



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

ESTUDIO DE LA CÁSCARA DE NUEZ PECANA EXTRUIDA Y FERMENTADA



Memoria

Autor/a: Aida Xavier Rodríguez
Director/a: María Pilar Almajano Pablos
Codirector/a: Juliana Villasante
Convocatoria: Junio 2019

Resumen

En este proyecto se analizaron los efectos de la extrusión y la fermentación en estado sólido en muestras de cáscara de nuez pecana (*Carya Illinoensis*). Se analizaron los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de cada una de ellas a lo largo del tiempo de fermentación. En todos los casos, las muestras fueron comparadas con unas muestras control que correspondían a la cáscara estéril y a la cáscara extruida estéril.

El principal objetivo de este proyecto era analizar si aumentaban los antioxidantes en las muestras a través de la fermentación y de la extrusión y analizar también si disminuía la cantidad de fibra insoluble, que impide la ingesta en el ser humano. Ésta puede ser usada como un efectivo conservante en la industria alimentaria. La fermentación en estado sólido no ha supuesto un incremento de la actividad antiradicalaria, pero el tratamiento de extrusión fue altamente efectivo en todas las muestras.

Las actividades de *radical scavenging* o captura de radicales libres se estudiaron a través de análisis DPPH, ABTS y FRAP, y los compuestos fenólicos mediante el análisis Folin-Ciocalteu. Además también se determinaron los flavonoides totales y los taninos condensados. Se realizó una caracterización morfológica de las muestras mediante barrido SEM y se realizó FTIR a las muestras para determinar la variación en la composición de algún compuesto fenólico predominante.

Los resultados reflejan que el proceso de extrusión puede aumentar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y de los antioxidantes de la cáscara de nuez pecana. Por lo tanto, estos resultados son prometedores para conseguir la aplicación de la cáscara de nuez como antioxidante natural en la industria alimentaria y disminuir el uso de los antioxidantes sintéticos.

Agradecimientos

Este trabajo final de grado ha sido posible gracias al Departamento de Ingeniería Química en el que trabaja Maria Pilar Almajano en la Escuela de Ingenieros Industriales de la Universidad Politècnica de Catalunya. Me gustaría agradecerle a ella su dedicación, apoyo y ayuda necesaria para la realización de este proyecto. A Juliana Villasante, actualmente terminando su doctorado, por guiarme y ayudarme durante todo el proyecto, del que ha sido precursora, junto a Maria Pilar.

También me gustaría agradecer a Javier Ramis por prestar su ayuda para realizar el método DSC-OIT y a Jordi Bou por su asistencia y consejos en el análisis FTIR, ambos profesores de la UPC.

Por otro lado, agradecer la ayuda recibida a los profesionales del laboratorio CSIC, por su ayuda y servicio para el análisis SEM.

Agradecer también a mis compañeras de laboratorio, las doctorandas Angélica Benavides, Manel Ourfelli y a Ares Bobet, actualmente realizando su trabajo final de máster, con las que he compartido momentos durante todo este proceso, por aconsejarme y brindarme su ayuda siempre que la he necesitado. A mi compañero y amigo, a quien le agradezco su inestimable apoyo, ayuda y con quién he compartido cada paso en el desarrollo de este proyecto: Sergio Prieto.

Finalmente, a quiénes me han acompañado, no solo en este último paso de mi carrera sino en cada etapa de mi vida, agradecerles su confianza y su apoyo inestimable siempre, mi familia.



Glosario

SSF Solid State Fermentation

FTIR Fourier-transform infrared spectroscopy

SEM Scanning Electron Microscope

AO Aspergillus Oryzae

FDA Food and Drug Administration

MUFA monounsaturated fatty acids

PUFA polyunsaturated fatty acids

SFA Saturated fatty acids

HTST High temperature short time

BHA Butylated hydroxyanisole

BHT Butylated hydroxytoluene

TPC Total polyphenol content

DO Densidad óptica

GAE Gallic Acid equivalent

SF Submerged Fermentation

GRAS Generally Recognized As safe

PDA Papa Dextrosa Agar

AW Water Activity

DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ABTS 2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid

FRAP Ferric reducing antioxidant power

UV/VIS: Ultraviolet-visible spectroscopy

DSC- OIT Calorimetría de barrido diferencial – tiempo de inducción oxidativa

Índice

RESUMEN	_____	
AGRADECIMIENTOS	_____	I
GLOSARIO	_____	
1. PRÓLOGO	_____	3
1.1 Origen.....	3
1.2 Motivación.....	3
2. INTRODUCCIÓN	_____	4
2.1 Objetivos.....	4
2.2 Alcance del proyecto.....	4
2.3 Antioxidantes.....	6
2.3.1 Antioxidantes sintéticos.....	7
2.4 Medición de la actividad antioxidante.....	9
2.4.1 Medición de los compuestos fenólicos.....	10
2.4.2 Actividad de captura de radicales libres – HAT.....	11
2.4.3 Actividad de captura de radicales libres – SET.....	11
2.5 DSC- OIT.....	14
2.6 Nuez pecana (<i>Carya illinoensis</i>).....	14
2.6.1 Composición de la nuez pecana.....	15
2.6.2 Actividad antioxidante.....	16
2.7 Cáscara nuez pecana.....	18
2.8 Extrusión.....	20
2.8.1 Proceso de extrusión.....	21
2.8.2 Tipos de extrusores.....	21
2.9 Fermentación.....	23
2.9.1 Fermentación en estado sólido (SSF con sus siglas en inglés).....	23
2.10 <i>Aspergillus Oryzae</i> (A.O).....	24
2.11 Extracción.....	25
3. MATERIAL Y MÉTODOS	_____	27
3.1 Cáscara de nuez pecana.....	28
3.1.1 Extrusión.....	28
3.1.2 Preparación del inóculo y SSF.....	28



3.1.3 Extracci3n.....	29
3.2 TPC	30
3.3 Flavonoides.....	31
3.4 Taninos condensados	31
3.5 DPPH	31
3.6 ABTS	32
3.7 FRAP	32
3.8 DSC-OIT	32
3.9 SEM (<i>Scanning Electron Microscope</i>).....	33
3.10 FTIR (<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)	33
4. RESULTADOS	34
4.1 TPC	34
4.2 FLAVONOIDES.....	41
4.3 Taninos condensados	43
4.4 DPPH	47
4.5 ABTS	50
4.6 FRAP	52
4.7 DSC-OIT	57
4.8 SEM	58
4.9 FTIR.....	63
CONCLUSIONES	66
EXPERIMENTOS FUTUROS	68
PLANIFICACI3N Y PRESUPUESTO	69
IMPACTO MEDIOAMBIENTAL	74
5. BIBLIOGRAFIA	75



1. Prólogo

1.1 Origen

El origen de este trabajo surge por la necesidad actual de encontrar antioxidantes naturales, que sustituyan a los artificiales, ya que cada vez existen más estudios que demuestran que éstos podrían ser perjudiciales para la salud. En anteriores investigaciones, se han desarrollado estudios para demostrar la alta capacidad antioxidante de la nuez pecana, y se ha aplicado esta propiedad en la conservación de productos alimenticios como carne y pescado.

1.2 Motivación

Se han publicado pocos estudios acerca de la cáscara de nuez pecana (*Carya illinoensis*), aunque se ha podido demostrar que contiene una alta capacidad antioxidante. Por su estructura, la cáscara no es digerible para el ser humano, por lo que debe ser procesada. La fermentación en estado sólido (SSF), aumenta la digestibilidad de los alimentos y la biodisponibilidad de los antioxidantes por lo que se ha iniciado la investigación en este punto.

2. Introducción

2.1 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es investigar el efecto de la extrusión y la fermentación en estado sólido sobre la caracterización física y las propiedades antioxidantes de la cáscara de nuez pecana. Se puede dividir en los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Búsqueda bibliográfica sobre la fermentación en estado sólido en pieles o cáscaras de otros alimentos, así como de los diferentes antioxidantes y su beneficio para el ser humano.
- ❖ Investigación de la actividad antioxidante de la cáscara de nuez mediante análisis DPPH y ABTS.
- ❖ Determinación de los polifenoles totales de las diferentes muestras mediante análisis de Folin-Ciocalteu y Flavonoides totales.
- ❖ Determinación del contenido de taninos de las muestras.
- ❖ Selección de las muestras con mejores resultados y caracterización morfológica mediante FTIR y SEM.
- ❖ Evaluación de los resultados y aceptabilidad del producto para posibles aplicaciones en la industria.

2.2 Alcance del proyecto

Las nueces Pecanas (*Carya illinoensis*) han sido parte de la dieta humana durante cientos de años y se utilizan comúnmente en la industria de la repostería. Este tipo de nuez tiene componentes nutricionales beneficiosos, tales como ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, minerales, proteínas y lípidos. La nuez pecana exhibe el mayor contenido de polifenoles en comparación a los otros frutos secos. México y los Estados Unidos son responsables del 93% de la producción mundial de nueces, con un promedio de casi 60.000 y 40.000 toneladas métricas por año, respectivamente [18].

La producción de residuos y subproductos se encuentra presente en todos los sectores productivos. Con la mejora de la conciencia ecológica a finales del siglo XX, quedó claro que el mayor desafío de la humanidad para las próximas décadas es equilibrar la producción de bienes y servicios con el crecimiento económico, la igualdad social y la sostenibilidad ambiental [4].

Actualmente se desperdician grandes cantidades de subproductos cada año en el mundo, teniendo un impacto negativo en el medio ambiente. La cáscara de nuez pecana es uno de estos deshechos

agroindustriales. La industria de nueces Pecana genera alrededor del 40 – 50% de los frutos secos como residuo.

La cáscara de nuez pecana contiene alrededor del 70-80% de fibra: principalmente la lignina, la celulosa, y hemicelulosa. Además, contienen proteínas, varios minerales y compuestos fenólicos, tales como, ácido vanílico, cafeico, ácido gálico y ácido tánico. La capacidad antioxidante de estos compuestos fenólicos es particularmente importante, ya que la oxidación es inevitable en las reacciones en todos los organismos vivos y está asociada con la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, estudios han demostrado que extractos etanólicos obtenidos a partir de la cáscara de nuez pecana son ricos en compuestos fenólicos. Dichos extractos presentan la capacidad de reducir la oxidación de los lípidos y así alargar la vida útil del alimento [18].

La peroxidación lipídica no controlada es una causa importante de numerosas enfermedades crónicas y específicas de la edad. La etiología de estas enfermedades está asociada con la generación de radicales libres en exceso, como el anión peróxido y el radical hidroxilo. Los radicales libres reaccionan rápidamente con otros grupos químicos o sustancias en el cuerpo. Los antioxidantes pueden eliminar los radicales libres y así prevenir estas enfermedades. Por lo tanto, durante las últimas décadas, hay una búsqueda continua de antioxidantes mejores y más efectivos. Los antioxidantes sintéticos se han utilizado ampliamente en productos alimenticios para retrasar el deterioro causado por la oxidación de los lípidos. Sin embargo, estos antioxidantes presentan peligros potenciales para la salud y su uso está restringido en algunos países. Por lo tanto, es esencial desarrollar antioxidantes seguros y naturales como alternativas a los sintéticos [5].

Los péptidos antioxidantes se pueden producir utilizando hidrólisis de proteasa y métodos de fermentación. La fermentación en estado sólido (SSF) parece poseer muchas ventajas biotecnológicas, como una mayor productividad, una mayor estabilidad del producto y una menor represión catabólica que otros métodos [2]. Además, es también un proceso rentable, ya que utiliza desechos agroindustriales, como semillas, pieles, cáscaras y salvado para producir valiosas moléculas bioactivas [3].

Varios estudios demuestran que la fermentación con microorganismos mejora el contenido fenólico y la actividad antioxidante [19].

Los hongos son ideales para el uso en el proceso de SSF porque las condiciones de cultivo tales como temperatura, humedad, nutrientes, etc. son similares a las que los microorganismos requieren en el entorno natural. En este trabajo experimental, la cepa fúngica *Aspergillus oryzae* (AO) se utilizó para la fermentación. *A. oryzae* tiene la capacidad de producir altas cantidades de enzimas y metabolitos secundarios beneficiosos [19].

Por otro lado, el proceso de extrusión representa una tensión mecánica que resulta en cambios químicos y físicos como desnaturalización de proteínas, gelatinización de almidón, incremento de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos, modificando la textura, etc. En la cáscara de nuez pecana se espera un aumento de la fibra soluble y la capacidad antioxidante [19].

2.3 Antioxidantes

La oxidación de los lípidos es la mayor causa del deterioro de la calidad de los alimentos y de la generación de olores y sabores, disminuyendo la vida útil, alterando la textura y el color, disminuyendo el valor nutricional de la comida [36].

Una de las vías primarias de la degradación lipídica es la autooxidación. El proceso de autooxidación de los lípidos poliinsaturados en los alimentos implica una reacción en cadena de radicales libres que generalmente se inicia por la exposición de los lípidos a la luz, el calor, la radiación ionizante, los iones metálicos o los catalizadores metaloproteicos [36]. La enzima lipoxigenasa también puede iniciar la oxidación [41].

Los hidroperóxidos son los principales productos de la oxidación lipídica, pero los hidroperóxidos, a pesar de sus efectos nocivos sobre la salud, no tienen ningún efecto sobre la calidad del sabor de los alimentos. Sin embargo, estas moléculas inestables se descomponen fácilmente para formar una miríada de productos como aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos, entre otros; Estos confieren sabores y olores desagradables a las grasas, los aceites y los alimentos que contienen lípidos [36].

Numerosos métodos tecnológicos han sido desarrollados para controlar la tasa y el grado de la oxidación lipídica en la comida, pero la adición de antioxidantes es más eficaz [36].

Los antioxidantes se han convertido en un grupo indispensable de aditivos principalmente por sus únicas propiedades de aumentar la vida útil de los alimentos sin ningún efecto adverso en las cualidades sensoriales o nutricionales de los alimentos. Los antioxidantes actúan a diferentes niveles en la secuencia oxidativa que involucra moléculas de lípidos [36].

Históricamente, *gum guaiac* fue el primer antioxidante aprobado para la estabilización de grasas animales especialmente en manteca de cerdo en el año 1930 [39].

Además, *Halliwell, Aeschbacht, Loligert y Aruoma (1995)* informaron que los antioxidantes son de gran interés para los biólogos y clínicos porque pueden ayudar a proteger el cuerpo humano contra el daño que provocan especies reactivas de oxígeno (ROS) [40].

Los compuestos fenólicos en los alimentos provienen de una de las principales clases de metabolitos secundarios en las plantas. A una baja concentración, los fenólicos actúan como un antioxidante y protegen los alimentos de la rancidez oxidativa. Los antioxidantes fenólicos interfieren con el proceso de oxidación como exterminadores de radicales libres y a veces también como queladores metálicos [36].

El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos depende del número y la disposición de los grupos hidroxilo en las moléculas de interés. Los antioxidantes fenólicos pueden donar átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos y producir derivados lipídicos y radicales antioxidantes, que son más estables y están menos disponibles para autooxidarse [42].

2.3.1 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes fenólicos sintéticos actualmente permitidos para su uso en los alimentos son hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG) y terciario-butilhidroquinona (TBHQ). Además, el galato de octil (OG) y el galato de dodecilo (DG) también se utilizan como un antioxidante sintético [36].

Estos antioxidantes fenólicos sintéticos se añaden deliberadamente a los productos con el fin de prevenir o retrasar la aparición de la oxidación lipídica durante el procesamiento y almacenamiento de grasas, aceites y alimentos que contienen lípidos y han sido utilizados por la industria alimentaria durante unos 60 años [43].

Berdahl, Nahas y Barren (2010) informaron que el mercado de alimentos y bebidas para los antioxidantes es una industria de 500 mil millones y está creciendo en 5-7% por año, y se espera que crezca a ese ritmo hasta el año 2017 [44].

En la Figura 1 se presenta una clasificación de los antioxidantes fenólicos.

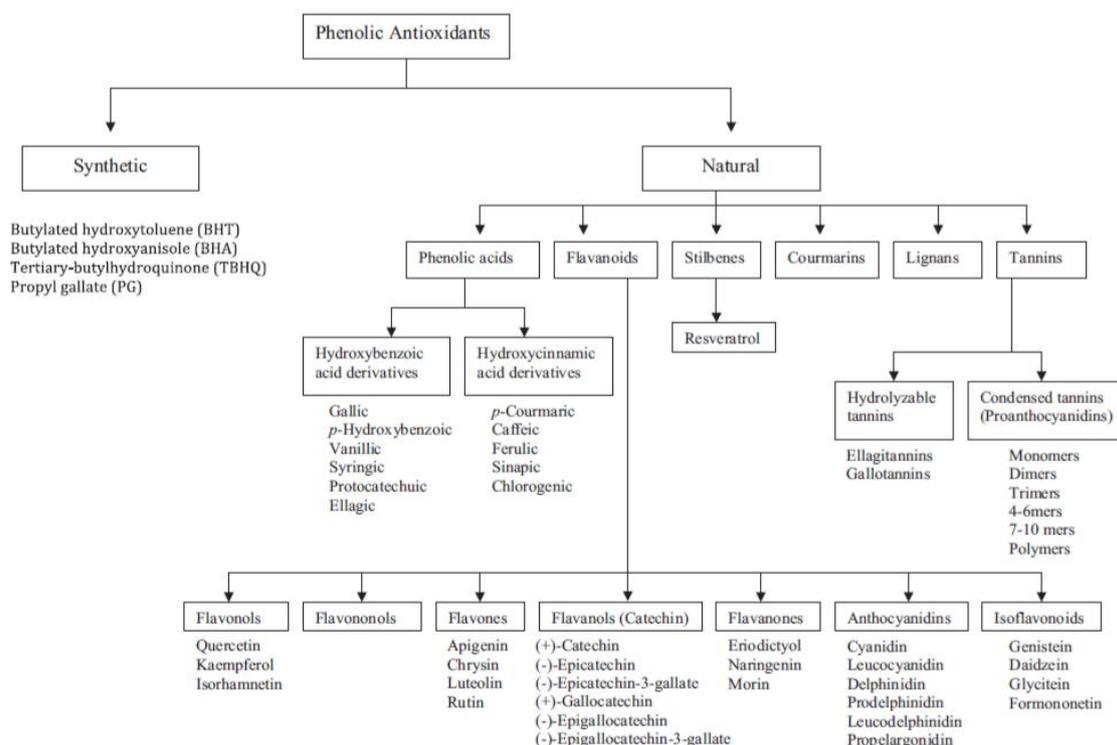


Figura 1. Clasificación de los antioxidantes fenólicos. Fuente:[36]

En la Figura 2 , se resumen las propiedades físicas y químicas de los antioxidantes sintéticos. El uso de antioxidantes fenólicos sintéticos en los productos alimenticios está estrictamente regulado por los gobiernos debido a sus posibles efectos de toxicidad. Se sospecha que BHA y BHT son responsables del daño hepático entre otros cuando se utilizan en niveles elevados en animales de laboratorio [36].

Characteristic	BHA	BHT	Gallate		TBHQ
			Propyl	Dodecyl	
Melting point (°C)	50–52	69–70	146–148	95–98	126–128
Boiling point (°C)	268 ^a	265 ^a	181 ± 20.8 ^a	–	291 ± 20.0 ^a
Density (g/cm ³) at 20 °C	–	0.89 ^a	1.36 ± 0.06 ^a	–	1.09 ± 0.06 ^a
Carry-through properties	Very good	Fair-good	Poor	Fair-good	Good
Synergism	BHT and gallates	BHA	BHA	BHA	–
Solubility (w/w%) in					
Water	0	0	<1	<1	<1
Propylene glycol	50	0	6.5	4	30
Lard	30–40	50	1	–	5–10
Corn oil	30	40	0	0	10
Glycerol	1	0	25	–	<1
Methyl linoleate	Verysoluble	Verysoluble	1	1	>10

Figura 2. Características de los compuestos fenólicos sintéticos. Fuente:[36]

2.4 Medición de la actividad antioxidante

Existen numerosos métodos para medir la actividad antioxidante. Estos pueden clasificarse en dos categorías. La primera categoría mide la capacidad de los antioxidantes para inhibir la oxidación en un sistema modelo mediante el control de los cambios asociados utilizando medios físicos, químicos o instrumentales [36].

