A
11	11,8	Fragmento de ácido cafeico Proantocianidina trímero A Proantocianidina trímero A Fragmento de procantocianidina dímero A			Proantocianidina dímero A Cianidina-3-O-glucurónido Peonidina-O-glucósido Fragmento de proantocianidina trímero A
12	12,4	Quercetina Delfinidina Proantocianidina dímero A Quercetina-O-galactósido	20	18,9	Isoramnetina Ramnetina Tamarixteína Proantocianidina trímero A
		Quercetina-O-galactósido Delfinidina-O-glucósido Delfinidina-O-galactósido (Epi)catequina			Proantocianidina dímero A Proantocianidina dímero A Ramnetina Tamarixteína
13	13,6	Proantocianidina trímero A	21	20,1	Proantocianidina dímero A
		Quercetina Delfinidina			

Polaridad negativa

Peak	Tr (min)	Identificación	Peak	Tr (min)	Identificación
1	1,9	Derivado de ácido quínico	15	14,7	Quercetina-glucósido-ramnósido
4	8,1	Ácido quínico (epi)catequina Ácido quínico			Quercetina-O-glucósido Ácido elágico hexósido
5	8,8	Ácido cafeoilquínico ([2M-H]-) Ácido cafeoilquínico ([M-H]-)	16	15,4	Procianidina trímero A Quercetina-O-diglucósido
6	9,1	(epi)catequina			Quercetina-glucósido-ramnósido
7	9,7	(epi)catequina			Procianidina dímero A

		Ácido quínico			Fragmento de procianidina trímero A
8	10,1	Ácido cafeoilquínico ([2M-H]-)			4-metoxi-2,3,7-trihidroxi-isoflavanona glucurónido
		Ácido cafeoilquínico ([M-H]-)			Quercetina-O-glucurónido
9	10,4	Ácido 5-O-cafeoilquínico ([2M-H]-)			Quercetina-O-glucósido
		(epi)catequina			Ácido elágico hexósido
		Ácido quínico	17	16,4	Procianidina trímero A
11	11,8	Quercetina-O-dihexósido			Procianidina dímero A
		Quercetina-O-diglucósido			Fragmento de procianidina trímero A
		Quercetina-3-O-galactósido-7-O-glucósido			Quercetina-O-acetilhexósido
		Procianidina dímero A			Acetil-quercetina-O-glucósido (Quercetina-O-acetilglucósido)
		Ácido cafeoilquínico			Acetil-quercetina-O-galactósido (Quercetina-O-acetilgalactósido)
		(epi)catequina	18	17,1	Procianidina trímero A
		Ácido quínico			Procianidina dímero A
12	12,4	Proantocianidina trímero A			Fragmento de procianidina trímero A
		Dihidrocanferol-hexósido			5,7-dihidroxi-2,4-dimetoxiisoflavanona glucurónido
13	13,6	Quercetina-O-dihexósido			Metilquercetina-O-glucurónido
		Quercetina-O-diglucósido			Isoramnetina-O-glucurónido
		Quercetina-3-O-galactósido-7-O-glucósido			4-metoxi-2,3,7-trihidroxiisoflavanona glucurónido
		Canferol-O-cafeoilhexósido			Quercetina-O-glucurónido
		Procianidina dímero A			Dimetoxiflavanona
		Ácido rosmarínico-O-hexósido	19	18,1	Procianidina trímero A
		Quercetina-3,6,3'-trimetil-7-O-glucósido			Procianidina dímero A
14	14,4	Procianidina trímero A			Fragmento de procianidina trímero A
		Procianidina dímero A			Dimetoxiflavanona
		Fragmento de procianidina trímero A	20	18,9	Procianidina trímero A
			21	20,1	Procianidina trímero A

Tabla D-2. Tabla de composición fenólica de extractos de semilla de palta Hass.