Los ensayos de barrido radical incluyen métodos basados en la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) o en mecanismos de transferencia de electrones libres (SET) [36].

Los ensayos de blanqueo: Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC), Parámetro de intercepción total de radicales (TRAP) y barrido radical ABTS son los principales métodos que miden HAT mientras que la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) y barrido radical DPPH representan métodos basados en SET [36].

Los métodos basados en HAT miden la capacidad clásica de un antioxidante para saciar los radicales libres mediante la donación de hidrógeno, mientras que los métodos basados en SET detectan la capacidad de un antioxidante potencial de transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales [36].

Methods	Measurement units
Peroxide value (PV)	Milliequivalents of oxygen per kilogram of sample (meq/kg)
Conjugated dienes and trienes	Conjugable oxidation products (COPs)
Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay	Milligrams of malondialdehyde (MDA) equivalents per kilogram sample or micromoles of MDA equivalents per gram of sample (meq/g)
p-Anisidine value (p-AnV)	Absorbance of a solution resulting from the reaction of 1 g of fat in iso-octane solution (100 ml) with p-anisidine
Electrical conductivity method	Oil stability index (OSI) value, which is defined as the point of maximal change of the rate of oxidation
Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay	μmol of trolox equivalents
Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay	μmol per litre peroxy radical deactivated
Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay	mM trolox equivalent to 1 mM test substance
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay	EC ₅₀ (Concentration to decrease concentration of test free radical by 50%); T _{EC50} (Time to decrease concentration of the test free radical by 50%); AE (Antiradical efficiency (1/EC ₅₀) T _{EC50})
Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay	Absorbance of Fe ²⁺ complex at 593 nm produced by antioxidant reduction of corresponding tripyridyltriazine Fe ²⁺ complex

Figura 3. Medición y unidades de los diferentes métodos. Fuente: [36]

Estas metodologías in vitro se han utilizado con frecuencia para estimar la actividad antioxidante en las frutas. Como estos ensayos antioxidantes se basan en diferentes mecanismos que utilizan diferentes fuentes radicales o oxidantes, los resultados obtenidos se expresan en diferentes unidades y, por lo tanto, no se pueden comparar directamente. Los antioxidantes son moléculas capaces de inactivar los radicales libres y su acción, proporcionando un papel importante en el

sistema de defensa del cuerpo contra las especies reactivas de oxígeno. Los compuestos fenólicos se consideran antioxidantes naturales, y las frutas son muy ricas en estos fitoquímicos [37].

2.4.1 Medición de los compuestos fenólicos

Las principales metodologías utilizadas para cuantificar los compuestos bioactivos en las frutas, que se describen ampliamente en la literatura, son el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu que estima el total de polifenoles (TPC), el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio que cuantifica el total de flavonoides (TF) y las antocianinas totales (TA) estimadas por el método diferencial de pH [37].

La cuantificación de compuestos fenólicos se realiza principalmente mediante análisis espectrofotométrico. En general, la región visible del espectro se usa para medir los fenólicos totales, flavonoides y taninos, entre otras sustancias [37].

2.4.1.1 TPC

Folin-Ciocalteu se basa en la reducción química por una mezcla de tungsteno y óxidos de molibdeno. Tras la reacción con los fenoles, se produce un color azul que absorbe la luz a 765 nm. La intensidad de la absorción de la luz en esta longitud de onda es proporcional a la concentración de fenoles. Es de destacar que este reactivo no sólo mide los fenoles totales, sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora [45].

2.4.1.2 TF

El contenido total de **flavonoides** en frutas se estima principalmente utilizando el método colorimétrico con cloruro de aluminio. En esta metodología, el extracto de la fruta se añade en una solución metanólica de cloruro de aluminio a una concentración determinada. Después de un corto período de tiempo, la absorbancia se mide y se compara con un flavonoide estándar (catequina, quercetina o rutina). La desventaja de esta metodología es que sólo da una estimación del contenido total de flavonoides. Sin embargo, esta es una metodología simple y eficiente para cuantificar el contenido total de flavonoides en frutas y puede ser muy útil cuando no se dispone de equipos más avanzados [37].

2.4.1.3 Taninos condensados

Los taninos condensados son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina. El contenido total de Taninos se estima principalmente mediante el método de *Julken-Titto et al. (1985)*. Los taninos condensados son solubles en ácidos diluidos, alcohol, acetona y glicerina. Además, reaccionan con

vainillina en medio ácido formando un compuesto muy coloreado cuya lectura se efectúa a 650 nm con un espectrofotómetro [57].

2.4.2 Actividad de captura de radicales libres – HAT

2.4.2.1 ABTS (2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ABTS es oxidado por los radicales hidroperoxil u otros oxidantes a su catión radical, $ABTS^+$, que es de un color intenso, y AOC se mide como la capacidad de los compuestos para disminuir el color que reacciona directamente con el radical $ABTS^+$. Los resultados de los compuestos estudiados se expresan en relación con Trolox [38].

Según *Cano et al. y otros*, $ABTS^+$ puede generarse por reacción química (dióxido de manganeso, ABAP, persulfato de potasio) o reacciones enzimáticas. Se demostró que la absorción máxima de $ABTS^+$ estaba en longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm. Entre ellos, 415 y 734 nm fueron adoptados por la mayoría de los investigadores para monitorear espectrofotométricamente la reacción entre los antioxidantes y $ABTS^+$ [48].

En términos de métodos de cuantificación, los métodos revisados más recientes miden la disminución de absorbancia de $ABTS^+$ en presencia de la muestra de prueba o Trolox en un punto de tiempo fijo (4-6 min), y luego la capacidad antioxidante se calcula como equivalentes de Trolox [38]

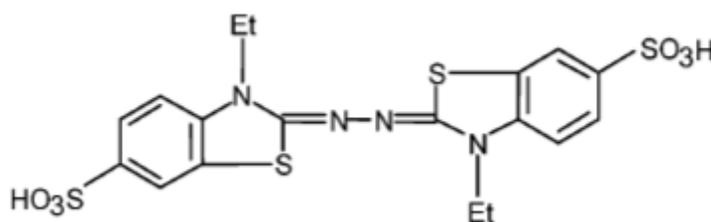


Figura 4. Estructura ABTS. Fuente: [38]

2.4.3 Actividad de captura de radicales libres – SET

2.4.3.1 DPPH (2, 2-dyphenil-1-ptycrilhidrazil)

El ensayo DPPH es uno de los métodos más populares utilizados para evaluar la actividad antioxidante en las frutas. El principio detrás de este ensayo se basa en el barrido de DPPH estable por un antioxidante (reducción de DPPH a DPPH₂) [37]. El radical DPPH es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánicos estables, que lleva un color púrpura profundo [38].

La capacidad puede evaluarse mediante resonancia de giro de electrones (EPR) o midiendo la disminución de su absorbancia. El ensayo de decoloración ampliamente utilizado fue reportado por primera vez por *Brand-Williams y compañeros de trabajo* [47].

El radical se emplea como un factor de cuantificación. En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra y cuando se añade la sustancia antioxidante se produce un descenso en la señal debido a la disminución de la concentración del radical. La absorbancia se monitorea en el rango de 515-520 nm, donde el color púrpura de la solución cambia a amarillo y se observa una reducción en la absorbancia que es monitoreado por un espectrofotómetro. Los principales hallazgos se refieren al uso de una solución de DPPH de 50 μ M en metanol o metanol amortiguado, debido a la exactitud de las mediciones espectrofotométricas. Además, se sugiere también un curso de tiempo del proceso de inhibición [38].

El porcentaje de DPPH restante se calcula como:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{A_{\text{Blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \times 100$$

El porcentaje de DPPH restante es proporcional a la concentración de antioxidantes y la concentración que causa una disminución en la concentración inicial de DPPH en un 50% se define como CE50 [38].

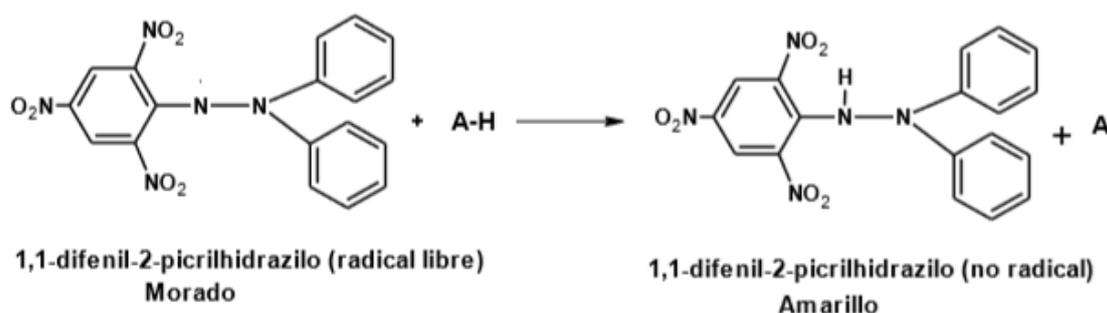


Figura 5. Estructura DPPH antes y después de reaccionar con el antioxidante [54]

2.4.3.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El ensayo FRAP, potencia antioxidante de reducción férrica, fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain para medir la potencia reductora en plasma, pero posteriormente el ensayo también

se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en botánicos. La reacción mide la reducción del férrico 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a un complejo ferroso coloreado [38].

Se mide la DO (densidad óptica) del Fe^{2+} , así cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia [55].

La reacción detecta compuestos con potencialidades redox de $< 0,7$ V (el potencial redox de Fe^{3+} -TPTZ), por lo que FRAP es una pantalla razonable para medir la capacidad de mantener el estado de redox en las células o tejidos. La reducción de la potencia parece estar relacionada con el grado de hidroxilación y la extensión de la conjugación en polifenoles. Sin embargo, FRAP no puede detectar compuestos que actúan por transferencia de H, particularmente tioles y proteínas. Debido a que el potencial redox de Fe^{3+} -TPTZ es comparable con el de ABTS^+ (0,68 V), los compuestos similares reaccionan en los ensayos de TEAC y FRAP. Por lo tanto, FRAP es útil, en combinación con otros métodos, para determinar la capacidad antioxidante de productos que contengan diferentes tipos de antioxidantes [55]. El ensayo FRAP se realiza a pH ácido 3,6 para mantener la solubilidad del hierro [38].

Los resultados de FRAP pueden variar enormemente dependiendo de la escala de tiempo del análisis. Los fenoles que unen el hierro o se rompen a compuestos con una reactividad menor o diferente se analizan mejor con tiempos de reacción cortos. Sin embargo, algunos polifenoles pueden reaccionar más lentamente y requieren tiempos de reacción más prolongados para la detección [38].

Pulido et al. Investigó que la absorción aumentó lentamente para polifenoles como el ácido cafeico, ácido tánico, ácido ferúlico, ácido ascórbico, y quercetina, incluso después de varias horas de tiempo de reacción [46].

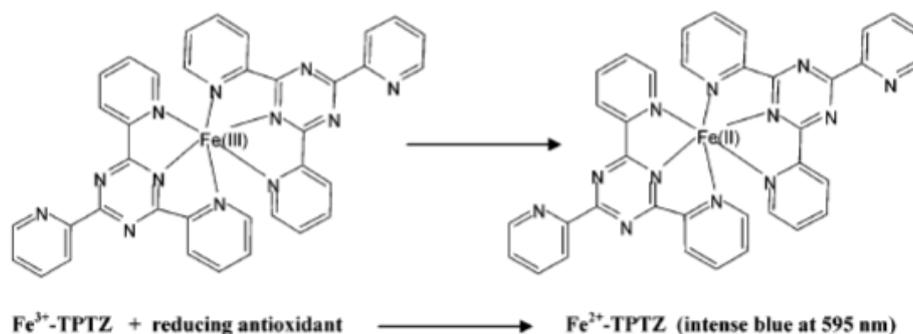


Figura 6. Reacción de reducción para el ensayo FRAP. Fuente: [38]

2.5 DSC- OIT

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) se usa para predecir el rendimiento termo-oxidativo y proporciona un medio fácil de usar y sensible para caracterizar las propiedades térmicas [53]. DSC-OIT es uno de los métodos de evaluación de la estabilidad oxidativa. El compuesto es oxidado en una atmósfera muy rica en oxígeno que deteriora su estructura. El tiempo de inducción de oxidación (OIT) se mide siguiendo estos pasos [52]:

1. La muestra es calentada en una atmósfera de nitrógeno. La temperatura se mantiene en un valor específico.
2. Se cambia la atmósfera de nitrógeno a oxígeno.
3. Después de este último paso, se mide el tiempo desde el cambio de gas hasta el pico exotérmico observado.

2.6 Nuez pecana (*Carya illinoensis*)

La nuez pecana (*Carya illinoensis*) pertenece a la familia de los Juglandaceae. Es nativa del sur de los Estados Unidos y el norte de México, pero también se cultiva en otras regiones del mundo, como Australia, Sudáfrica, Israel y Sudamérica [14].



Figura 7. Nuez pecana. Fuente: mercadolibre

Es una excelente fuente de macronutrientes: proteína, grasa y fibra dietética, como también de micronutrientes: vitamina E y minerales como el magnesio, el cobre, el fósforo, el zinc y el selenio. El alto contenido en fibra de la nuez es beneficiosa en el proceso de digestión, además de ayudar al buen funcionamiento del sistema cardiovascular. Por otro lado, la Vitamina E actúa como antioxidante, y protege las células de los compuestos tóxicos que penetran en el organismo y combaten los radicales libres que causan degeneración de los tejidos. También ayuda a tener una cicatrización adecuada y a prevenir problemas coronarios.

Teniendo en cuenta estos beneficios, los mercados de nuez pecana han crecido significativamente tanto en los Estados Unidos como en todo el mundo [12].

Su valor calórico está influenciado por el contenido lipídico, que oscila entre 65 y 75%. Este valor es mayor en comparación con muchos frutos secos como cacahuetes (48 – 52% de grasa total), pistachos (44%), o almendras (51%). Las nueces pecanas están entre los frutos secos que la FDA (*Food and Drug Administration*) reconoce como "corazón saludable"[12].

Por otro lado, las nueces son una fuente abundante de ácidos grasos insaturados y metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas. Se han investigado los posibles beneficios para la salud de la inclusión de nueces en la dieta en varios ensayos clínicos. Además, el consumo de nueces y semillas oleaginosas se ha asociado con la reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la restauración de perfiles de lípidos sanguíneos favorables [15].

2.6.1 Composición de la nuez pecana

Como se ha comentado anteriormente, la nuez pecana es rica en grasas, con un rendimiento neto de alrededor de 58.1-66.18 g de aceite/100 g de masa de nuez, que se encuentra en un rango similar a las nueces comunes, como se indica en la Figura 2 [15].

Constituent	Pecans (<i>Carya illinoensis</i>)	Walnuts (<i>Juglans regia</i>)	Reference
Total fat	58.1–66.18 g oil/100 g nut meat	64.5 g/100 g nut meat	(Ryan et al., 2006; Venkatchalam & Sathe, 2006)
Total PUFAs	24.92 g/100 g lipid	72.96 g/100 g lipid	(Venkatchalam & Sathe, 2006)
Total MUFAs	66.73 g/100 g lipid	15.28 g/100 g lipid	(Venkatchalam & Sathe, 2006)
Linoleic acid (C18:2n6) (PUFA)	23.68 g/100 g lipids	59.79 g/100 g lipid	(Venkatchalam & Sathe, 2006)
Alpha-linolenic acid (C18:3n3) (PUFA)	1.24 g/100 g lipids	13.17 g/100 g lipids	(Venkatchalam & Sathe, 2006)
Oleic acid (C18:1n9) (MUFA)	66.66 g/100 g lipids	15.19 g/100 g lipids	(Venkatchalam & Sathe, 2006)
Total polyphenols (gallic acid equivalents)	2016 (mg GAE/100 g) – USDA database 1284.00 (mg GAE/100 g) – Phenol Explorer database	1556 (mg GAE/100 g) – USDA database 1574.82 (mg GAE/100 g) – Phenol Explorer database	(Wu et al., 2004)
EGCG	2.1 mg/90 g	–	(Hudthagosol et al., 2011)
Antioxidant activity (Trolox equivalents)	58 µmol/g	120 µmol/g	(Abe et al., 2010)

Figura 8. Tabla comparativa de constituyentes bioactivos de la nuez pecana y otras nueces. Fuente: [15]

Entre los cinco tipos comparados de nueces, Brasil, pecan, pino, pistacho y nueces de cajú, se descubrió que las nueces pecanas tienen la mayor proporción de ácidos grasos insaturados/saturados, con el contenido total de ácidos grasos insaturados en el aceite extraído alcanzando un valor del 93%. Los ácidos grasos insaturados son un grupo de lípidos caracterizado por la presencia de uno o más enlaces dobles en la estructura [15].

Los ácidos grasos insaturados que contienen un doble enlace en la cadena son los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), y si presentan dos o más enlaces dobles, la molécula pertenece al grupo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) [15].

Los ácidos grasos saturados (SFAs) no contienen dobles enlaces en su estructura. La baja proporción de ácidos grasos saturados a insaturados en las membranas celulares aumenta la fluidez y permeabilidad de la membrana y afecta aún más a la actividad de las enzimas incrustadas [15].

Venkatchalam *et al.* encontró que las nueces pecanas contienen más MUFAs que PUFAs (Figura 2). Por otro lado, se indicó una cantidad similar de PUFAs y MUFAs en aceite obtenido de nueces de Pecan. Específicamente, se ha encontrado que el ácido linoleico es el PUFA más abundante y

contienen una pequeña cantidad de ácido alfa-linoleico. Además, el ácido oleico es el MUFA más significativo presente en las nueces pecanas [15].

El ácido linoleico Omega-6 y el ácido alfa-linolénico Omega-3 son ácidos grasos esenciales, que no pueden ser sintetizados endógenamente por la mayoría de los animales, por lo tanto, su ingesta dietética constante es crucial [15].

El bajo valor de peróxido del aceite de nuez pecana (0,15 mEq O₂ por kg de aceite), indicativo de una tendencia reducida hacia la autooxidación (desarrollo de la rancidez) también ayuda a mantener el sabor y, por lo tanto, el valor alimentario de las nueces en el almacenamiento [15].

El alfa-tocoferol y el gamma-tocoferol ayudan a prevenir la oxidación de ácidos grasos insaturados, que son especialmente propensos al proceso de oxidación por presencia de enlaces insaturados en su estructura. Las nueces pecanas son una fuente dietética de gamma-tocoferol y en menos cantidad de alfa-tocoferol, conteniendo 24.4 y 1.4 mg por 100 g de nuez respectivamente [36].

Las nueces de Pecan también son una fuente de tiamina, folato, niacina, riboflavina y vitamina B6, así como minerales como el calcio, hierro, magnesio, fósforo, y zinc [15].

2.6.2 Actividad antioxidante

Las nueces pecanas son también una rica fuente de compuestos polifenólicos, que tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana. Curiosamente, éstas se conocen por tener el mayor contenido total de polifenoles entre diez tipos de nueces estudiadas [15].

Ácidos fenólicos (ácido gálico), proantocianidinas, prodelfinidinas (3-O-galatos) incluyendo epigallocatequina, epicatequina-3-O-galato, y los flavan-3-ols más comunes, catequina y epicatequina se identificaron en la nuez de Pecan [36]. *De la Rosa, Alvarez-Parrilla, y Shahidi (2010)* identificaron cinco compuestos fenólicos en la nuez pecana mexicana, y dos (ácidos ellágico y gálico) en la cáscara [36]. El contenido de taninos fue reportado como un rango estrecho de 0.6-1.85% [15].

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. La subdivisión de polifenoles en taninos, ligninas y flavonoides deriva de la variedad de unidades simples polifenoles provenientes de los metabolitos secundarios de las plantas, así como en las divisiones clásicas establecidas según la importancia relativa de cada componente basado en los diferentes campos de estudio [20].

La unidad fenólica puede ser esterificada o metilada. También se la puede encontrar dimerizada o polimerizada, creando una nueva clase de polifenol [20].

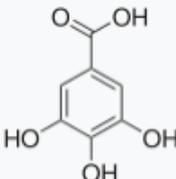
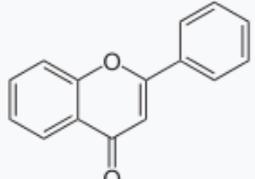
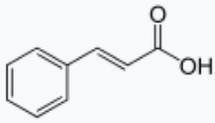
Unidad base:	 Ácido gálico	 Flavona	 Ácido cinámico
Clase/Polímero:	Taninos hidrolizables	Flavonoide, taninos condensados	Ligninas

Figura 9: Clasificación polifenoles. Fuente: Wikipedia

El ácido elágico es uno de los polifenoles más significativos encontrados en las nueces de Pecan. Es un dímero del ácido gálico y forma la clase de los elagitaninos [15].

Los compuestos polifenólicos, como se ha comentado anteriormente, son conocidos por actuar como antioxidantes o barredores de radicales libres, además de tener otros atributos bioquímicos. Esta clase de nueces también están dotadas con la mayor cantidad de flavonoides entre varios tipos revisados de nueces [15].

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se produce a través de la donación de un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo unido al anillo aromático a las moléculas químicamente inestables, como lo son los radicales libres, ralentizando así el proceso de oxidación en las membranas celulares y los alimentos ricos en lípidos. Además, son capaces de inhibir la acción de enzimas como la lipoxigenasa, responsables de los cambios oxidativos en grasas y aceites, mejorando la estabilidad de dichos productos alimenticios [16].

Los fitoquímicos y otros compuestos bioactivos, incluidos los tocoferoles y los fitoesteroles, también están presentes en el aceite de nuez. Los tocoferoles son compuestos aromáticos conocidos por su vitamina E y actividad antioxidante, que está fuertemente relacionada con su estructura química. La actividad antioxidante de los tocoferoles depende de las concentraciones, temperatura, luz, sustrato y disolvente, y del método de ensayo lipídico, así como de la presencia de sinergias y especies químicas que pueden actuar como prooxidantes [16].

Los fitoesteroles son compuestos bioactivos que actúan sobre la estabilidad oxidativa en las membranas de las células vegetales [16].

2.6.2.1 Factores que afectan a la capacidad antioxidante

Varios factores pueden afectar la capacidad antioxidante de estos compuestos, incluyendo las condiciones de procesamiento que implican la tecnología, el uso de disolventes y la temperatura de extracción utilizada en el aislamiento de sustancias fenólicas.

La concentración, los diversos grupos químicos para los compuestos fenólicos, la especie y variedad de nuez pecana que se cultiva, en el que los antioxidantes se sintetizan de forma natural, también puede influir significativamente en las características de esta, como por ejemplo en el color de la cáscara [16].

Además de la variedad, los factores genéticos, las condiciones ambientales, la composición del suelo, la maduración y los métodos de cultivo tienen una fuerte influencia en la composición fitoquímica y nutricional de las nueces pecanas [16].

Estos factores pueden afectar significativamente en la estabilidad oxidativa y el poder antioxidante de los productos de diferentes regiones y hemisferios [16].

Aunque muchos estudios han reportado una simple relación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante, la relación puede ser mucho más compleja en su contribución a la capacidad antioxidante total, involucrando otros componentes matriciales en la planta, como proteínas, carbohidratos y fibras [16].

2.7 Cáscara nuez pecana

Los residuos generados durante el procesamiento de la nuez son abundantes y no se reutilizan. El pericarpio de la nuez pecana se puede utilizar como absorbente de bajo costo o como precursor de carbono para la adsorción de colorantes y metales pesados en soluciones acuosas [16].

Las cáscaras de nuez pecana se caracterizan por presentar mayor cantidad de polifenoles totales (93 mg GAE/g) y capacidad antiradicalaria que el fruto de la nuez. Esto se debe principalmente a la presencia de ácidos clorogénicos, proantocianidinas y otros ácidos fenólicos [15]. Los extractos obtenidos de las cáscaras concentran toda la capacidad antioxidante, sin embargo, estos compuestos naturales son sensibles a la luz y al calor y a menudo muestran mala biodisponibilidad debido a la baja solubilidad. Además, su sabor astringente/amargo puede limitar su uso en los alimentos [13].

Un estudio exhaustivo sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los granos y cáscaras de la nuez pecana de Chihuahua, México, encontró altas concentraciones de compuestos fenólicos extraíbles totales, flavonoides y proantocianidinas en los frutos y concentraciones más altas en las cáscaras. La tabla 1 muestra los resultados del estudio en tres ubicaciones de muestreo diferentes [21].

Tabla 1. Resultados estudio compuestos fenólicos, flavonoides y proantocianidinas. Fuente: [21]

Ubicaciones	Compuestos fenólicos (mg GAE/g FW)		Flavonoides (mg CE/g FW)		Proantocianidinas (mg CE/g FW)	
	Fruto	Cáscara	Fruto	Cáscara	Fruto	Cáscara
1	11,7 ± 0,3	86,4 ± 7,1	5,9 ± 0,7	33,1 ± 1,8	20,6 ± 1,7	396,0 ± 30,2
2	12,5 ± 0,2	65,3 ± 6,9	6,4 ± 0,8	26,3 ± 2,6	26,7 ± 4,5	316,1 ± 17,3
3	11,9 ± 0,3	92,5 ± 9,0	6,8 ± 0,8	36,1 ± 1,8	20,3 ± 0,5	464,4 ± 38,0

Se llevaron a cabo diferentes métodos para calcular la actividad de barrido antioxidante y radical, encontrando que tanto los frutos como las cáscaras son antioxidantes altamente efectivos. Como se puede observar en la tabla 2, la cáscara es más efectiva debido a su alto contenido en compuestos fenólicos [21].

Tabla 2. Resultados pruebas barrido antioxidante y radical. Fuente: [21]

Ubicaciones	ORAC (μmol TE/g FW)		Barrido DPPH* Flavonoides (μmol TE/g FW)		Barrido ABTS* (μmol TE/g FW)		Barrido HO* (mmol GAE/g FW)	
	Kernel	Shell	Kernel	Shell	Kernel	Shell	Kernel	Shell
1	231,2 ± 15,0	859,5 ± 180,8	104,4 ± 8,3	655,1 ± 49,9	83,4 ± 1,2	594,5 ± 83,6	12,8 ± 1,6	37,0 ± 3,1
2	261,5 ± 37,6	680,3 ± 66,8	108,7 ± 9,0	537,8 ± 33,8	81,8 ± 3,0	518,4 ± 80,7	11,9 ± 0,5	30,2 ± 2,2
3	227,0 ± 50,1	1350,3 ± 85,9	102,6 ± 9,3	720,3 ± 50,2	75,9 ± 11,8	644,2 ± 62,2	13,0 ± 1,9	41,7 ± 5,8

2.8 Extrusión

La extrusión es sin duda una de las tecnologías más versátiles en el campo de los alimentos y se ha utilizado comúnmente para el desarrollo de nuevos productos, incluyendo aperitivos, cereales para el desayuno y alimentos para bebés. Este proceso tiene bajo coste, alta productividad, versatilidad, y también mejora la digestibilidad y biodisponibilidad nutricional del producto para organismos humanos y animales [17].

Además, la extrusión no genera sólidos ni subproductos peligrosos y tiene un uso eficiente del agua. Este proceso de alta productividad emplea un tiempo de residencia corto y es fácilmente adaptable y escalable [30].

Puede aplicarse con el control de tres factores independientes; la temperatura del barril, la humedad y la velocidad del tornillo. Los efectos incluyen la gelatinización del almidón, la desnaturalización de la proteína, la biodisponibilidad mejorada de los compuestos fenólicos, la reducción tanto de microorganismos y factores anti nutricionales entre los ingredientes alimentarios. La extrusión representa una tensión mecánica, que puede alterar las características físicas y químicas [18].

La extrusión es un proceso continuo que involucra el trabajo y la compresión sobre un material para formar una masa semisólida, que en determinadas condiciones controladas es forzada a fluir a través de una abertura restringida. En dicho proceso, se combinan una serie de operaciones unitarias que incluyen mezclado, amasado, cizallamiento, calentamiento, enfriamiento, conformación, texturización y deshidratación de materiales alimenticios, como granos, leguminosas y semillas [30].

Existen dos tipos de extrusión aplicada a la producción de alimentos: extrusión en frío y termoplástico. En general, en la extrusión la combinación de calor y esfuerzo mecánico propician la inactivación de enzimas que afectan negativamente la vida anaquel, la destrucción de compuestos anti nutricionales, pequeñas pérdidas de vitaminas o incluso aparición de ciertos aromas y sabores [17].

Todo el tiempo de cocción del producto se realiza en poco tiempo, por eso este proceso es considerado un proceso de alta temperatura y corto tiempo (HTST). Los extrusores HTST se emplean típicamente para ingredientes de alimentos con bajo contenido de humedad [17].

Cheftel [22], plantea que las principales ventajas de la extrusión sobre otras tecnologías convencionales son:

- ✓ Eficiente transferencia de energía dentro de la masa a alta temperatura.
- ✓ Gran capacidad de producción.
- ✓ No se incurre en gastos de energía adicionales, ya que el producto terminado no requiere ser secado.
- ✓ Operaciones continuas y automáticas.
- ✓ Uniformidad en la cocción del alimento.
- ✓ Operación versátil debido a la gran diversidad de formas a partir de cambios en la configuración del troquel.
- ✓ No incorpora contaminantes en la elaboración.
- ✓ Posibilidad de emplear una amplia gama de ingredientes.

2.8.1 Proceso de extrusión

El proceso fundamental de extrusión consiste en un aparato de presión, el cual causa que el producto se mueva como un líquido en un flujo laminar a través de una resistencia. Estos dos componentes, flujo y resistencia, determinan el proceso de extrusión y el tipo de producto que hace. La presión y el flujo pueden ser causados por un número de mecanismos, incluyendo pistones y rodillos. Los tornillos no solo movilizan el producto, generando presión, sino que también lo mezclan, ayudando a la generación y transferencia de calor, y a la texturización y homogeneización [17].

El producto que se encuentra en el canal de un tornillo rotatorio es cortado, esto significa que se adhiere a dos superficies diferentes (tornillo y barril) que se mueven respecto a cada uno. La velocidad del producto en el canal varía de cero a un máximo en la superficie del tornillo. Las capas del producto se deslizan unas sobre otras, y a este proceso se le llama corte, un factor muy importante [17].

El producto hace que un producto se estire, acelera la gelatinización de almidones y otras reacciones, alinea moléculas de cadena larga y puede despolimerizarlas [17].

2.8.2 Tipos de extrusores

Los extrusores pueden clasificarse en tres categorías principales:

- ✓ Extrusores de pistón
- ✓ Extrusores de rodillos
- ✓ Extrusores de tornillo

Los **extrusores de pistón**, que son los más sencillos en diseño se emplean principalmente para dar forma. Estas máquinas se usan comúnmente en la producción de dulces, por ejemplo, para depositar el relleno central de los chocolates [17].

Los **extrusores de rodillo** que también se emplean para dar forma, consisten en dos rodillos que giran en sentidos opuestos a velocidad similar o diferencial y tienen superficies lisas o perfiladas [17].

Los **extrusores de tornillo** emplean tornillo sencillo, tornillos gemelos o múltiples rotando dentro de un cañón estacionario para empujar el material hacia adelante y a través de un orificio especialmente diseñado llamado dado o boquilla. Para que la extrusión sea la deseada, se deben tener en cuenta factores como: la configuración de los tornillos, la velocidad del tornillo y la temperatura de las varias zonas del cañón [17].

2.8.2.1 Extrusor de tornillo

Todos los extrusores de este tipo tienen tornillos colocados firmemente y ajustados en un cilindro adecuado el cual gira por medio de un motor eléctrico grande. Los ingredientes relativamente secos (15-25% de humedad), son alimentados al extrusor y la fricción entre el producto y los tornillos incrementan rápidamente la temperatura del producto (140-170°C) durante el rápido tránsito a través del cilindro.

Cuando el material cocido extraído, es forzado a través del dado, esta presión es liberada con su correspondiente pérdida de humedad, un descenso en la temperatura y la expansión del producto formado ya cocido [17].

La máquina co-rotadora tiene características de los diseños sencillos, y opera de forma intermedia entre ellos. Aunque los tornillos se entrelazan, no pueden crear cámaras separadas a lo largo del tornillo. Cuando las aletas se entrelazan o traslapan, están en ángulos opuestos, requiriendo espacio adicional. Hay un canal continuo alrededor de ambos tornillos en el cual ocurre flujo de presión. En el punto de traslape, el producto es raspado de la superficie de cada canal por la intersección de las aletas, después de lo cual se redistribuye. Con esta característica de limpieza, ocurre menos estancamiento, y se mejora la transferencia de calor [17].

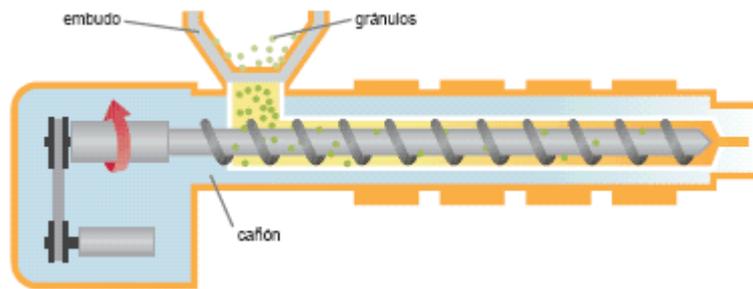


Figura 10. Extrusor de tornillo. Fuente: tecnoclase4a.wordpress

2.9 Fermentación

En general, la fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, que no requiere oxígeno y cuyo producto final es un compuesto orgánico. Según los productos finales, existen distintas clases de fermentación.

Las dos estrategias principales para la producción de celulasas son la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SF), que difieren con respecto a las condiciones ambientales y las formas de conducción. Uno de los parámetros más exaltados para diferenciar este tipo de procesos es, sin duda, el análisis del volumen de agua presente en la reacción. El nivel de actividad del agua con el propósito de asegurar el crecimiento y el metabolismo de las células, por otra parte, no excede la capacidad de enlace máxima del agua con la matriz sólida [4].

Aunque la mayoría de las enzimas microbianas se producen por fermentación sumergida, la fermentación en estado sólido (SSF), utilizando residuos agroindustriales, permite la producción de estas biomoléculas a un costo más bajo y es respetuosa con el medio ambiente [3].

Otra ventaja importante de SSF es la mayor tasa de crecimiento exhibida por los hongos en el sustrato sólido en comparación con la fermentación sumergida. La morfología de los hongos filamentosos les permite colonizar la superficie del sustrato y la matriz en la búsqueda de nutrientes, por lo tanto, secretando niveles más altos de metabolitos y enzimas [3].

2.9.1 Fermentación en estado sólido (SSF con sus siglas en inglés)

La fermentación en estado sólido es una herramienta tecnológica para mejorar las propiedades funcionales y nutricionales de productos. Estos procesos pueden ser definidos como “crecimiento de microorganismos (mayormente hongos)”, en materiales sólidos húmedos en ausencia de “agua de flujo libre”. Esto significa que se produce casi en ausencia de agua libre, pero el sustrato debe poseer suficiente humedad para apoyar el crecimiento y el metabolismo del microorganismo. SSF se usa para producir productos de forma controlada y mejorar su calidad nutricional [1].

SSF es un método de cultivo antiguo que todavía se utiliza para producir enzimas y metabolitos secundarios. Por lo tanto, su aplicación en la industria alimentaria es importante para producir biomoléculas como ácidos orgánicos, pigmentos, compuestos fenólicos y sabor [6].

Los compuestos fenólicos en forma insoluble están ligados covalentemente a componentes de la pared celular tales como polisacáridos indigestibles (hemicelulosa y celulosa), y por lo tanto deben ser liberados de la pared celular con el fin de medir el contenido fenólico [1].

Las formas enlazadas de compuestos fenólicos pueden liberarse de las estructuras de la pared celular por hidrólisis ácida/alcalina, tratamiento enzimático o fermentación. SSF ha sido ampliamente utilizado para mejorar los niveles de compuestos fenólicos [27].

La eficiencia de la SSF depende del microorganismo, así como de las condiciones operativas y ambientales como: la temperatura, el pH, el contenido de humedad, la aireación, las concentraciones de nutrientes y la naturaleza del sustrato [6].

Los hongos son los más usados para el proceso de SSF porque las condiciones de cultivo son similares a las que requieren los microorganismos en el ambiente natural [6]. Los hongos filamentosos de interés industrial incluyen varias especies de *Aspergillus* Sp., ya que son capaces de adaptar el sustrato y producir varios metabolitos con altas actividades biológicas [3].

Entre los hongos, *Aspergillus oryzae* se ha utilizado en SSF y está listado como "*Generally Recognized as Safe*", (GRAS) por la "*Food and Drug Administration*" (FDA). *Aspergillus oryzae* tiene una larga historia de uso en la industria alimentaria debido a sus altas actividades proteolíticas y amilolíticas y produce alimentos fermentados tradicionales [6].

2.10 *Aspergillus Oryzae* (A.O)

Aspergillus oryzae es un hongo filamentoso, capaz de secretar grandes cantidades de enzimas hidrolíticas incluyendo proteasa, amilasa, celulasa y fitasa y una gran variedad de enzimas extracelulares, lo que conduce a la liberación de los ácidos fenólicos ligados insolubles [27]. Es ampliamente utilizado en la fabricación de productos alimenticios fermentados tradicionales por

todo el mundo. Además, *A. oryzae* es genómicamente bien caracterizado y considerado como un organismo seguro para la producción de enzimas alimentarias porque carece de etiquetas de secuencia expresadas por los genes responsables de la producción de aflatoxina [1].

Las aflatoxinas son microtoxinas producidas en pequeñas concentraciones por microorganismos del género *Aspergillus*. Los más notables son *Aspergillus flavus*, *niger* y *parasiticus*. También pueden ser producidas por hongos del género *Penicillium* [23].

El género *Aspergillus* se considera no tóxico y utilizado para la nutrición humana y animal. El hongo filamentoso *Aspergillus* es considerado de gran importancia económica debido a su producción de metabolitos como las enzimas [4]. Algunos estudios han señalado la prometedora producción enzimática de SSF con diferentes residuos orgánicos como harina de soja, trigo y arroz, pieles de naranja, manzana y plátano [3].

Por lo tanto, la fermentación sólida permite reducir el valor del producto final y puede considerarse respetuoso con el medio ambiente, ya que utiliza materias primas de bajo costo rechazadas como residuo en la industria agrícola durante su proceso de producción [3].

Por otro lado, la mayoría de los antioxidantes fenólicos derivados de plantas se presentan en formas conjugadas con residuos de azúcar, lo que reduce su biodisponibilidad. Las preparaciones de enzimas que escinden carbohidratos, es decir, celulasas y pectinasas, pueden hidrolizar estos glucósidos liberando las agliconas fenólicas. En consecuencia, la fermentación con hongos filamentosos con alta actividad de carbohidrasa puede facilitar este proceso y mejorar la biodisponibilidad de los fenólicos antioxidantes [10].