Polaridad positiva					
Peak	tr (min)	Identificación	Peak	Tr (min)	Identificación
3	2.4	Peonidina-O-glucósido	17	14.7	Proantocianidina dímero A Fragmento de proantocianidina dímero A
		Peonidina-O-galactósido			Quercetina
		Crisoeriol-O-glucósido			
5	7.6	Hidroxibutilideneftálico	18	15.6	Proantocianidina trímero A Fragmento de proantocianidina trímero A
		Fragmento de hidroxibutilideneftálico			
6	8.1	Fragmento de ácido cafeico			Proantocianidina dímero A Fragmento de
7	8.6	Hinoquinina	19	16.3	proantocianidina dímero A
		Ácido cafeoilquínico			Proantocianidina trímero A
		Dihidroxineocnidíflido	20	17.2	Proantocianidina trímero A Fragmento de
8	9.7	Dihidroxineocnidíflido			proantocianidina trímero A
		Fragmento de ácido cafeico			Proantocianidina dímero A Fragmento de
10	10.4	(epi)catequina			proantocianidina dímero A
11	10.7	(epi)catequina	21	18.1	Proantocianidina trímero Fragmento de
12	11.1	Dihidroxineocnidíflido			proantocianidina trímero A
		Proantocianidina trímero			
16	13.7	A			Proantocianidina dímero A
		Proantocianidina dímero A	22	19.0	Proantocianidina trímero A Fragmento de
		Quercetina-O-glucósido			proantocianidina trímero A
		Quercetina-O-galactósido	23	20.2	Proantocianidina trímero A
		Delfinidina-O-glucósido			
		Delfinidina-O-galactósido			
		Fragmento de proantocianidina dímero A			
		Fragmento de (epi)catequina			
Polaridad Negativa					
Peak	Tr (min)	Identificación	Peak	Tr (min)	Identificación
1	1.6	ácido cafeico-O-glucósido	16	13.7	Procianidina trímero A
		Ácido dicafeico			Procianidina dímero A

2	1.9	Cafeoil hexósido ([2M-H]-)			Fragmento de procianidina trímero A
		Cafeoil glucósido ([M-H]-)			Dihidroquercetina-O-glucósido
		Cafeoil hexósido ([M-H]-)			(epi)catequina
		Ácido quínico	17	14.7	Procianidina trímero A
6	8.1	ácido cafeoilquínico			Procianidina dímero A
		Ácido cafeico			Fragmento de procianidina trímero A
7	8.6	Ácido cafeoilquínico			Quercetina-O-glucósido
8	9.7	Ácido cafeoilquínico			Ácido elágico hexósido
		Ácido p-cumaroilquínico	18	15.6	Procianidina trímero A
9	10.1	Ácido cafeoilquínico	19	16.3	Procianidina dímero A
		Ácido p-cumaroilquínico			Quercetina-O-glucósido
		(epi)catequina			Ácido elágico hexósido
10	10.4	Ácido p-cumaroilquínico	20	17.1	Procianidina trímero A
		(epi)catequina			Procianidina dímero A
11	10.7	(epi)catequina			Fragmento de procianidina trímero A
12	11.1	Procianidina dímero A			anferol-O-glucósido
		Ácido cafeoilquínico			Luteolina-O-glucósido
13	11.8	Procianidina trímero A	21	18.1	Procianidina trímero A
14	12.1	(epi)catequina			Procianidina dímero A
15	12.6	Quercetina-O-dihexósido			Fragmento de procianidina trímero A
		Quercetina-O-diglucósido	22	18.9	Procianidina trímero A
		Quercetina-3-O-galactósido-7-O-glucósido			