2.11 Extracción

En la extracción de los fenoles a partir de material vegetal, las extracciones de disolvente son los procedimientos más comúnmente utilizados para preparar extractos debido a su facilidad de uso, eficiencia y amplia aplicabilidad [32]. El tipo de disolvente empleado determina el tipo de compuestos a extraer y la capacidad de extracción de compuestos fenólicos es mayor dependiendo de la polaridad del disolvente [25].

Además, el rendimiento de la extracción química depende también del tiempo de extracción y temperatura, relación de muestra y solvente, así como la composición química y las características físicas de las muestras [32].

Los compuestos fenólicos también pueden asociarse con otros componentes de la planta, como los carbohidratos y las proteínas. Por lo tanto, no hay un procedimiento de extracción universal adecuado para la extracción de todos los fenólicos vegetales. Dependiendo del disolvente utilizado durante la extracción, una mezcla diferente de fenólicos solubles en el disolvente se extraerá de los materiales vegetales. También pueden contener algunas sustancias no fenólicas como el azúcar, ácidos orgánicos y grasas [32].

Disolventes, como el metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, y sus combinaciones se han utilizado para la extracción de fenólicos de materiales vegetales, a menudo con diferentes proporciones de agua [33]. La selección del disolvente adecuado afecta a la cantidad y la velocidad de los polifenoles extraídos [32].

En particular, se ha constatado que el metanol es más eficaz en la extracción de polifenoles de menor peso molecular, mientras que los flavonoles de pesos moleculares superiores se extraen mejor con acetona acuosa. El etanol es otro buen solvente para la extracción de polifenoles y es seguro para el consumo humano [32].

En la preparación de extractos fenólicos ricos en antocianinas de materiales vegetales, se utiliza un disolvente orgánico acidificado, metanol o etanol. Este sistema de disolventes desnaturaliza las membranas celulares, disuelve simultáneamente las antocianinas y las estabiliza. Sin embargo, se debe tener cuidado y evitar añadir un exceso de ácido que puede hidrolizar los residuos durante los pasos de concentración [33].

Además, muchos compuestos fenólicos se pueden fácilmente hidrolizar y oxidar. Tiempos de extracción largos y altas temperaturas aumentan la posibilidad de oxidación de fenólicos que disminuyen el rendimiento de estos en los extractos [32]. Se han notificado periodos de extracción generalmente variando de 1 min a 24h [33].

3. Material y métodos

Tabla 3. Material, productos y reactivos.

Instrumentos y equipos	Material fungible	Reactivos
Báscula analítica <i>Cobos aw 220</i>	Viales de 50 mL	Etanol
Multiagitador magnético <i>SBS Multipoint</i>	Espátula	Agua MilliQ
Centrifugador <i>Orto-Alresa</i>	Micropipeta 100-1000 μ L	Ácido Clorhídrico (37%) (FRAP y Taninos)
Espectrofotómetro <i>FLUOStar Omega</i>	Puntas para micropipeta de 100- 1000 μ L	Metanol
Vórtex Agitador de tubos <i>SBS</i>	Probetas 10 mL	Folin Ciocalteu (TP)
Agitador orbital <i>Ika Laborte</i>	Imanes	Carbonato de sodio 20% (TP)
Espectrofotómetro IR <i>Perkin Elmer</i>	Placas para espectrofotómetro	Tricloruro de aluminio hexa - hidratado (Flavonoides)
	Pipeta multicanal	Ácido acético (Flavonoides y FRAP)
	Micropipeta 20-200 μ L	Metanol (Flavonoides y DPPH)
	Eppendorf 1,5 mL	DPPH
	Papel de aluminio	Acetato de sodio trihidratado (FRAP)
	Papel filme	TPTZ (FRAP)
	Matraz aforado 5, 10 y 500 mL	Cloruro de hierro hexahidratado (FRAP)
	Vial ámbar	ABTS

	Vasos de precipitados	Vainillina (Taninos)
	Pinzas	Aceite de girasol microfiltrado
	Puntas para micropipeta de 20-200 μ L	

3.1 Cáscara de nuez pecana

Las nueces pecanas (*Carya illinoensis*) se recolectaron a 1.090m sobre el nivel del mar (coordenadas 25 ° 45 ' 32 ' ' N, 102 ° 58 ' 58 ' ' W) en San Pedro, Coahuila, que se encuentra en el norte de México. Posteriormente se hizo una separación manual de la cáscara. Las cáscaras se molieron en un molino de Wiley (Arthur Thomas, Filadelfia, PA) equipado con una pantalla de 2 mm.

3.1.1 Extrusión

El polvo de la cáscara se procesó en un extrusor co-giratorio con un tornillo gemelo (BCTM-30 Bühler, Uzwill, Suiza) con una longitud de 800 milímetros, 30 milímetros de diámetro, y L/D = 20 tornillos. La cáscara se procesó con un caudal fijo de alimentación de 7,79 kg/h de materia seca. Las condiciones fueron de 150 rpm, 70°C y humedad constante. La cáscara tanto extruida como el control (sin tratamiento) se secó a 60°C en un horno de convección de aire (Edel ingenieros, Monterrey, México) hasta obtener una humedad final del producto del 11%. Se molió para pasar una malla 50 y se almacenó a temperatura ambiente hasta que se analizó.

3.1.2 Preparación del inóculo y SSF

Las muestras de hongos AO se incubaron en Agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 30°C durante 7 días. Las esporas se recolectaron, se suspendieron en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 7) y se contaron. La concentración de esporas utilizada como inóculo fue de 10 esporas/g de medio sólido.

Para cultivar AO, 10g de la muestra con actividad de agua (AW) de 0,98 se esterilizó en un frasco de vidrio de 250 mL, y se dejó enfriar. Después, se añadió 1,0 mL de suspensión de esporas. La humedad se ajustó a 50% y la AW a 0,9. El SSF se llevó a cabo a 30°C con una humedad relativa del 93% durante 7 días. Los experimentos se realizaron por duplicado. Las muestras se sacaron de la incubadora y se liofilizaron para el análisis.

3.1.3 Extracción

3.1.3.1 Disolvente disolución etanol: agua

Para la extracción de los antioxidantes presentes en las muestras, se utiliza en primer lugar una disolución acuosa de etanol, en proporción 80:20 [18].

- Se pesa 1g de cáscara de nuez (sin extruir y extruida).
- Se añaden 7 mL del disolvente.
- Se agita durante 1h mediante el multiagitador con imán.
- Se retira el imán y se introducen las muestras en el centrifugador (*Orto Alresa*), para separar las dos fases, durante 15 minutos a una velocidad de 2500 rpm.
- Se extrae el sobrenadante, que contendrá los compuestos antioxidantes a analizar, y se añade al residuo 3 mL más de disolvente para una segunda extracción.
- Se centrifuga 10 min a 2500 rpm.

Se extrae de nuevo el sobrenadante, y se deshecha la parte sólida, ya que se trata de la cáscara inerte.

En este proceso, se puede observar cómo varía el color del extracto (Figura 12) entre las muestras, tanto los controles, como las extruidas y las fermentadas. Las muestras tomadas a partir de los 4 días de sembrado presentan un color verde, característico del hongo, evidencia del crecimiento de este en la cáscara. Este no es el color esperado, ya que ha perdido todo el color característico de la cáscara, y, por tanto, es posible que no haya captado todos los antioxidantes de ésta.



Figura 12. Extracciones muestras día 5 y día 2 disolvente etanólico

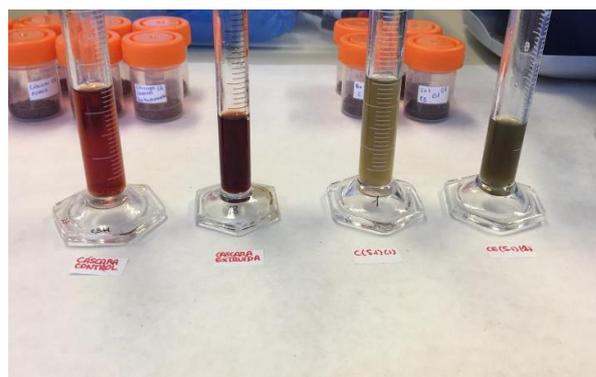


Figura 11. Extracciones muestras control y día 6 disolvente etanólico

En la Figura 11 se compara el color de la cáscara control y extruida sin tratamiento, y las muestras en el día 6 de fermentación.

Es evidente que a medida que han transcurrido los días y se ha producido crecimiento del hongo en las muestras, el color característico de la cáscara ha ido desapareciendo.

3.1.3.2 Disolvente disolución HCl-MeOH-Agua

En segundo lugar, en vista de los resultados obtenidos con el disolvente etanólico, que se comentaran más adelante en el apartado de Resultados, se decide extraer los antioxidantes con una disolución acuosa acidificada en proporción 1:80:10 [26].

Se pesan 200 mg de muestra y se añaden 4 mL de disolvente. Se agita durante 1h con el multiagitador con imán. Se centrifuga (*Orto Alresa*) 10 min a 2500 rpm para separar las fases. Se extrae el sobrenadante y se deshecha la parte sólida [26].

La Figura 14 recoge los extractos con este segundo disolvente. No pierden el color característico de la cáscara de nuez, incluso en los últimos días de fermentación.

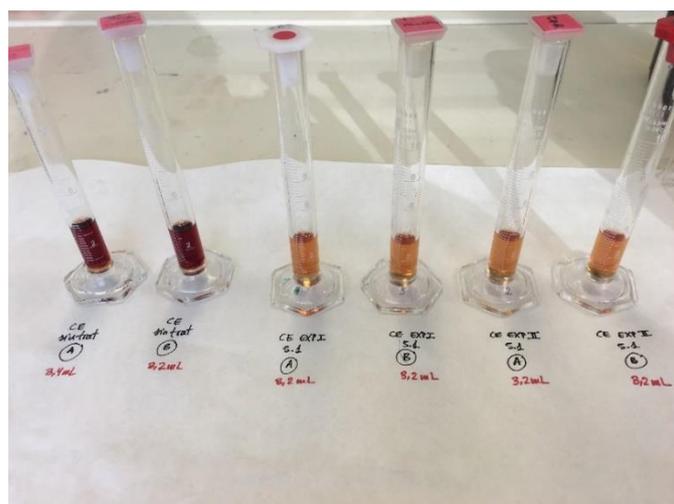


Figura 13. Extracciones muestras con disolvente acidificado.

Compuestos fenólicos

3.2 TPC

Se utilizó el método Folin-Ciocalteu para determinar el contenido fenólico total (TPC) según *Singleton et al.* [34], utilizando un espectrofotómetro de lector de microplacas UV-VIS FLUOStar Omega.

Se pipetea 20 μL de extracto de cada muestra (en la dilución adecuada) se añaden 80 μL de reactivo Folin-Ciocalteu DC y 80 μL de carbonato de sodio. Transcurrida una hora, se añaden 80 μL de agua MilliQ y se lee la absorbancia a 735 nm. El ácido gálico se usa para preparar la recta patrón ($y = 0,8291x - 0,0365$; $r^2 = 0,9929$; y es la absorbancia; x es la concentración). Los resultados se expresan en mg de ácido gálico equivalentes/g de muestra seca (mg GAE/g)

3.3 Flavonoides

Para medir los flavonoides totales, 150 μL de muestra se mezclaron con 50 μL de tricloruro de aluminio 20 mg/mL. Después de 30 min de incubación en la oscuridad a partir de la primera adición de tricloruro, se agitó la placa y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas UV-Vis FLUOStar Omega. Se usa la Rutina para preparar la recta patrón ($y = -0,3552x + 4,0494$; $r^2 = 0,9881$). Los resultados se expresan en mg ER/g DW.

3.4 Taninos condensados

El método de ensayo de vainillina según *Flores-Córdova et al.* [49], con algunas modificaciones, se llevó a cabo para la cuantificación de taninos condensados. Se añadieron 150 μL del extracto de cáscara a 1,5 mL de solución de vainillina con metanol al 4% (g/v) y 750 μL de HCl (37%). Después de 20 min de incubación en la oscuridad, la solución se midió a 500 nm en un lector de microplacas UV-Vis FLUOStar Omega. Se usa Rutina para preparar la curva patrón ($y = 1,5586x + 0,1523$; $r^2 = 0,9903$). El contenido total de taninos se expresa como equivalente de mg de Catequina en peso seco de muestra (mg EC/g).

Actividad antiradicalaria

Se utilizan dos métodos diferentes para la determinación de la actividad antiradicalaria del extracto de cáscara: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y el 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6- ácido sulfónico (ABTS).

3.5 DPPH

La actividad antiradicalaria DPPH de los extractos de cáscara de nuez no extruida y extruida se mide según el método descrito por *Gallego et al.* [35]. Se registra una medición inicial de absorbancia del reactivo de DPPH (200 μL) . 20 μL de extracto (extracción de polifenoles) se mezcla con DPPH en metanol. La absorbancia se mide a 517 nm durante un período de 75 min utilizando un

espectrofotómetro de lector de microplacas UV-VIS FLUOStar Omega. Se usa Trolox para preparar la recta patrón ($y = 0,0009x + 0,1387$; $r^2 = 0,98$). El resultado se expresa en $\mu\text{mol Trolox/g}$.

Se calcula el % de inhibición del DPPH: $\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \times 100$

3.6 ABTS

La actividad antiradicalaria ABTS de los extractos de cáscara se mide según el método descrito por *Gallego et al.* con algunas modificaciones [35]. El radical ABTS (7 mM) se mezcla con persulfato de potasio (2,45 mM). La solución se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16h. El reactivo ABTS^+ se prepara diluyendo el radical ABTS en PBS (pH 7,4) hasta que alcanza un valor de absorbancia entre $0,70 \pm 0,20$ a 734 nm. A continuación se añade en cada pocillo de la placa los extractos de la muestra (20 μL) y 10 minutos después se monitorea la absorbancia a 734 nm en el lector de microplacas UV-VIS FLUOStar Omega. Se usa Trolox para preparar la recta patrón ($y = 0,034x + 0,0801$; $r^2 = 0,9929$). El resultado se expresa en $\mu\text{mol Trolox/g}$.

Capacidad antioxidante reductora férrica

3.7 FRAP

La capacidad antioxidante reductora férrica se mide siguiendo el método con modificaciones de *Oyaizu (1988)* [49]. Se registra una medición inicial de absorbancia del reactivo FRAP (200 μL). 20 μL de extracto se mezclan con FRAP. Se lee la absorbancia 15 minutos después de la primera adición de la muestra a 700 nm mediante un lector de microplacas UV-VIS FLUOStar Omega. Se usa Trolox para preparar la recta patrón ($y = 2,9731x + 0,0474$; $r^2 = 0,9951$). El contenido total se expresa como en $\mu\text{mol Trolox/g}$.

3.8 DSC-OIT

(Differential Scanning Calorimetry- Oxidation Induction Time).

Se pesan 0,5 g de muestra control, cáscara estéril y cáscara estéril extruida, y de muestra fermentada del día 1 (muestra 0.1) del experimento 2, ya que es en el que se han obtenido mejores resultados. Se añaden 3 mL de aceite de girasol, exento de sus antioxidantes naturales (principalmente vitamina E) lo cual nos permite analizar el poder antioxidante de nuestras muestras. Se tapa cada vial con papel de aluminio para mantener las muestras en la oscuridad y se analizan en el DSC con flujo de oxígeno.

3.9 SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Se escanean las muestras control, cáscara fermentada y cáscara extruida fermentada: C 0.1, CE 0.1, C 3.1, CE 3.1, C 5.1 y CE 5.1, en estado sólido, en el laboratorio CSIC de la UB, con el microscopio de escaneo electrónico (“ nombre del microscopio”). En la Figura 20 se muestran dos de las muestras preparadas para insertarlas en el microscopio.

3.10 FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)

Las medidas de espectroscopia FTIR se realizaron con el espectrofotómetro IR Perkin Elmer. Los espectros de FTIR se registraron en la región de $4000-6000\text{ cm}^{-1}$. Para cada muestra se realizaron varios barridos. Se analizaron las mismas muestras que el análisis SEM: muestras control, cáscara fermentada y cáscara extruida fermentada: C 0.1, CE 0.1, C 3.1, CE 3.1, C 5.1 y CE 5.1.



Figura 14. Espectrofotómetro IR Perkin Elmer.

4. Resultados

4.1 TPC

TPC: Experimento 1 con disolvente etanólico.

Se realiza la primera prueba de TPC con muestras control y muestras del último día para ver la evolución y ver con qué dilución sería conveniente trabajar para que los valores de absorbancia se encontraran dentro de nuestra recta patrón. En la Tabla 4 se muestran los valores del extracto directo.

Tabla 4. Resultados medición Absorbancia para TP muestras Control y muestras último día de fermentación.

n = 2	Absorbancia	
Muestras	Promedio directo	Desviación estándar
Cáscara	4,58	0,000
Cáscara Extruida	4,35	0,023
Cáscara Estéril (C)	4,23	0,040
Cáscara Extruida Estéril (CE)	4,21	0.019
C 5.1	1,78	0,057
CE 5.1	3,53	0.011

Las muestras analizadas en este primer experimento son las muestras control, extruidas y esterilizadas y dos muestras del día 6 de fermentación.

Se puede ver que las cáscaras control contienen un número elevado de polifenoles totales y que, en el proceso de extrusión en las muestras fermentadas, estos aumentan considerablemente.

Se observa también, que las muestras contienen aparentemente menos cantidad de polifenoles a medida que el hongo crece. Se esperaba que este factor aumentara con la fermentación hasta alcanzar un valor máximo, y luego fuera disminuyendo debido al crecimiento del hongo según *Shin H.Y. et al* [55].

Se realiza el método para las muestras del Experimento 1 con factor de dilución 10 y 100, ya que los valores de absorbancia para el extracto directo son muy elevados y no es posible saber qué efecto habrá tenido la fermentación en las muestras en los días intermedios de crecimiento del hongo. Se toma como muestra control la cáscara estéril y la cáscara extruida estéril.

En la Tabla 5, se muestran los resultados en mg GAE/ g DW y en la Figura 15 se grafican los resultados obtenidos para los extractos con factor de dilución 10:

Tabla 5. Polifenoles totales del Experimento 1.

n = 3	mg GAE/g DW	Desviación estándar
C estéril	34,12	0,004
CE estéril	59,80	0,012
C 0.1	35,90	0,013
CE 0.1	70,82	0,024
C 1.1	22,95	0,005
CE 1.1	52,32	0,048
C 1.2	21,58	0,015
CE 1.2	41,30	0,006
C 2.1	23,51	0,008
CE 2.1	37,89	0,001
C 2.2	15,42	0,008
CE 2.2	35,46	0,238
C 3.1	14,97	0,008
CE 3.1	20,20	0,156
C 3.2	11,89	0,012
CE 3.2	17,37	0,010
C 4.1	13,02	0,032
CE 4.1	14,44	0,010
C 4.2	10,79	0,000
CE 4.2	17,09	0,021
C 5.1	10,53	0,008
CE 5.1	18,71	0,020
C 5.2	8,47	0,015
CE 5.2	14,44	0,017

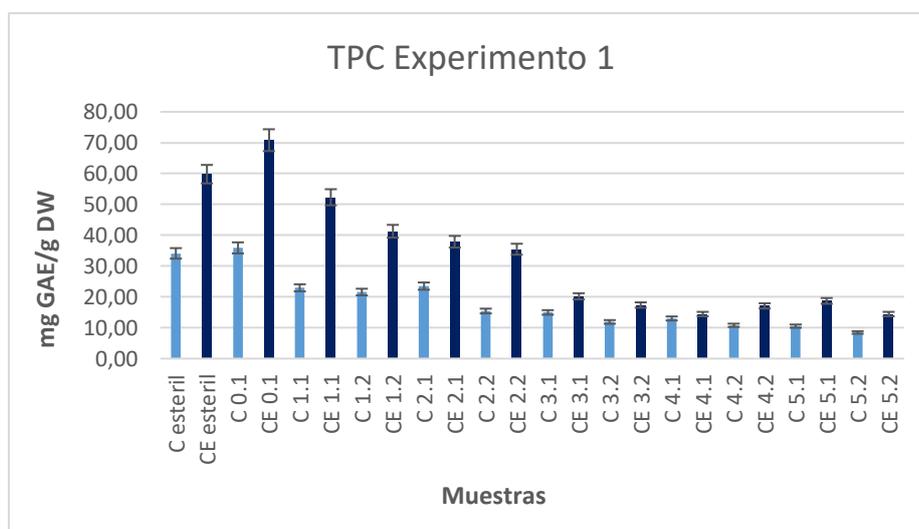


Figura 15. Gráfica resultados TP EXP1.

Como se esperaba, debido a los resultados obtenidos en las pruebas iniciales, los valores más elevados se encuentran en las muestras control y C 0.1 y CE 0.1. Éstas muestras fueron tomadas después de 12h de fermentación.

En la Figura 15, se visualiza la disminución de los polifenoles observada en el primer experimento realizado. Los valores más elevados corresponden a las muestras extruidas y éstas siguen la misma tendencia que las muestras de cáscara.

Se decide realizar una prueba con el disolvente acidificado y ver si este disolvente es más adecuado para la extracción de los polifenoles en la cáscara.

También se decide realizar los siguientes experimentos con factor dilución 1:10 y 1:100, ya que con extracto directo los valores de absorbancia no se encuentran en el rango de la recta patrón (0,2-1,2 absorbancia).

TPC: Experimento 1 con disolvente acidificado.

Se realiza un primer experimento con la cáscara control extruida, sin tratamiento y extruida 5.1 para comparar resultados con el disolvente etanólico. Se analizan las muestras por triplicado y se realizan las extracciones por duplicado.

Tabla 6. Resultados muestras extracción disolvente acidificado.

n = 3	mg GAE / g DW	Desviación estándar
CE Est.(A)	149,25	0,033
CE Est.(B)	163,84	0,003
CE1 5.1 (A)	30,78	0,008
CE2 5.1 (A)	27,88	0,006

Comparando estos resultados con los encontrados en la prueba con el disolvente etanólico, se puede ver que este disolvente consigue extraer mejor los polifenoles totales de las muestras, ya que los valores de GAE aumentan considerablemente. En el caso de CE 5.1 aumentan de $18,71 \pm 0,02$ mg GAE/g DW a aproximadamente $30 \pm 0,008$ mg GAE/g DW.

Por lo tanto, se realizará de nuevo el análisis de los polifenoles totales y los siguientes métodos de análisis de los antioxidantes con las extracciones con el disolvente acidificado.

TPC: Experimento 1 y 2 con disolvente acidificado.

Se realiza el método Folin-Ciocalteu para los experimentos 1 y 2 con factor de dilución 10 y 100. Las muestras se han analizado por triplicado. A partir de este experimento de polifenoles totales se decide que la dilución 1:10 es la más adecuada para realizar todos los métodos antioxidantes ya

que los valores de absorbancia se encuentran más ajustados en el rango de linealidad ya comentado.

Tabla 7. Polifenoles totales del Experimento 1.

n = 3	mg GAE / g DW	Desviación estándar
C estéril	37,26	0,056
CE estéril	78,58	0,090
C 0.1	27,86	0,023
CE 0.1	73,10	0,072
C 1.1	33,25	0,025
CE 1.1	51,60	0,053
C 1.2	22,02	0,005
CE 1.2	57,38	0,079
C 2.1	22,45	0,038
CE 2.1	45,34	0,133
C 2.2	20,15	0,016
CE 2.2	32,43	0,048
C 3.1	11,91	0,012
CE 3.1	30,45	0,030
C 3.2	8,73	0,009
CE 3.2	27,41	0,090
C 4.1	19,11	0,002
CE 4.1	27,88	0,014
C 4.2	15,22	0,045
CE 4.2	30,96	0,136
C 5.1	12,12	0,027
CE 5.1	20,98	0,032
C 5.2	8,30	0,043
CE 5.2	26,42	0,068

Se realiza el análisis para el Experimento 2 para comprobar este resultado.

Tabla 8. Polifenoles totales EXP 2.

n = 3	mg GAE/ g DW	Desviación estándar
C estéril	37,86	0,056
CE estéril	77,49	0,090
C 0.1	31,29	0,014
CE 0.1	74,01	0,055
C 1.1	25,71	0,036
CE 1.1	73,10	0,042
C 1.2	18,69	0,045
CE 1.2	60,03	0,061
C 2.1	27,26	0,057
CE 2.1	53,70	0,057
C 2.2	14,62	0,010
CE 2.2	35,22	0,049
C 3.1	16,38	0,047
CE 3.1	29,44	0,053
C 3.2	11,50	0,014
CE 3.2	28,68	0,081
C 4.1	13,60	0,008
CE 4.1	28,31	0,040
C 4.2	10,61	0,028
CE 4.2	25,40	0,054
C 5.1	9,65	0,021
CE 5.1	22,89	0,065
CE 5.2	25,63	0,067

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la cuantificación de los polifenoles totales para el Experimento 2 y el resultado es prácticamente el mismo que el del Experimento 1.

En las Figuras 16 y 17 se grafican los resultados obtenidos en este análisis:

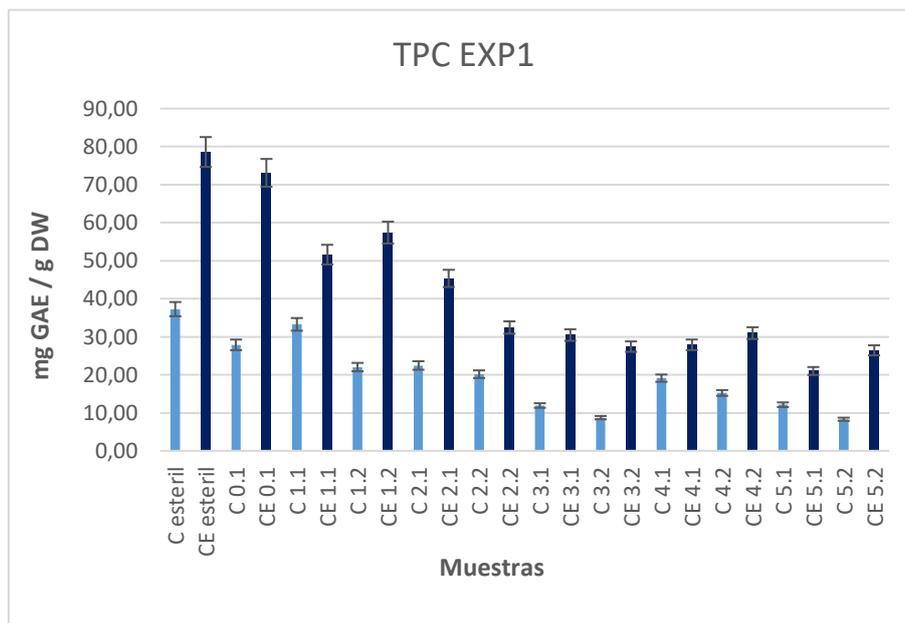


Figura 16. Gráfica de los resultados obtenidos en TP EXP1.

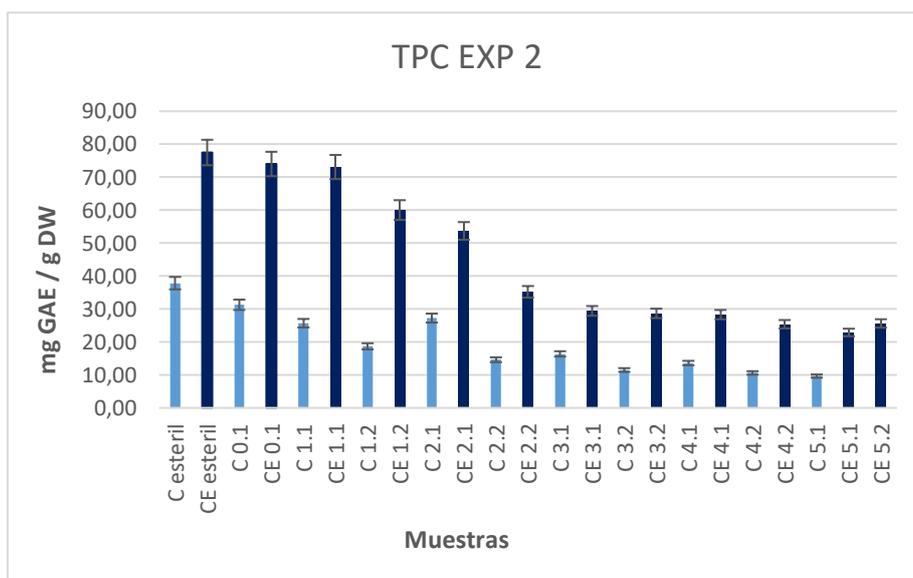


Figura 17. Gráfica de los resultados obtenidos en TP EXP2.

Los resultados obtenidos son mejores respecto a las muestras extraídas con disolvente etanólico. En cuanto a la cantidad de polifenoles totales en nuestras muestras, se observa como ya se había notificado en los anteriores ensayos, que las muestras extruidas muestran más cantidad que las muestras sin este tratamiento. Tanto en el EXP 1 como en el EXP 2, los valores son muy parecidos, aunque los valores del EXP 2 son un poco más elevados y la gráfica resultante desciende de manera más proporcional. Esto puede ser debido a errores cometidos en algún punto del proceso en el EXP 1.

Se calcula la disminución del contenido de fenoles totales respecto a la cáscara control (Tabla 9) y se grafican los resultados para observar la tendencia de disminución de TPC con el tiempo (Figura 18).

Tabla 9. Disminución de TPC EXP 1 respecto al tiempo de fermentación

Tiempo (h)	C	CE
12	-24%	-5%
24	-10%	-34%
36	-39%	-27%
48	-38%	-44%
60	-44%	-55%
72	-65%	-59%
84	-74%	-63%
96	-47%	-63%
108	-60%	-62%
120	-65%	-70%
132	-72%	-62%

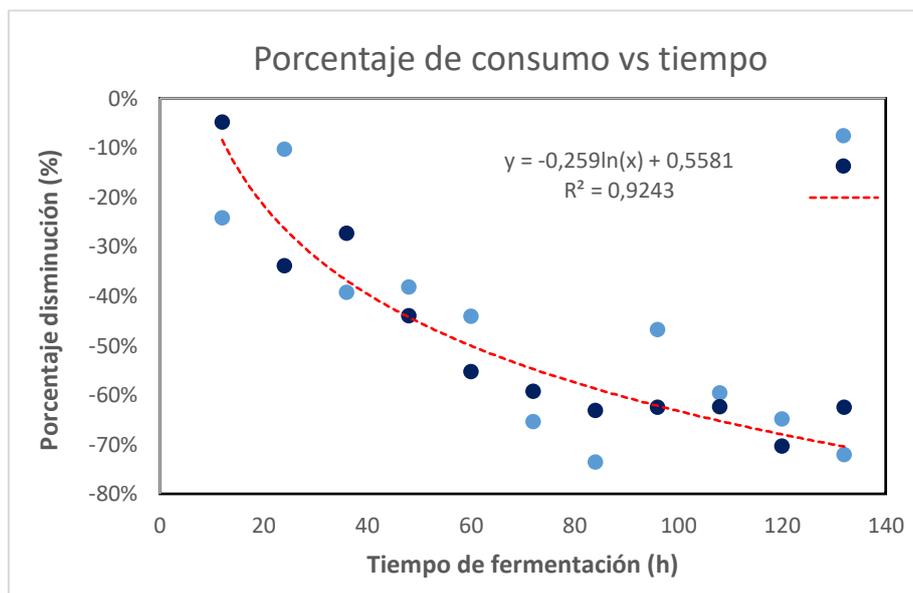


Figura 18. Porcentaje de disminución del TPC en función del tiempo de fermentación en horas.

A partir de este gráfico (Figura 18) se puede resaltar una tendencia logarítmica para la cáscara extruida. Para la cáscara se observa una tendencia no muy concreta, aunque puede ser debido a errores experimentales cometidos en el análisis o en la extracción.

4.2 FLAVONOIDES

Se realiza el análisis de flavonoides totales para los EXP 1 y 2. Las muestras se analizan por triplicado.

A continuación en las Tablas 10 y 11, se presentan los resultados en mg ER / g DW.

Tabla 10. Resultados obtenidos en el análisis de Flavonoides totales EXP 1.

n = 3	mg ER/ g DW	Desviación estándar
C estéril	6,70	0,019
CE estéril	8,16	0,004
C 0.1	5,34	0,014
CE 0.1	8,78	0,006
C 1.1	5,56	0,020
CE 1.1	6,20	0,043
C 1.2	4,13	0,015
CE 1.2	5,99	0,008
C 2.1	4,79	0,021
CE 2.1	3,98	0,007
C 2.2	3,94	0,008
CE 2.2	4,23	0,029
C 3.1	3,14	0,021
CE 3.1	4,02	0,008
C 3.2	2,55	0,008
CE 3.2	3,26	0,011
C 4.1	3,39	0,003
CE 4.1	2,85	0,007
C 4.2	2,87	0,004
CE 4.2	3,29	0,010
C 5.1	3,31	0,024
CE 5.1	3,25	0,012
C 5.2	2,96	0,029
CE 5.2	3,27	0,021

Tabla 11. Resultados obtenidos en el análisis de Flavonoides totales EXP 2.

n = 3	mg ER / g DW	Desviación estándar
C estéril	6,70	0,019
CE estéril	8,16	0,004
C 0.1	9,46	0,024
CE 0.1	13,37	0,018
C 1.1	10,57	0,029
CE 1.1	21,02	0,047
C 1.2	6,99	0,008
CE 1.2	12,50	0,006
C 2.1	7,77	0,012
CE 2.1	6,01	0,003
C 2.2	5,14	0,004
CE 2.2	8,74	0,008
C 3.1	5,93	0,008
CE 3.1	7,31	0,024
C 3.2	4,19	0,035
CE 3.2	7,94	0,045
C 4.1	5,34	0,008
CE 4.1	12,39	0,031
C 4.2	4,51	0,022
CE 4.2	7,00	0,031
C 5.1	3,68	0,022
CE 5.1	5,41	0,014
CE 5.2	4,60	0,006

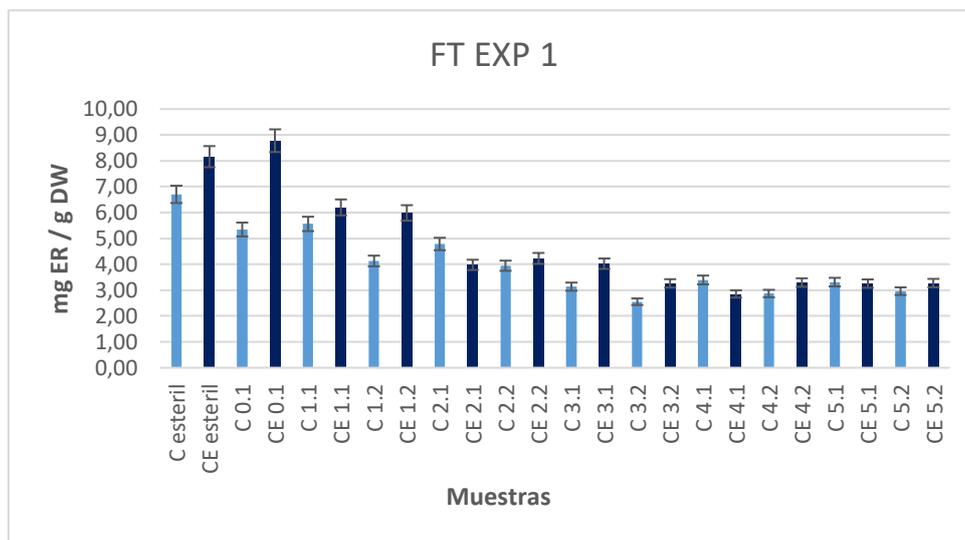


Figura 19. Gráfica resultados FT EXP 1.

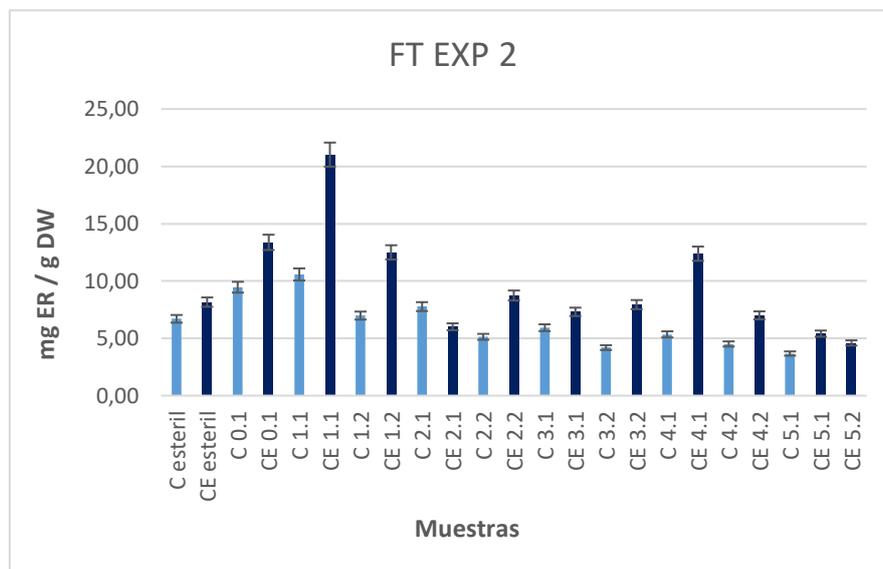


Figura 20. Gráfico resultados FT EXP 2.

A partir de los valores obtenidos se puede detectar que los valores de flavonoides presentes en las muestras son bajos en comparación al total de polifenoles cuantificados en el análisis Folin-Ciocalteu. El valor más elevado se encuentra en la muestra CE 1.1, cáscara extruida en el día 2 de fermentación, en el experimento 2 y CE 0.1 en el EXP 1. Los valores para CE 1.1 son los siguientes:

Tabla 12. Resultados TPC y FT para los EXP 1 y 2 muestra CE 1.1.

mg ER / g DW EXP 1	mg ER / g DW EXP 2
6,20 ± 0,043	21,2 ± 0,047
mg GAE / g DW	mg GAE / g DW
51,60 ± 0,053	73,10 ± 0,042

En la Tabla 12, se puede ver que los resultados en el EXP 2 son más altos que en el EXP 1, en ambos análisis. Es posible que en este método se hayan cometido errores en el EXP 2 ya que en las Figuras 19 y 20, se representan los resultados obtenidos y la tendencia descendente de los valores en los anteriores resultados no se aprecia en el EXP 2.

4.3 Taninos condensados

Se realiza el análisis de taninos con el extracto directo, ya que la cáscara no presenta este polifenol en grandes cantidades, según bibliografía, excepto para las muestras control, 0.1, 1.1 y 1.2, ya que

presentan valores de absorbancia por encima de la linealidad de la recta patrón (0,19- 1,66), para la cual se utiliza Catequina.

A continuación en la Tabla 13 y la Tabla 14, se presentan los resultados del método de taninos condensados y en las Figuras 21 y 22 se representan estos valores.