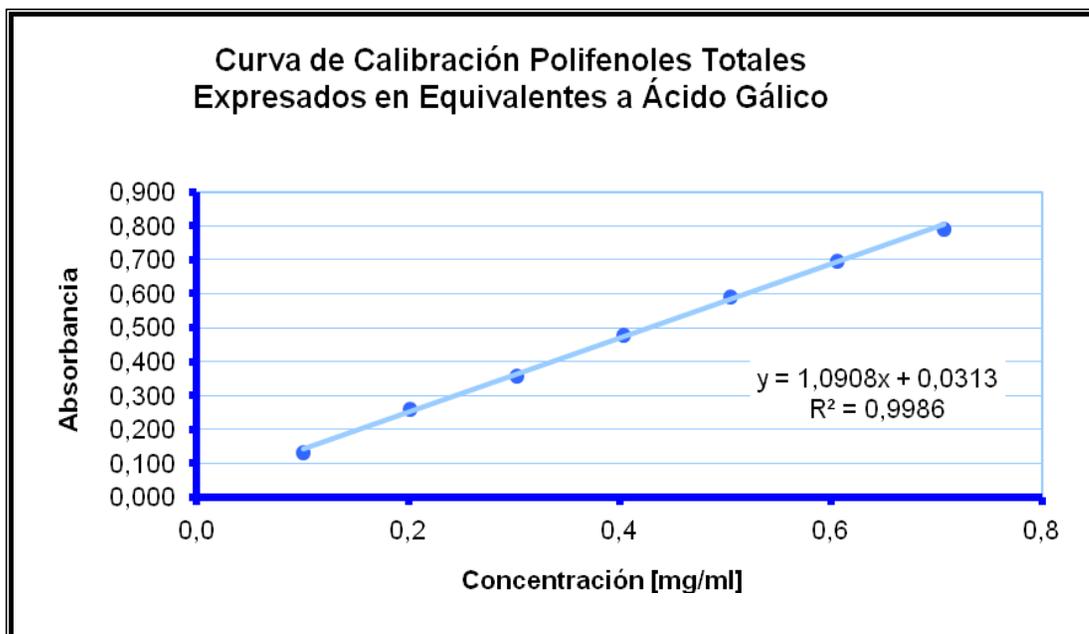
Anexo E. Curva de calibración ácido gálico

Figura E-1. Curva de calibración de estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles por método Folin Ciocalteu.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Abdel-Raouf, N., Ibraheem, I., Abdel-Tawab, S., Naser, Y. (2011). Antimicrobial and anti-hyperlipidemic activities of isolated quercetin from *Anabaena aequalis*. *Journal of Phycology*, 47: 955-962.
- Abu-Hamdeh, N., Othman, A. (2004). An experimental study and mathematical simulation of wheat drying. *Drying Technology*, 22: 491-506.
- Albano, S., Lima, S., Miguel, G., Pedro, L., Barroso, J., Figueiredo, C. (2012). “Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and antiacetyl cholinesterase activities of Essential oils and decoction waters of some aromatic plants”. *Records of Natural Products*, 6: 35-48.
- Alipour, S., Montaseri, H., y Tafaghodi, M. (2010). Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81: 521-529.
- Anbinder, P. S., Deladino, L., Navarro, A. S., Amalvy, J. I., y Martino, M. N. (2011). Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1, 80-87.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125: 989-1009.
- Ashraf-Khorassani, M., Taylor. (2004). Sequential fractionation of grape seeds into oils, polyphenols, and procyanidins via a single system employing CO₂-based fluids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52: 2440-2444.
- Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., Maffei, M. (2016). Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107: 358-363.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman. S. (2006). Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99: 191-203.

- Belšcak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44: 1094-1101.
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović Cindrić, I., Nedović, V., Bugarsk, B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44: 1094-1101.
- Berasategi, I., Barriuso, B., Ansonera, D., Astiasarám, I. (2012). Stability of avocado oil during heating: comparative study to olive oil. *Food Chemistry*, 132: 439-446.
- Bocevska, M., Sovova, H. (2007). Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. *Journal of Supercritical Fluids*, 40: 360-367.
- Boh, B., y Sumiga, B. (2008). Microencapsulation technology and its applications in building construction materials. *Materials and Geoenvironment*, 55: 329-344.
- Borchers, A., Keen, C., Gershwin, M. (2004). Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Experimental Biology and Medicine*, 229: 393-406.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.* 28: 25-30.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28: 25-30.
- Bresanni R. (2009). La composición química, capacidad anti oxidativa y valor nutritivo de la semilla de varias variedades de palta. Universidad del valle de Guatemala. Proyecto fondecyt 02-2006. pp. 14, 23-25 y 29.
- Brunner, G. (2004). Supercritical fluids: technology and application to food processing. A review. *Journal of Food Engineering*, 67:21-33.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Srećko, T., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., Velić, D. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from

- Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica L.*). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61: 195-199.
- Calvo, M. (2004). La ciencia y la tecnología de los alimentos. Editorial Acribia, páginas. 19-34.
 - Canto, W., Santos, L., Travaglini, M. (1980). Óleo de abacate: extração, usos e seus mercados atuais no Brasil e na Europa. Estudos. Econômicos. Campinas: ITAL, 1980. 144p. (Alimentos Processados, 11).
 - Carochi, M., Ferreira, I. (2013). “Antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. A review”. *Food And Chemical Toxicology*, **51**: 15-25.
 - Cavalcanti, R., Veggi, P., Meireles, M. (2011). Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability. *Procedia Food Science*, 1: 1672-1678.
 - Ceballos A., 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.
 - Cháfer, A., Fornari, T., Berna, A., Ibáñez, E., Reglero, G. (2005). Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO₂ with ethanol as a co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 34: 323-329.
 - Cháfer, A., Fornari, T., Berna, A., Stateva R. (2004), Solubility of quercetin in supercritical CO₂ + ethanol as a modifier: measurements and thermodynamic modeling. *Journal Supercritical Fluids*, 32: 89-96.
 - Champagne, C. P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190.
 - Champagne, C., Blahuta, N., Brion, F., Gagnon, C. (2000). A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68: 681-688.

- Chan, E., Lee, B., Ravindra, P., Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338: 63-72.
- Chávez, F., Aranda, M., Garcia, A., Pastene, E. (2011). Los fenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de palta (persea Americana Hass) inhiben la ureasa de H pylori. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Pp. 265-267.
- Chew, K., Khoo, M., Ng, S., Thoo, Y., Wan aida, W. (2011). Effect of etanol concentration, extraction time and extraction temperatura on the recovery of phenolic compound and antioxidant capacity of orthoshiponstamineus extracts. *International food research journal*, 18: 1427-1435.
- Cifuentes, A., Herrero, M., Ibáñez, E. (2004). Compuestos de interés alimentario, procedentes de plantas, extraídos mediante fluidos sub y supercríticos. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 41: 67-78.
- Cork, S., Krockenberger, A. (1991). Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigations on Eucalyptus leaves. *Journal of chemical ecology*, 17: 123-134.
- Cozic, C., Licton, L., Garda, M., Marlhoux, F., Cerf, D. (2009). Analysis of Arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocolloid*, 23: 1930-1934.
- Crozier, A., Jaganath, I., Clifford, M. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26: 1001-1043.
- Curaqueo, A. (2013). Caracterización de compuestos bioactivos, evaluación de la capacidad antioxidante y antibacteriana del extracto crudo de la semilla de dos variedades de palta (*Persea americana Mill cv. Hass y Negra de la Cruz*). Memoria para optar al título de Ingeniero en Industria Alimentaria, Santiago, Chile: Universidad Tecnológica Metropolitana.
- Dabas, D., Elias, R., Llambert, J. Ziegler, G. (2011). A Colored Avocado Seed Extract as a Potential Natural Colorant. *Journal of Food Science*, 76: 1335-1341.

- Danh, T., Truong, P., Mammucari, R., Foster, N. (2010). Extraction of vetiver essential oil by ethanol-modified supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Journal*, 165: 26-34.
- de Melo, M., Silvestre, A., Silva C. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices; applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *Journal of Supercritical Fluids*, 92: 115–176.
- del Valle, J., Aguilera, M. (1999). Revisión: extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos. *Food Science and Technology International*, 5: 1-24.
- Deladino, L., Navarro, A., Martino, M. (2013). Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. *Food Science and Technology*, 53: 163-169.
- Deng J., Cheng W., Yang G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*; 125: 1430–1435.
- Desai, K., Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients *Drying Technology*, 23: 1361-1394.
- Dohnal, J., Štěpánek, F. (2010). Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. *Powder Technology*, 200: 254-259.
- Draget, K., Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, 25: 251-256.
- Draguet, K. I. (2000). *Handbook of hydrocolloids* (Phillips G.O. y Williams ed.). New York, Washington, DC.
- Dreher, M., Davenport, A. (2013). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53: 738–750
- Ebadnejad, A., Karimi, G., Dehghani, H. (2013). Application of response surface methodology for modeling of ball mills in copper sulphide ore grinding. *Powder Technology*, 245: 292-296.

- Echavarría, B., Franco, A., Martínez, A. (2009). “Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de microalgas del caribe colombiano”. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, **21**: 126-131.
- El-Kamel, A., Al-Gohary, O., Hosny E. (2010). Alginate-diltiazem hydrochloride beads: Optimization of formulation factors, in vitro and in vivo availability. *Journal of Microencapsulation*, **20**: 211-225.
- Escribano-Bailon, M., Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenol extraction from foods. *Methods in Polyphenol Analysis*, 1-16.
- Esquivel, A., Vargas, P. (2007). “Uso de Aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales”. *Tecnología en marcha*. **20**: 4.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G., Nishinari, K., Funami, K., Williams, P. (2008), Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate Carbohydrate Polymers *Journal of Physical Chemistry*, **72**: 334-341.
- Fang, Z., y Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science & Technology*, **21**: 510-523.
- Ferreira, 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**: 1916-9760.
- Fornari, T., Vicente, G., Vasquez, E., Garcia-Risco, M., Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography*, **1250**: 34-48.
- Gabbott, P. (2008). A Practical Introduction to Differential Scanning Calorimetry. In *Principles and Applications of Thermal Analysis*, (pp. 1-50): Blackwell Publishing Ltd.
- Galanakis. C. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, **26**: 68-87.

- García, J. (2008). Viscoelasticidad lineal. Universidad de Alicante, Departamento de Ingeniería Química. Recuperado el 25 de diciembre del 2014, de <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3624/1/tema3RUA.pdf>.
- Garmus, T., Paviani, L., Queiroga, C., Cabral, F. (2015). Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *Journal Supercritical Fluids*, 99: 68-75.
- Ghafoor, K., Park, J., Choi Y. (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 485-490.
- Ghanni, M., Cheman., Hashim, D., Rahman, R. (1999). A Differential Scanning Calorimetric (DSC) Study on the Effect of Annealing and Sugars-Emulsifiers on Gelatinization of Sago Starch (*Metroxylon sugu*). *Journal of Food Processing Preservation*, 23: 443-462.
- Goh, C., Heng, P., Chan L. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88: 1-12.
- González, E., Gómez, M. (2012). “Terpene compounds in nature: of their potential antioxidant activity. A review”. *Current Medicinal Chemistry*, **19**: 5319-5341.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 330-347.
- Guerrero, M., J. Torres y M. Núñez. 2008. Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology*. 99: 1311-1318.
- Gursevak, K. (2005). Functional foods and nutraceuticals in the management of obesity. *Nutrition Food Science*, 35: 344-252.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidant characterization and natural antioxidant: Food quality protectors. *Grasas y Aceites*. pp. 186-196.

- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2006). Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural source: plants, food by products, algae and microalgae. Review. *Food Chemistry*, 98: 136-148.
- Hussain, P., Chatterje, S., Variyar, P., Sharma, A., Dar, M., Wani, A. (2013). “Bioactive compounds and antioxidant activity of gamma irradiated sun dried apricots (*Prunus armeniaca L.*)”. *Journal of Food Composition and Analysis*, **30**: 59-66.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126: 1821-1835.
- Imeson, A. (2010). Food stabilizers, thickeners and gelling agents. United Kingdom: Wiley-Blackwell. Chapter 4: Alginates, 50-69.
- Imeson, A. (2010). Food stabilizers, thickeners and gelling agents. United Kingdom: Wiley-Blackwell. Chapter 4: Alginates, 50-69.
- Iqbal, S., Bhangar, M. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100: 246-254.
- Jacobo, D., Hernández, C. (2012). Stability of avocado paste carotenoids as affected by high hydrostatic pressure processing and storage. *Food Science Emerging Technology*, 16: 121-128.
- Jacobs, D., Gross, M., Tapsell, L. (2009), Food synergy: An operational concept for understanding nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89: 1543-1548.
- Jiménez. I., Speisky, H. (2000) Radicales libres y Antioxidantes en la Prevención de Enfermedades: (II) Mecanismos de Defensa Antioxidante. *Revista Chilena de Nutrición*. 27: 210-219.
- Joshi S., Verma A., Mathela C. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food and Chemical Toxicology*; 48: 37-40.
- Kahn, V. (1987). Characterization of Starch Isolated from Avocado Seeds. *Journal of Food Science*, 52: 1646-1648.