Tabla 13. Resultados análisis Taninos condensados EXP 1 directo y FD 10.

n = 3	Catequina en μM	Desviación estándar
C estéril	0,50	0,016
CE estéril	1,63	0,034
C 0.1	0,51	0,016
CE 0.1	1,75	0,007
C 1.1	0,61	0,021
CE 1.1	1,08	0,007
C 1.2	0,28	0,004
CE 1.2	1,03	0,016
C 2.1	0,37	0,002
CE 2.1	0,74	0,012
C 2.2	0,32	0,004
CE 2.2	0,64	0,027
C 3.1	0,12	0,006
CE 3.1	0,50	0,007
C 3.2	0,04	0,013
CE 3.2	0,47	0,002
C 4.1	0,30	0,018
CE 4.1	0,45	0,004
C 4.2	0,16	0,005
CE 4.2	0,47	0,009
C 5.1	0,09	0,019
CE 5.1	0,36	0,015
C 5.2	0,05	0,001
CE 5.2	0,46	0,017

Tabla 14. Resultados análisis Taninos condensados EXP 2 directo y FD 10.

n = 3	Catequina en μM	Desviación estándar
C estéril	0,50	0,016
CE estéril	1,63	0,034
C 0.1	0,51	0,016
CE 0.1	1,75	0,007
C 1.1	0,61	0,021
CE 1.1	1,08	0,007
C 1.2	0,28	0,004
CE 1.2	1,03	0,016
C 2.1	0,37	0,002
CE 2.1	0,74	0,012
C 2.2	0,32	0,004
CE 2.2	0,64	0,027
C 3.1	0,12	0,006
CE 3.1	0,50	0,007
C 3.2	0,04	0,013
CE 3.2	0,47	0,002
C 4.1	0,30	0,018
CE 4.1	0,45	0,004
C 4.2	0,16	0,005
CE 4.2	0,47	0,009
C 5.1	0,09	0,019
CE 5.1	0,36	0,015
CE 5.2	0,46	0,017



Figura 21. Gráfica análisis Taninos condensados EXP 1 directo y FD 10.

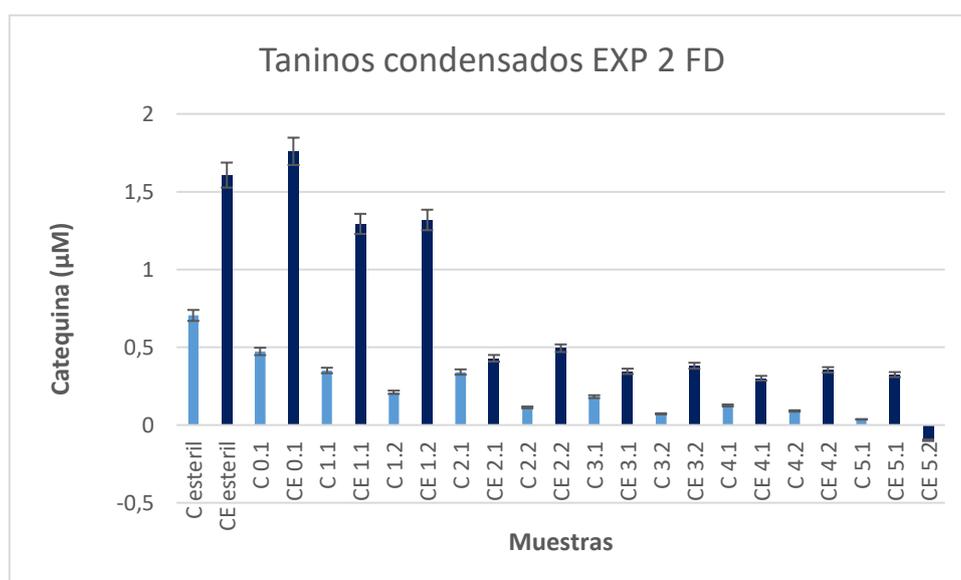


Figura 22. Gráfica análisis Taninos condensados EXP 2 directo y FD 10.

Los taninos condensados son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina, por tanto es de esperar que los valores de taninos sean mucho menores que los de Flavonoides totales. Se observa la tendencia descendiente como en los otros análisis de polifenoles, especialmente en el EXP 1, igual que en el caso de Flavonoides totales y prácticamente igual que en TP. No se analizan los taninos hidrolizables, ya que la cáscara contiene una cantidad muy pequeña de azúcares, que son necesarios para la formación de estos flavonoides [56].

A continuación, se presentan los resultados para los métodos de análisis de la actividad antiradicalaria.

4.4 DPPH

Se repite el experimento dos veces para el experimento 1, ya que, en un primer intento, el valor resultado del reactivo a tiempo 0 fue demasiado bajo, entre 0.7-0.8, por debajo de la unidad, lo que indica que el reactivo no se realizó correctamente o se mantuvo demasiado tiempo fuera del congelador, por lo que se redujo y los valores no fueron correctos.

En la Tabla 15 se muestran los resultados para el análisis DPPH y su gráfica en la Figura 23 para el EXP 1 y en la Tabla 16 y Figura 24, los resultados para el EXP 2.

Tabla 15. Resultados obtenidos en el análisis DPPH EXP 1.

n = 3	μmol ET / g DW	Desviación estándar
C estéril	154,53	0,009
CE estéril	173,91	0,009
C 0.1	146,97	0,037
CE 0.1	171,93	0,008
C 1.1	150,75	0,019
CE 1.1	170,48	0,010
C 1.2	122,54	0,003
CE 1.2	149,61	0,063
C 2.1	118,45	0,049
CE 2.1	152,12	0,036
C 2.2	121,82	0,039
CE 2.2	140,52	0,028
C 3.1	76,78	0,025
CE 3.1	134,92	0,037
C 3.2	87,93	0,020
CE 3.2	139,53	0,030
C 4.1	122,66	0,042
CE 4.1	130,57	0,030
C 4.2	105,80	0,022
CE 4.2	140,80	0,036
C 5.1	83,05	0,035
CE 5.1	126,76	0,025
C 5.2	86,29	0,012
CE 5.2	141,01	0,058

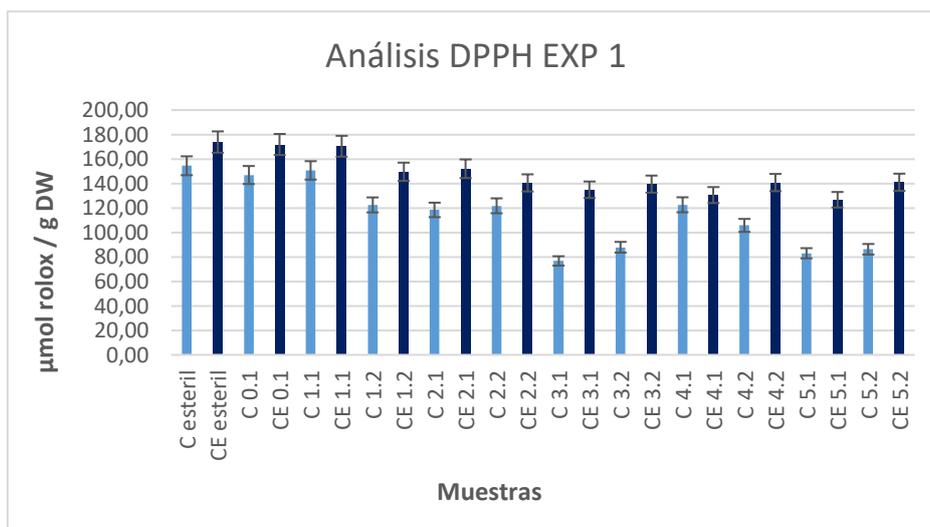


Figura 23. Gráfica análisis DPPH EXP 1.

Tabla 16. Resultados obtenidos en el análisis DPPH EXP 2.

n = 3	µmol ET / g DW	Desviación estándar
C estéril	154,53	0,009
CE estéril	173,91	0,009
C 0.1	157,60	0,026
CE 0.1	174,46	0,003
C 1.1	141,24	0,010
CE 1.1	124,15	0,032
C 1.2	135,74	0,023
CE 1.2	174,80	0,031
C 2.1	152,90	0,027
CE 2.1	174,91	0,014
C 2.2	112,42	0,017
CE 2.2	160,04	0,005
C 3.1	130,60	0,046
CE 3.1	151,44	0,058
C 3.2	133,43	0,022
CE 3.2	151,41	0,079
C 4.1	112,21	0,014
CE 4.1	149,59	0,034
C 4.2	116,23	0,031
CE 4.2	157,01	0,014
C 5.1	113,82	0,029
CE 5.1	150,95	0,052
CE 5.2	157,23	0,047

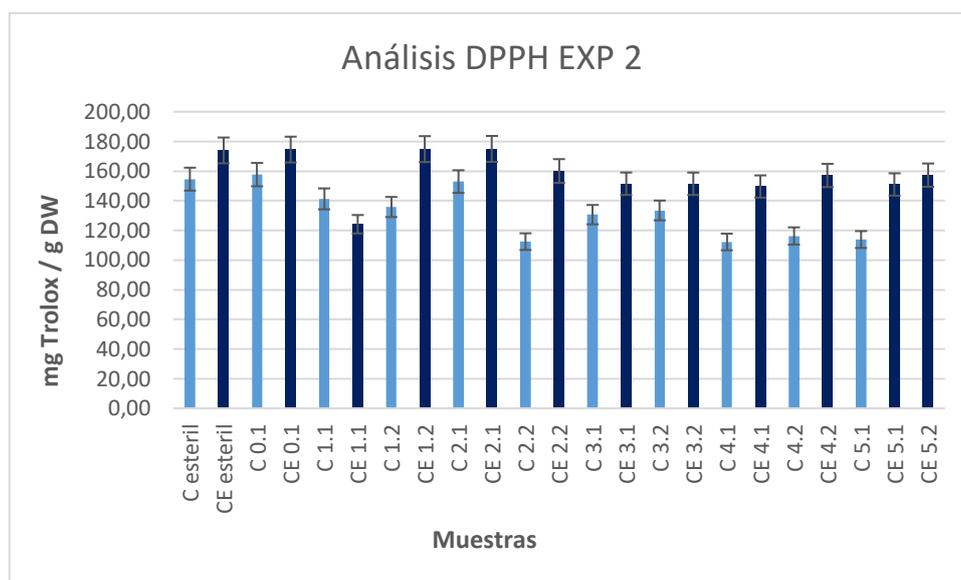


Figura 24. Gráfica análisis DPPH EXP 2.

Los resultados del análisis DPPH para la actividad antiradicalaria de las muestras son bastante elevados. Aunque no se observa ningún pico máximo, ni un aumento debido a la fermentación, la actividad antioxidante no oscila demasiado a lo largo del proceso. Por otro lado, se observa como el tratamiento de extrusión ha sido efectivo ya que las muestras extruidas presentan valores más elevados, tanto en el EXP 1 como en el EXP 2.

En este método el EXP 2 también presenta valores más elevados que el EXP 1.

A continuación se calcula el % de inhibición del DPPH para cuantificar los antioxidantes presentes y se presentan los resultados en la Figura 25:

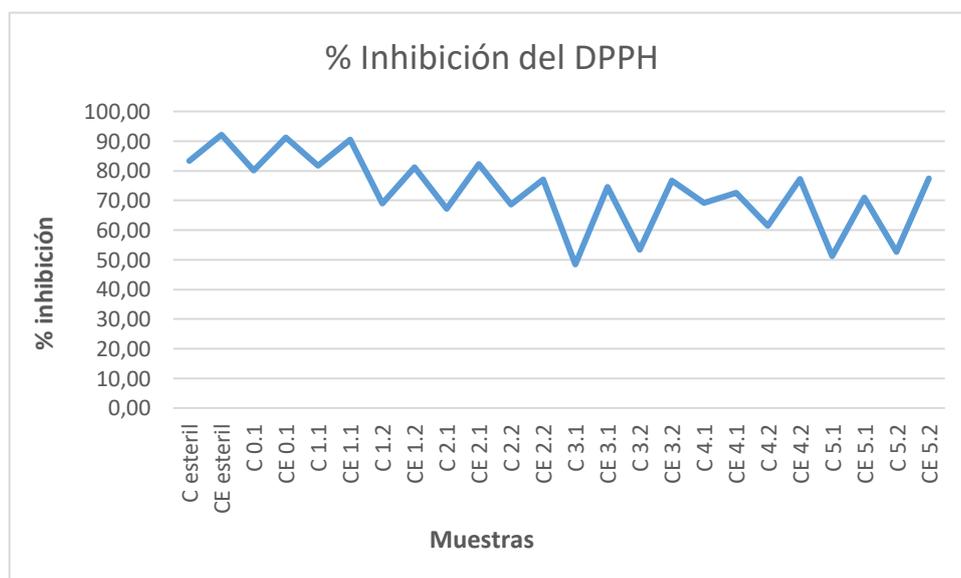


Figura 25. Gráfica % Inhibición del DPPH EXP 1.

DPPH* es un radical de nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, reaccionan lentamente o son inertes con DPPH*. Es posible que esto esté ocurriendo en nuestras muestras. A continuación, se realizará el siguiente método de barrido radical para determinar la actividad antioxidante, análisis ABTS.

4.5 ABTS

Este experimento se tuvo que repetir varias veces debido a la dificultad de estabilizar el reactivo ABTS en una absorbancia de 1 para poder realizar la reacción y a la facilidad de degradación de este reactivo, ya que se debe mantener en la oscuridad. A continuación se presentan los resultados en la Tabla 17 y la Tabla 18 para cada experimento.

Tabla 17. Resultados análisis ABTS EXP 1.

n = 3	$\mu\text{mol ET/}$ g DW	Desviación estándar
C estéril	2,39	0,088
CE estéril	1,40	0,020
C 0.1	1,89	0,122
CE 0.1	2,74	0,015
C 1.1	3,39	0,062
CE 1.1	2,83	0,070
C 1.2	3,89	0,061
CE 1.2	3,07	0,086
C 2.1	3,10	0,094
CE 2.1	1,09	0,069
C 2.2	1,20	0,031
CE 2.2	3,30	0,061
C 3.1	1,68	0,066
CE 3.1	2,02	0,033
C 3.2	1,62	0,046
CE 3.2	3,25	0,012
C 4.1	3,35	0,089
CE 4.1	3,35	0,046
C 4.2	2,03	0,085
CE 4.2	3,19	0,045
C 5.1	3,21	0,029
CE 5.1	1,21	0,068
C 5.2	2,02	0,020
CE 5.2	2,82	0,047

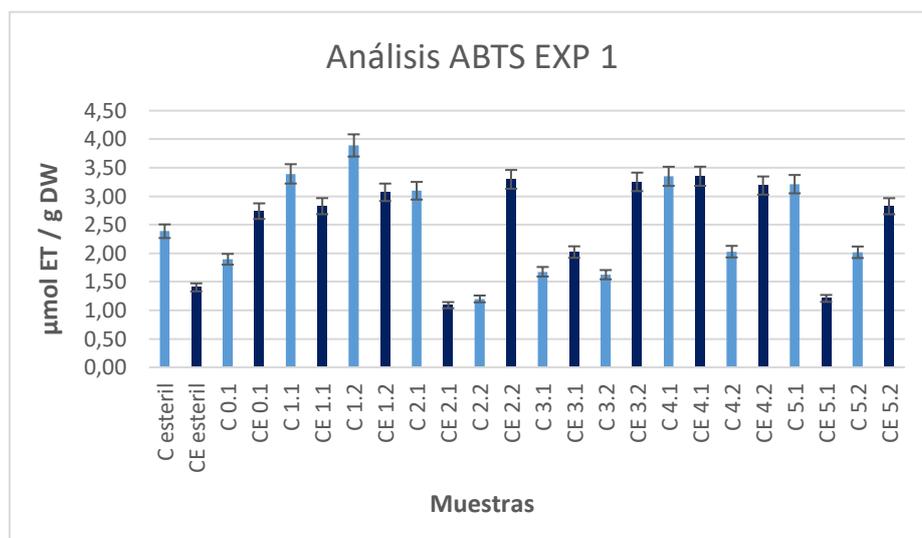


Figura 26. Gráfica análisis ABTS EXP 1.

Tabla 18. Resultado análisis ABTS EXP 2.

n = 3	μmol ET/ g DW	Desviación estándar
C esteril	2,39	0,088
CE esteril	1,40	0,020
C 0.1	1,41	0,015
CE 0.1	2,37	0,133
C 1.1	2,15	0,050
CE 1.1	2,12	0,135
C 1.2	2,98	0,065
CE 1.2	3,72	0,075
C 2.1	3,04	0,092
CE 2.1	3,47	0,077
C 2.2	2,57	0,037
CE 2.2	2,64	0,095
C 3.1	1,68	0,072
CE 3.1	1,70	0,041
C 3.2	2,68	0,007
CE 3.2	3,50	0,105
C 4.1	2,27	0,037
CE 4.1	3,30	0,076
C 4.2	2,30	0,056
CE 4.2	3,61	0,052
C 5.1	1,79	0,050
CE 5.1	3,79	0,059
CE 5.2	3,38	0,041

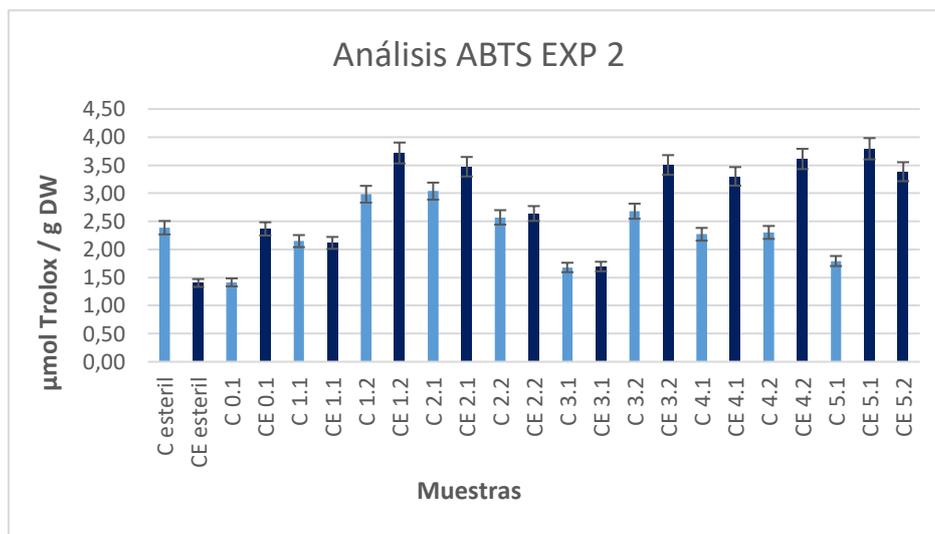


Figura 27. Gráfica análisis ABTS EXP 2.

Se descartan los resultados del EXP 1 ya que como se puede ver en la Tabla 17 y más visualmente en la Figura 26, los valores de las muestras extruidas son menores a las muestras de cáscara sin este tratamiento y además los resultados no se justifican con los obtenidos anteriormente en los otros métodos. En cambio en el EXP 2, aunque los valores siguen una tendencia no muy clara, las muestras extruidas presentan mayor capacidad antioxidante.

Además, tanto del análisis DPPH como del ABTS, podemos decir que las muestras no disminuyen su capacidad antioxidante de manera tan clara como ocurría en la cuantificación de polifenoles totales, flavonoides y taninos condensados. Por lo tanto, podría ser que las muestras hubieran aumentado su capacidad antioxidante con la fermentación aunque con otro tipo de compuestos. De todas maneras, estos tampoco son los resultados esperados, ya que se esperaba un incremento de la capacidad antioxidante en las muestras por efecto de la fermentación en estado sólido hasta alcanzar un máximo en el día 4 aproximadamente según *Shin, H.Y. et al.* [55].

4.6 FRAP

En los resultados del experimento se observó que la absorbancia para las muestras extruidas era demasiado alta, y estos valores no se encontraban en el rango de linealidad de la recta encontrada mediante patrones de Trolox. Por lo tanto, se decide diluir estas muestras a 1:100 y realizar de nuevo el experimento y los cálculos de las muestras extruidas con este factor de dilución.

A continuación se presentan los resultados en la Tabla 19 para el EXP 1 y en la Tabla 20 para el EXP 2. Se grafican los resultados en la Figura 28 y la Figura 29.