- Kassem, A., Shokr, A., Mahdy, A., Aboukarima, A., Hamed, E. (2011). Comparison of drying characteristics of Thompson seedless grapes using combined microwave oven and hot air drying. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10: 33-40.
- Khanna, S., Viswanathan, P., Krishnan, P., Sanwal, G. (1968). Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents. *Phytochemistry*, 7: 1513-1517.
- Knez, Z., Marko, E., Leitgeb, M., Primo, M., Knez, M., Skerget, M. (2014). Industrial applications of supercritical fluids. Review. *Energy*, 2: 1-9.
- Lang, Q., Wai C. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – A practical review. *Talanta*, 53: 771-782.
- Law, C., Mujumdar, A. (2015). Handbook of Industrial Drying, Chapter 8: Fluidized Bed Dryers, fourth ed., CRC Press, Florida, USA, pp. 161-191.
- Lee, B. Ravindra, P., Chan, E. (2013). Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping, *Chemical Engineering and Technology*, 36: 1627-1642.
- Li, X., Meng, D., Zhao, J., Yang, Y. (2014). “Determination of synthetic phenolic antioxidants in essence perfume by high performance liquid chromatography with vortex-assisted, cloud-point extraction using AEO-9”. *Chinese Chemical Letters*, 25: 1198-1202.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 3.
- Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Luo, W. (2007). “Antimicrobial and antioxidant activity of emblica extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction and methanol extraction”. *Journal of Food Biochemistry*, 33: 307-330.
- Lupo, B., Maestro, A., Gutiérrez, J., González, C. (2015). Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 49: 25-34.
- Macrogalleria. (2005). Differential Scanning Calorimetry, Universidad del Sur de Mississippi. Disponible en: <http://pslc.ws/spanish/dsc.htm>.

- Manal, M., Shehata, M., Sahar, S. (2013). Effects of Bioactive Component of Kiwi Fruit and Avocado (Fruit and Seed) on Hypercholesterolemic Rats. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 8: 82-93.
- Mancini, M., Moresi, M., Rancini, R. (1999). Mechanical properties of alginate gels: empirical characterization. *Journal of Food Engineering*, 39: 369-378.
- Mane, S., Ponrathnam, S., Chavan, N. (2015). Effect of chemical cross-linking on properties of polymer microbeads: Review. *Canadian Chemical Transactions*, 3: 473-485.
- Manna, L., Bugnone, C., Banchemo, M. (2015). Valorization of hazelnut, coffee and grape wastes through supercritical fluid extraction of triglycerides and polyphenols. *The Journal of Supercritical Fluids*, 104: 204-211.
- Manojlovic, V., Rajic, N., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., Bugarski B. (2008). Application of electrostatic extrusion – Flavour encapsulation and controlled release Sensors, 8 pp. 1488–1496.
- Mark, D., Haeberle, S., Zengerle, R., Ducree, J., Vladisavljević, G. (2009). Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzel. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336: 634-641.
- Maróstica-Junior, M., Leite, A., Dragano, N. (2010). Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources. Review. *The Open Chemical Engineering Journal*, 4: 51-60.
- Martinez, N. (1998). Termodinámica y cinética de Sistemas. Alimento Entorno. Editorial Universidad de Politécnica de Valencia. España. pp. 371.
- Matsusaka Y, Kawabata J, Kasai T. (2003). Antioxidant constituents in avocado (*Persea americana* Mill.) seeds. *Nippon Shokuhin Kaigaku Kogaku Kaishi*. 50:550-2.
- McClements, D. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems *Advances in Colloid and Interface Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>.

-
- Medeiros, L., Panizzon, G., Alves, B., Simionato, A., Cardozo-Filho, L., Andrade, G., Gonçalves de Oliveira, A., Guedes, T., Palazzo de Mello, J. (2016). Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 212: 703-711.
 - Mesa, A., Gaviri, C., Cardons, F., Sáez, J., Blair, S., Rojano, B. (2010). “Antioxidant activity and total phenols content from some species of *Calophyllum* genus”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **15**: 2.
 - Mezger, T. G., 2002. In Ulrich Zorll (Ed.). The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers. Germany: Hannover.
 - Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M., Sarbolouki, M. (2000). Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 35: 885-888.
 - Mohammad, S., Ghalib, A., Nejib, G., Aminah, A. (2010) .Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. *Thermochimica Acta*, 509: 111-119.
 - Montgomery, D. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana S. A. México. D.F.
 - Mun, S., Kim, Y., Kang, C., Park, K., Shim, J., Kim, Y. (2009). Development of reduced-fat mayonnaise using 4[alpha]GTase-modified rice starch and xanthan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44: 400-407.
 - Murga, R. Ruiz, R., Beltrán, S., Cabezas, J. (2000). Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3408-3412.
 - Murga, R., Sanz, M., Beltran, S., Cabezas, J. (2002). Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 23: 113-121.
 - Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1: 1806-1815.

- Nicoletti, V., Amaral, P., Telis, J. (2006). Sorption Isotherm, Glass Transitions and State Diagram for Freeze-dried Plum Skin and Pulp. *Food Science and Technology International*, 12: 181-187.
- O'Shea, N., Arendt, E., Gallagher E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 16: 1-10.
- Lupo, B., González, C., Maestro, A. Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3: 130-151.
- Pasukamonset, P., Kwon, O., Adisakwattana, S. (2016). Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, Volume 61: 772-779.
- Patil, R., Dattatreya, M. (2012) .Handbook of food process design. 1st ed. UK.
- Pereira, P., Bernardo-Gil, M., Cebola, J., Mauricio, E., Romano, A. (2013). Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. *Journal of Supercritical Fluids*, 83: 57-64.
- PerkinElmer, Inc. Practical Food Applications of Differential Scanning Calorimetry (DSC), 2011, pp. 2.
- Pimentel, F., Cardoso, M., Guimarães, L., Queiroz, F., Barbosa, L., Morais, A. (2012). Extracts from the leaves of *Piper piscatorum* (Trel.Yunc.) obtained by supercritical extraction of with CO₂, employing ethanol and methanol as co-solvents. *Industrial Crops and Products*, 43: 490-495.
- Pourmortazavi, S., Hajimirsadeghi, S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1163: 2-24.
- Povh, N., Marques, M., Meireles, M. (2001). “Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert)”. *The Journal of Supercritical Fluids*, 21: 245-256.

- Price, R., Welch, R., Lee-Manion, A., Bradbury, I., Strain, J. (2008). Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran. *Cereal Chemistry*, 85: 152-157.
- Rajendran, A., Basu, S. (2009). Alginate-chitosan particulate system for sustained release of nimodipine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8: 433-440.
- Ramirez, J., 2006. Fundamentos de Reología en Alimentos. Cali, Valle, Colombia. JSR e-books.
- Ramos P., María, E. (2007). Estudio de las Propiedades de la Semilla de Aguacate (*Persea americana*) Variedad Hass, para el Aprovechamiento Integral del Fruto. En: IX Congreso de ciencia de los alimentos y V Foro de ciencia y tecnología de alimentos, D.F, México, pp. 223-229
- Rao, M. A., 1999. Rheological behavior of processed fluid and semisolid foods. In M. A. Rao (Ed.), *Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications*. (Chapter 3 and 5, pp. 105–108, 244-254).
- Raventós, M., Duarte, S., Alarcón, R. (2002). Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry. Review. *Food Science Technology*, 8: 269-284.
- Richard, E., Earle. M. (2004). *Unit operations in food processing*. Web Edition, New Zealand.
- Robins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. Review. *Agricultural Food Chemistry*, 51: 2866.
- Rodríguez-Carpena, J., Morcuende, D., Estévez, M. (2011). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat Science*, 89:166-173.
- Sahena, F., Zaidul, I., Jinap, S., Karim, A., Abbas, K., Norulaini, N., Omar, A. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction. A review. *Journal of Food Engineering*, 95: 240-253.