Tabla 19. Resultados obtenidos para el análisis FRAP EXP 1.

n = 3	μmol Trolox / g	Desviación estándar
C estéril	151,90	0,127
CE estéril	265,18	0,024
C 0.1	110,50	0,051
CE 0.1	273,15	0,033
C 1.1	170,03	0,047
CE 1.1	177,69	0,006
C 1.2	71,72	0,012
CE 1.2	187,14	0,002
C 2.1	90,92	0,247
CE 2.1	132,25	0,043
C 2.2	71,28	0,007
CE 2.2	104,50	0,026
C 3.1	40,83	0,053
CE 3.1	98,35	0,007
C 3.2	27,62	0,010
CE 3.2	73,96	0,022
C 4.1	75,85	0,109
CE 4.1	95,29	0,000
C 4.2	55,34	0,024
CE 4.2	74,64	0,021
C 5.1	39,66	0,006
CE 5.1	47,39	0,002
C 5.2	27,32	0,026
CE 5.2	61,24	0,011

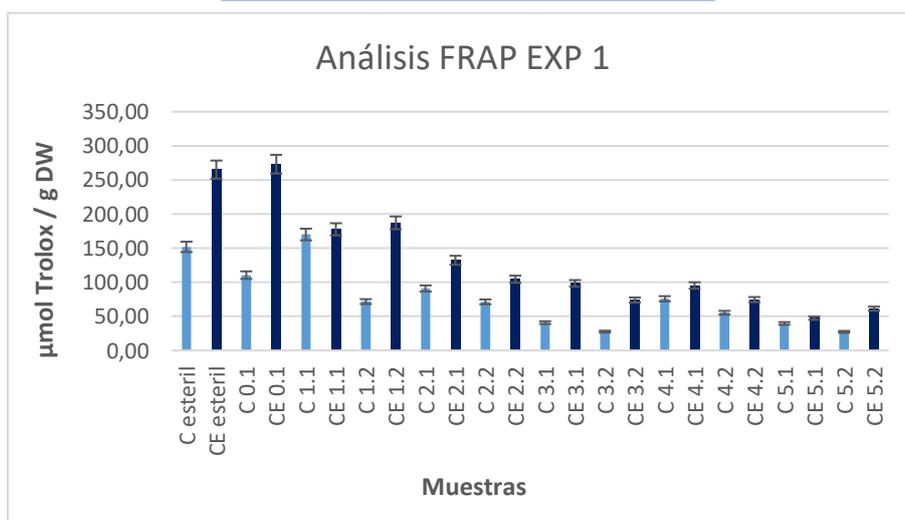


Figura 28. Gráfica análisis FRAP EXP 1.

Tabla 20. Resultados obtenidos para el análisis FRAP EXP 2.

n = 3	$\mu\text{mol ET} / \text{g DW}$	Desviación estándar
C estéril	151,90	0,127
CE estéril	265,18	0,024
C 0.1	151,05	0,061
CE 0.1	278,06	0,018
C 1.1	122,21	0,121
CE 1.1	256,00	0,007
C 1.2	86,37	0,038
CE 1.2	244,83	0,012
C 2.1	107,87	0,028
CE 2.1	166,43	0,011
C 2.2	57,13	0,043
CE 2.2	142,11	0,038
C 3.1	73,57	0,002
CE 3.1	90,78	0,015
C 3.2	44,66	0,031
CE 3.2	89,47	0,005
C 4.1	62,59	0,016
CE 4.1	85,12	0,028
C 4.2	44,97	0,023
CE 4.2	74,47	0,000
C 5.1	33,17	0,023
CE 5.1	81,46	0,014
CE 5.2	92,50	0,007

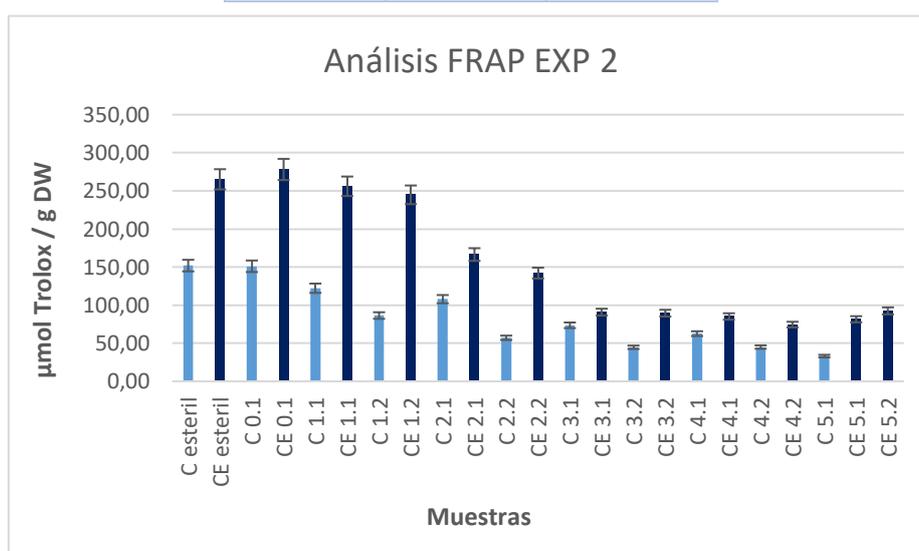


Figura 29. Gráfica análisis FRAP EXP 2.

En los resultados del ensayo FRAP se contemplan los mismos resultados a nivel cualitativo que en los otros experimentos de actividad antioxidante. Se presenta la misma tendencia descendente aunque en la muestra CE 0.1 (día 1 de fermentación) para los dos experimentos aumenten los valores un poco, a nivel cuantitativo, es un aumento despreciable. Como ocurre en los otros métodos, el EXP 2 presenta valores más elevados frente al EXP 1.

Por lo tanto, en los próximos análisis, DSC-OIT, SEM y FTIR se tomarán las muestras control y las muestras del EXP 2, ya que es el que presenta resultados más elevados.

A continuación se presenta una tabla resumen (Tabla 21) de los resultados obtenidos para el EXP 2 para los diferentes métodos en las muestras control, muestras del primer día y del último día y así poder realizar una discusión global de los resultados:

Tabla 21. Resultados análisis compuestos fenólicos y actividad antiradicalaria muestras.

Muestras	TPC (mg GAE / g DW)	Flavonoides (mg ER/ g DW)	Taninos condensados (mg EC/g DW)	DPPH (μmol Trolox/ g DW)	ABTS μmol Trolox/ g DW	FRAP (μmol Trolox/ g DW)
Cáscara estéril	37,86 \pm 0,056	6,70 \pm 0,019	0,50 \pm 0,016	154,53 \pm 0,009	2,39 \pm 0,088	151,90 \pm 0,127
Cáscara extruida estéril	77,49 \pm 0,090	8,16 \pm 0,004	1,63 \pm 0,034	173,91 \pm 0,009	1,40 \pm 0,020	265,18 \pm 0,024
C 0.1	31,29 \pm 0,014	9,46 \pm 0,024	0,51 \pm 0,016	157,60 \pm 0,026	1,41 \pm 0,015	151,05 \pm 0,061
CE 0.1	74,01 \pm 0,055	13,37 \pm 0,018	1,75 \pm 0,007	174,46 \pm 0,003	2,37 \pm 0,133	278,06 \pm 0,018
C 5.1	9,65 \pm 0,021	3,68 \pm 0,022	0,09 \pm 0,019	113,82 \pm 0,029	1,79 \pm 0,05	33,17 \pm 0,023
CE 5.1	22,89 \pm 0,065	5,41 \pm 0,014	0,36 \pm 0,015	150,95 \pm 0,052	3,79 \pm 0,059	81,46 \pm 0,014

En los resultados presentados en la Tabla 21, se destaca la tendencia descendente de los valores en todos los análisis a medida que avanza el proceso de fermentación, hasta alcanzar el último día. En los análisis de compuestos polifenólicos cabe destacar que en el análisis de TPC, las muestras en el día 1 de fermentación presentan menos compuestos polifenólicos totales que las muestras control,

pero en los casos de los análisis de un polifenol en concreto, FT y Taninos, las muestras al inicio de fermentación aumentan en este factor.

Cabe destacar que las muestras extruidas presentan valores más elevados en todos los análisis de compuestos polifenólicos. Así pues, en cuánto al análisis de compuestos polifenólicos, las muestras que presentan valores más elevados son: cáscara estéril extruida (control), con $77,49 \pm 0,090$ mg GAE/g DW para el análisis TPC, CE 0.1 con $13,37 \pm 0,018$ mg ER/ g DW para flavonoides y CE 0.1 $1,75 \pm 0,007$ mg EC/ g DW para el análisis de Taninos condensados.

Por lo tanto, se puede señalar que en el análisis total de compuestos fenólicos no se observa aumento de estos compuestos con la fermentación, pero si se observa en el análisis concreto, ya que éste analiza un solo polifenol, cabe esperar que la diferencia en el análisis total sea debida a errores de medida, ya que la diferencia no es muy pronunciada. Además, en estos tres métodos, se expresan los resultados con diferentes compuestos equivalentes, por lo que no se pueden comparar de manera total.

En el caso de la actividad antiradicalaria, se observa en todos los casos un aumento de los valores por efecto de la fermentación y la extrusión en el primer día. La actividad antiradicalaria de ABTS, es el método que presenta valores más bajos, con valor máximo en la muestra CE 5.1 con resultado $3,79 \pm 0,059$ μ mol Trolox/ g DW. Esto puede ser debido a algún error en la medida, ya que no presenta correlación con los otros métodos de actividad antiradicalaria. En los análisis DPPH y FRAP, las muestras que presentan valores más elevados son CE 0.1, con resultados de $174,46 \pm 0,003$ y $278,06 \pm 0,018$ μ mol Trolox/ g DW, respectivamente. Por lo que, se destaca una mejora significativa de la actividad antioxidante y antiradicalaria como resultado de la extrusión. No se observa esta mejora en la fermentación, aunque podría existir crecimiento del hongo en el primer día de fermentación, se esperaba como se ha comentado ya anteriormente, un crecimiento exponencial de los valores en todos los análisis con la fermentación, como resultado de la liberación de compuestos fenólicos. Según *Shin, H.Y. et al* entre otros estudios [55], los compuestos fenólicos disminuyeron al autoclavar las muestras, ya que estos son altamente susceptibles a los procesos con calor, pero incrementaron con la fermentación hasta alcanzar un valor máximo en el día 4. Esto ocurre debido a que la β -glucosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces covalentes entre los compuestos fenólicos y las matrices de la pared celular. Esta enzima actúa sobre enlaces de glucosa. Por lo tanto, es posible que la fermentación no haya sido del todo efectiva debido a la composición de la cáscara, al no contener casi azúcares, es posible que no se haya alcanzado una fermentación adecuada o que las condiciones no fueran las más óptimas.

4.7 DSC-OIT

Este experimento se realiza con las muestras control y las muestras C 0.1 y CE 0.1 del EXP 2 ya que son las que han obtenido mejores resultados en los análisis de antioxidantes a un flujo de 100 mL de oxígeno a 130 °C.

La Figura 31 representa la concentración de oxígeno frente al tiempo de inducción oxidativa.

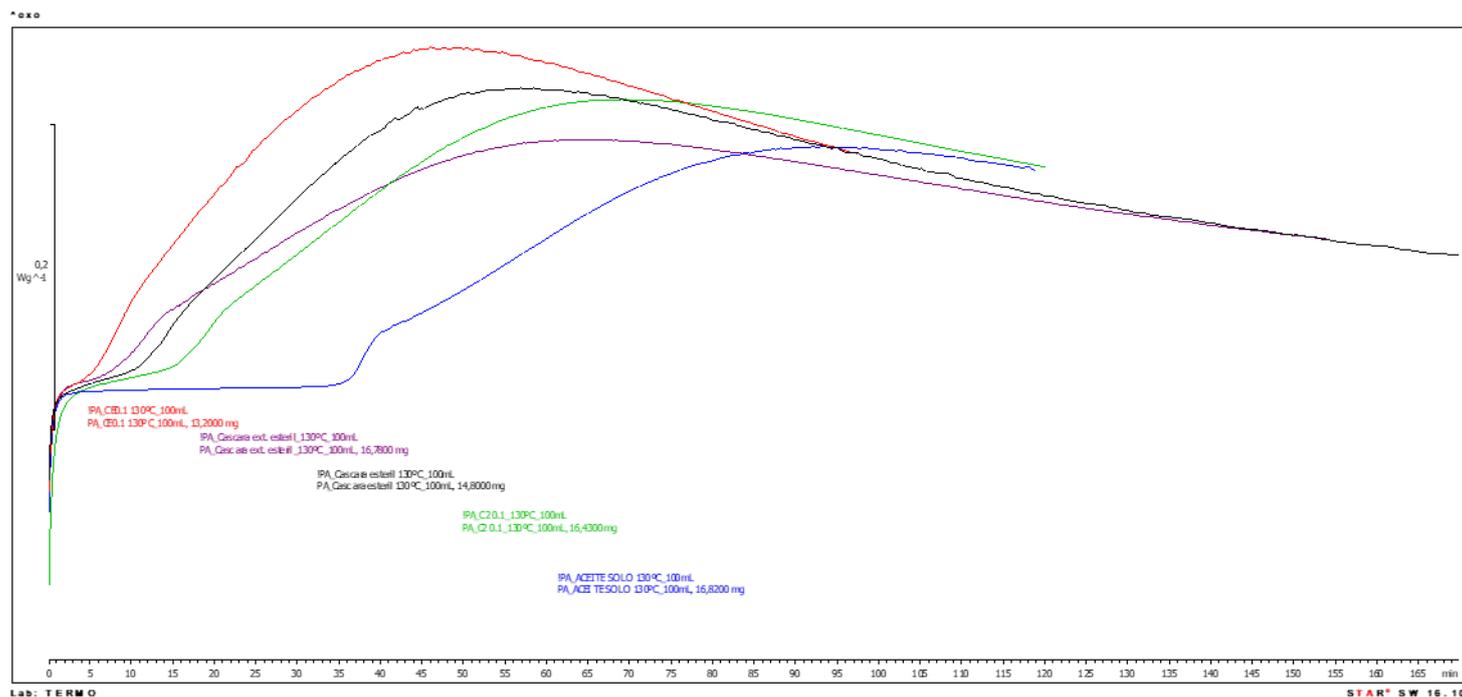


Figura 31. Resultados análisis DSC-OIT.

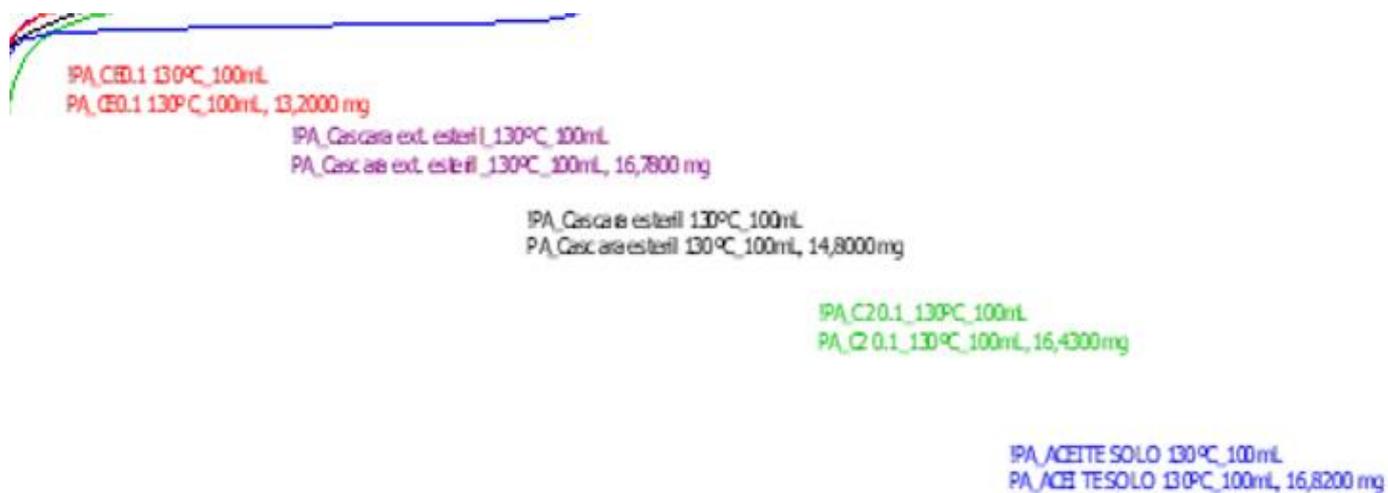


Figura 30. Muestras para el análisis DSC-OIT.

Se observa que la muestra control es la última en oxidarse mientras que las otras tienen comportamientos similares, estando las muestras no fermentadas entre las fermentadas. Este comportamiento no es el esperado. La oxidación más rápida del aceite que contiene los extractos de cáscara puede ser debido a que la manipulación del aceite en el proceso de homogeneización haya potenciado la velocidad de oxidación. Por tanto, para comprobar el posible efecto antioxidante se habría de repetir sometiendo la muestra control al mismo proceso de incorporación de solvente

4.8 SEM

Para realizar una caracterización morfológica de las muestras y ver si su estructura ha cambiado o se puede detectar el crecimiento de las colonias del hongo en la cáscara, se lleva a cabo una microscopía electrónica de barrido. Se analizan las muestras control, muestras del primer día, muestras del día 4 y muestras del día 6.

En las siguientes imágenes se presentan los resultados obtenidos:

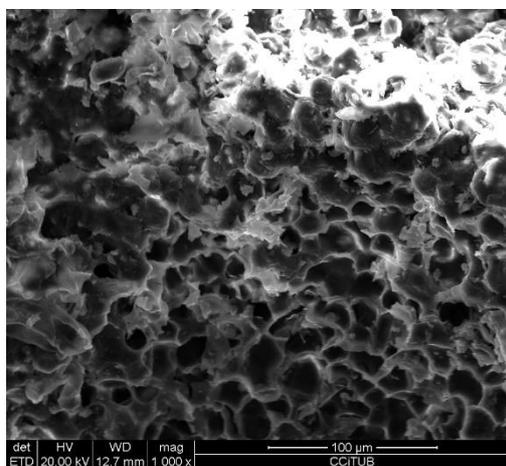


Figura 32. SEM de cáscara control.

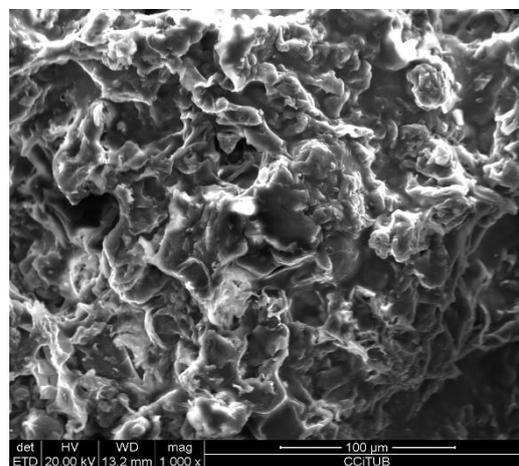


Figura 33. SEM de cáscara extruida control.

Las Figuras 32 y 33 corresponden a las muestras control, cáscara y cáscara extruida estériles. En estas dos muestras sin fermentar, podemos observar un cambio a nivel fisiológico, donde la muestra extruida tiene menos porosidad y se denota un cambio en su textura que es también visible macroscópicamente.

A continuación se presentan las imágenes para las muestras fermentadas:

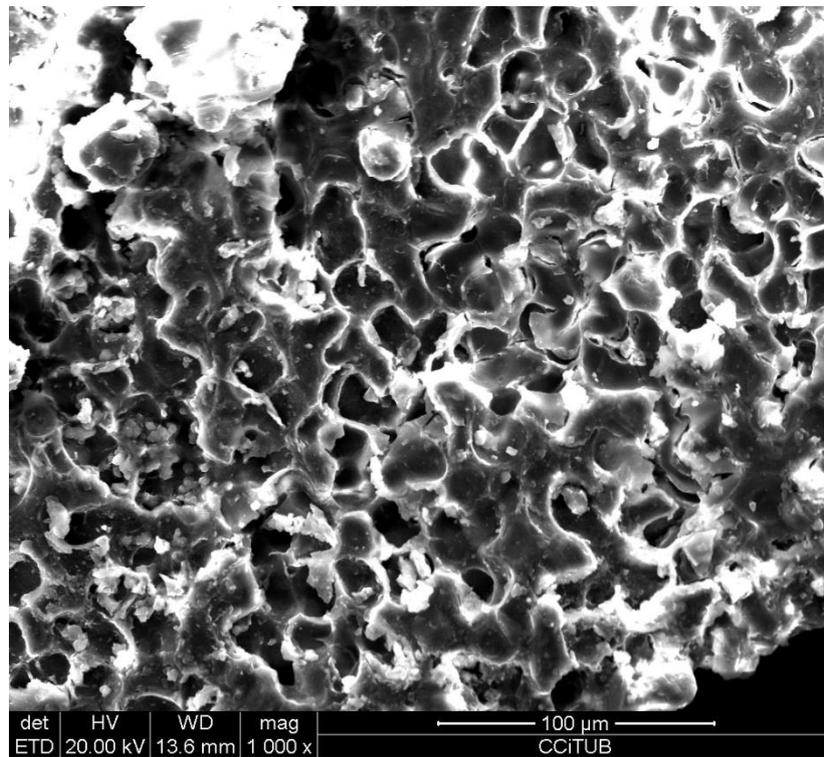


Figura 34. SEM muestra C 0.1.

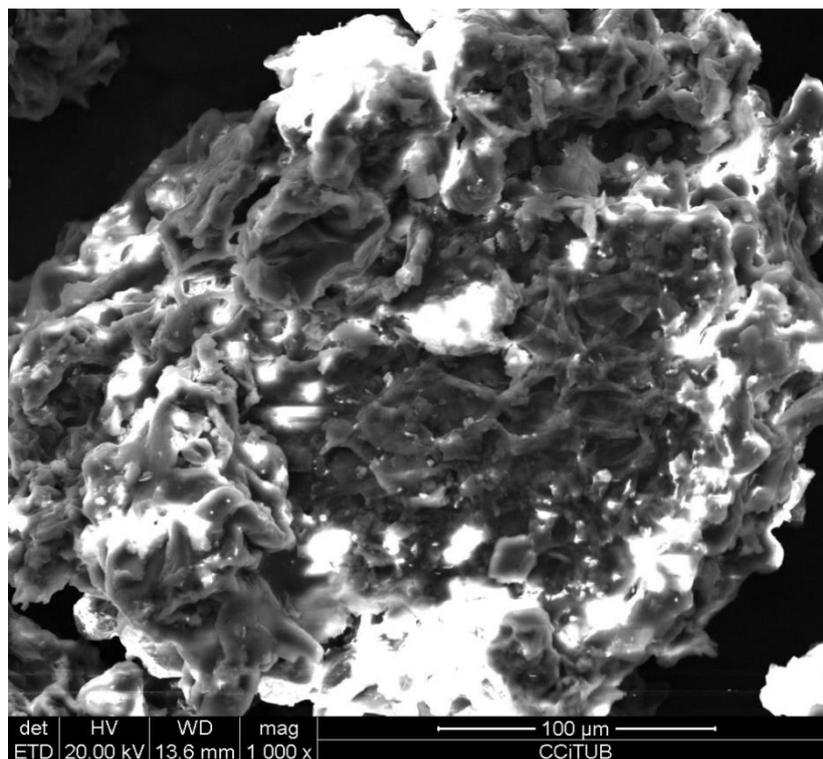


Figura 35. SEM muestra CE 0.1

En las imágenes de las muestras en el primer día de fermentación (Figuras 34 y 35) ya se pueden ver pequeños gránulos esféricos alrededor de la estructura de la cáscara que podrían ser colonias del hongo. La diferencia de porosidad y textura en la muestra sin extruir y la extruida es la misma que en las muestras control, aunque la muestra extruida fermentada presenta menos rugosidad.

A continuación se muestran las imágenes para las muestras del día 4:

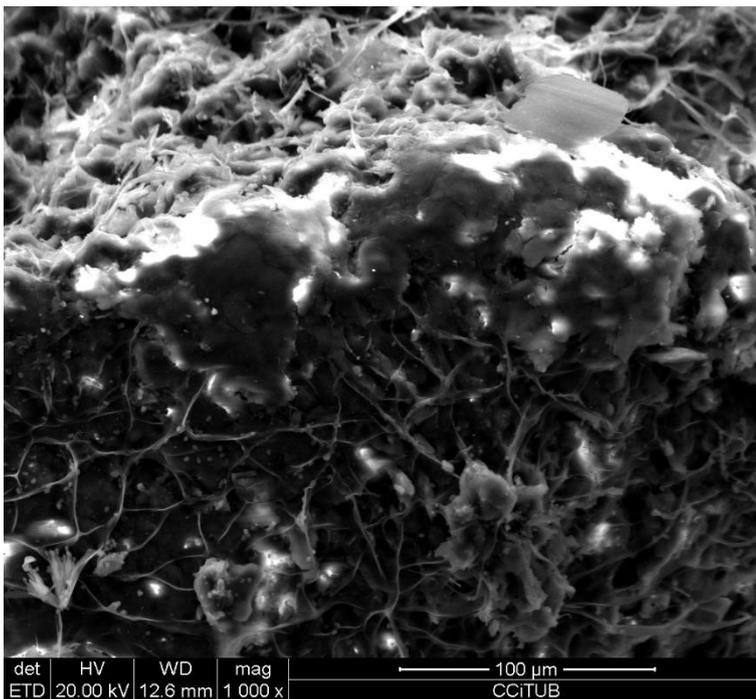


Figura 37. SEM muestra C 3.1 1000x.

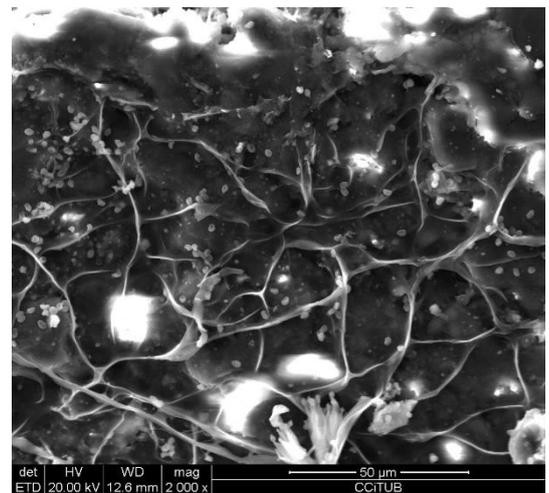


Figura 36. SEM muestra C 3.1 2000x

En la Figura 37 se presenta la cáscara 3.1, día 4 de fermentación. La cáscara presenta una estructura filamentosa y en la Figura 36 a 2000x, se pueden apreciar con más claridad las colonias de hongo.

En las Figuras 38 y 39 se muestra la cáscara extruida 3.1 a 1000x y 2000x. Se observa una estructura más compacta, más lisa, y se pueden apreciar también los gránulos, aunque no se puede apreciar mucha diferencia en este punto entre la cáscara sin extruir y la extruida.

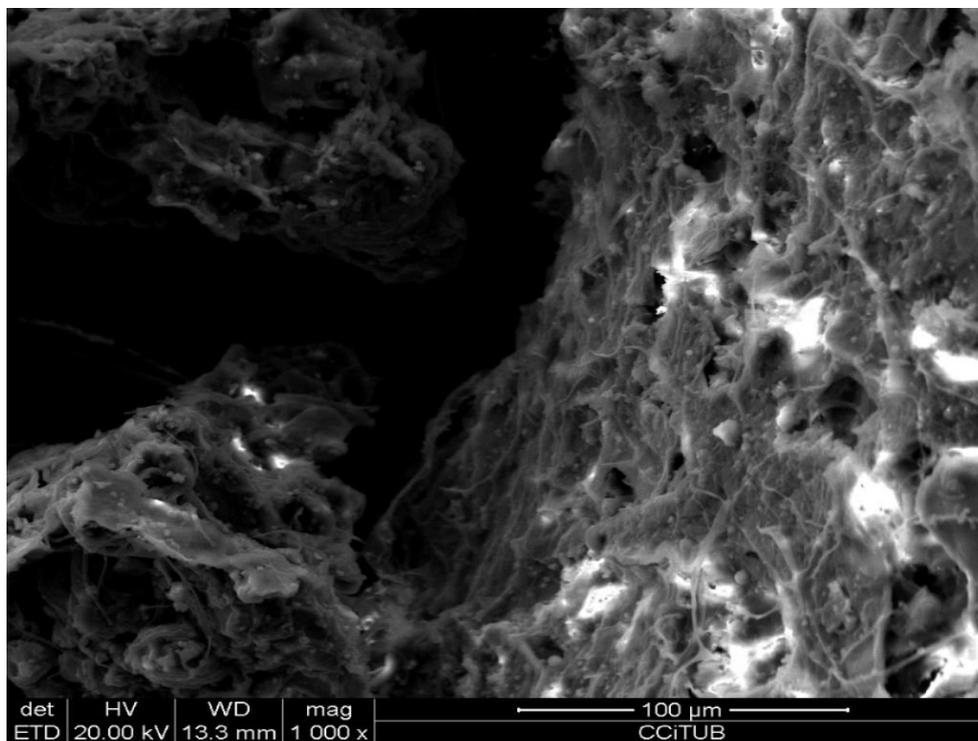


Figura 38. SEM muestra CE 3.1. 1000x.

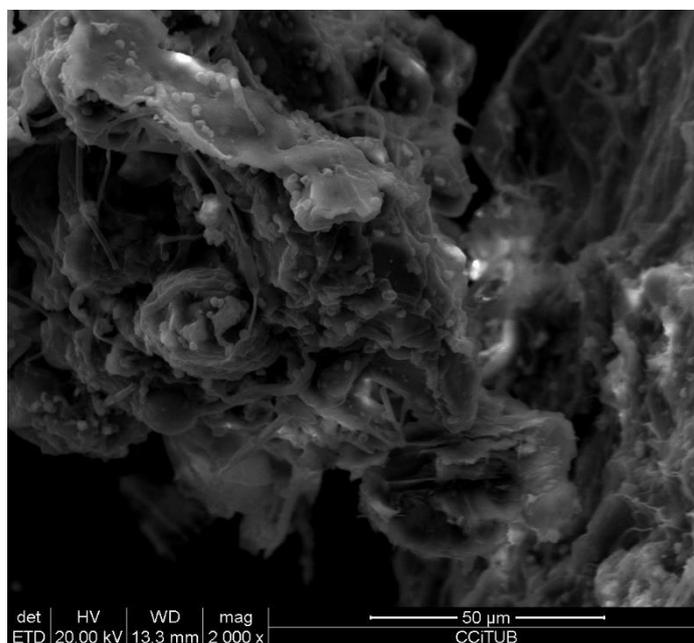


Figura 39. SEM CE 3.1 2000x.

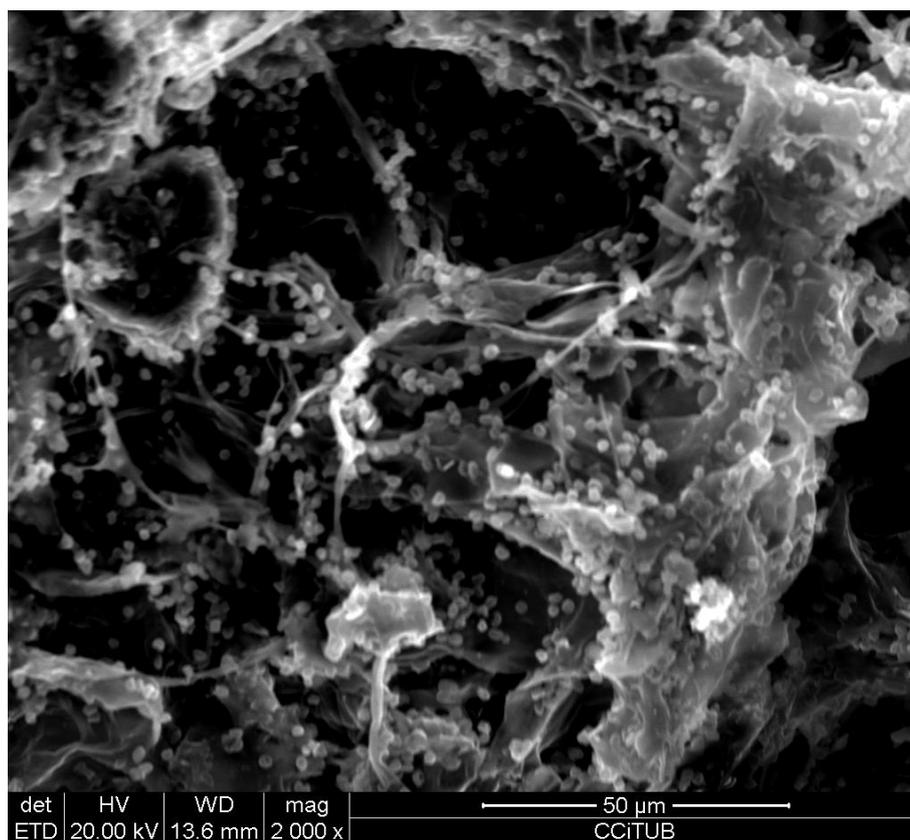


Figura 40. SEM muestra C 5.1 2000x.

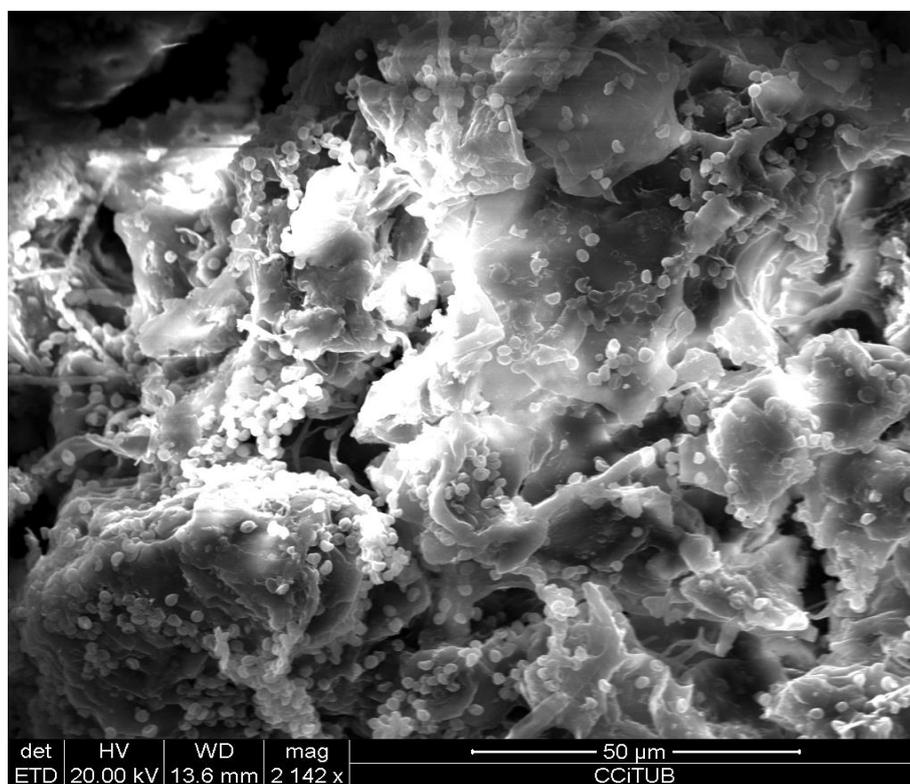


Figura 41. SEM muestra CE 5.1 2142x.

En las Figuras 40 y 41 se muestran los barridos para la muestra 5.1, tanto extruida como sin extruir. En este caso, último día de fermentación, se puede apreciar un crecimiento del hongo muy notable, cosa que podría afectar como se ha comentado con anterioridad en el análisis de los antioxidantes. En cuanto a estructura, la cáscara extruida presenta una estructura mucho más compacta, sin espacios y con más gránulos aparentemente correspondientes a colonias del hongo *Aspergillus oryzae*. Además, comparando con las muestras control, las muestras en el último día de fermentación presentan una estructura más filamentosa, sin orificios y con mucha menos porosidad.

4.9 FTIR

Se analizan con el espectrofotómetro de infrarrojo las muestras control y las muestras : C 0.1, CE 0.1, C 3.1, CE 3.1, C 5.1 y CE 5.1.

En la Figura 42, se muestran los resultados para la CE 0.1.

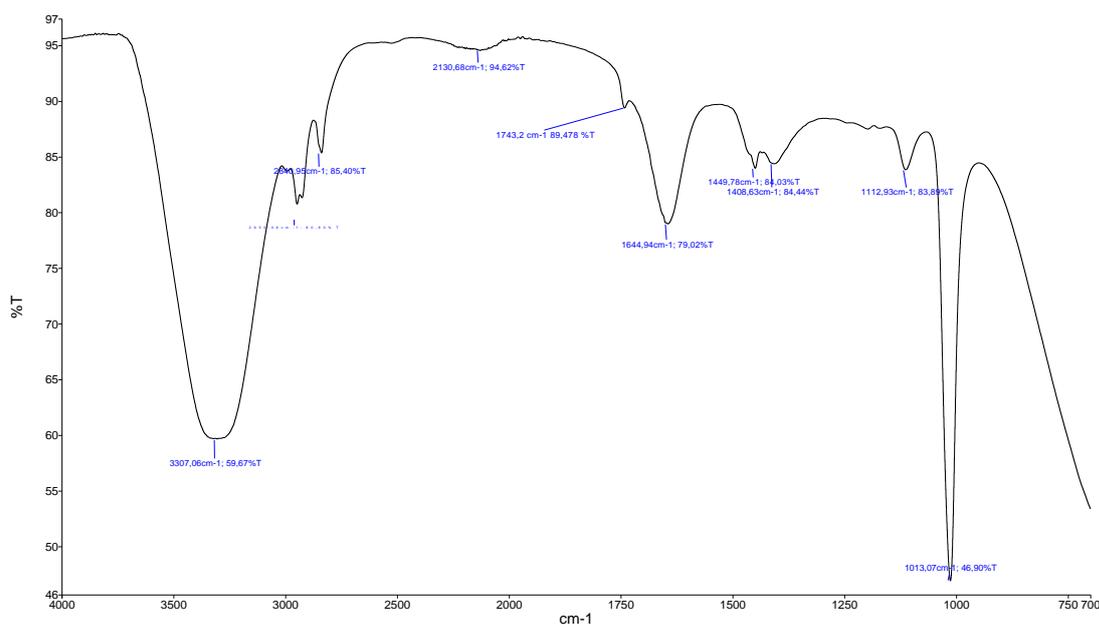


Figura 42. Espectro muestra CE 0.1.

Se observan varios picos que corresponden a:

- Agua: Tensión O-H, banda ancha por puentes de hidrógeno (3500 – 3200 cm^{-1}).
- Metanol: Tensión C-O (1100 cm^{-1}) y O-H.

Estos dos picos corresponden al disolvente de nuestras muestras, por lo que sus señales podrían estar interfiriendo en la de los antioxidantes. Se decide evaporar el disolvente al máximo y volver a realizar el análisis, aunque estos dos picos también podrían ser señal de algún fenol.



Figura 43. Evaporación del disolvente de las muestras.

Los resultados superpuestos de todas las muestras se presentan en la Figura 44.