- Shafiur, M., Al-Saidi, G., Guizani, N., Abdullah, A. (2010). Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. *Thermochimica Acta*, 509: 111-119.
- Sharada, S. (2013). Studies on effect of various operating parameters & foaming agents – drying of fruits and vegetables. *International Journal of Modern Biological Research*, 3: 1512-1519.
- Soong, Y., Barlow, P. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88: 411-417.
- Steffe, J. (1996). Rheological methods in food process engineering. Second Edition, Michigan State University, USA. pp. 65.
- Stoica, R., Pop, S., Ion, R. (2013). Evaluation of natural polyphenols entrapped in calcium alginate beads prepared by the ionotropic gelation method. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 15: 893-898.
- Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., Bugarski, B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum L.*) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 685-696.
- Suja, K., Abraham, J., Thamizh, S., Jayalekshmy, A., Arumughan, C. (2004). Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*, 84: 393-400.
- Tabilo-Munizaga, G. y Barbosa-Cánovas G.V., 2005. Rheology for the food industry. *Journal of food engineering*, 67: 145-154.
- Tosi, E., Catalano, O., Cazzoli, A. (1982). Secado de trigo por lecho fluidizado. Influencia de las variables del proceso de secado en la calidad panadera de las harinas. *Alimentaría Latinoamericana*, 16: 61-68.
- Tsao, R., Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr.* 812: 85-99.

- Undurraga, M., Salinas, F., Ruz, N. (2008). Posibles usos de semilla y cáscara del fruto del palto (*Persea americana* Mill). Memoria para optar el Título de Ingeniero Agrónomo, Quillota, Chile: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Valenzuela, A., Nieto, S. (1996). Synthetic and natural antioxidant: *Food Quality Protectors, Grasas y Aceites*, 47: 186-196.
- Valverde, A. (1995). Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas, 24:141-154.
- Vásquez, L. (2008). Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales, Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid.
- Veberic R., Colaric M., Stampar F. (2008). Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food Chemistry*.106: 153-157.
- Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información Tecnológica*, 18: 53-65.
- Velázquez, D. (2014). Efecto de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de extractos fenólicos de cáscara de palta hass en la conservación e inocuidad de salmón atlántico. Tesis para optar a grado de magister en alimentos mención gestión, calidad e inocuidad de los alimentos, Santiago, Chile: Universidad de Chile.
- Vinha, A.F., Moreira, J., Barreira, S.V.P. 2013. Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Agricultural Science* 5: 100-109.
- Von-Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, F. (1997). “Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA”. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 45: 632-638.
- Wang, W., Bostic, T., Gu, L. (2010). Antioxidant capacities procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122: 1193-1198.

- Wijngaard, H. H. and Brunton, N. (2010). The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 96: 134-140
- Xu, X., Sun L., Dong, J., Zhang, H. (2008). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 42-46.
- Yahia, E. (2011). Avocado, Chapter 8 in Rees, D., Farrell, G., Orchard, J. (eds), *Crop Postharvest: Science and Technology*, Volume 3, Perishables, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Yanty, N., Marikkar, J., Long, K., (2011). Effect of varietal differences on composition and thermal characteristics of avocado oil. *Journal of the American oil Chemists' Society*, 88: 1997-2003.
- Yildiz-Ozturk, E., Tag, O., Ozlem, Y., Yesil-Celiktas, O. (2014). Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95: 422-430.
- Yu, L., Slavin, M. (2008). All natural whole-wheat functional foods for health promotion and disease prevention. *Funct Food Health*, 993: 125-142.
- Zheng, W., Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5165-5170,
- Zhong, Q., Daubert, C. (2013). Chapter 15 - Food Rheology. In: KUTZ, M. (ed.) *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. pp. 409.
- Zhu K-X., Lian C-X., Guo X-N., Peng W., Zhou H-M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* 126: 122-1126.
- Zuidam, N., Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. En: *Encapsulation technologies for active food*

ingredients and food processing. New York, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC.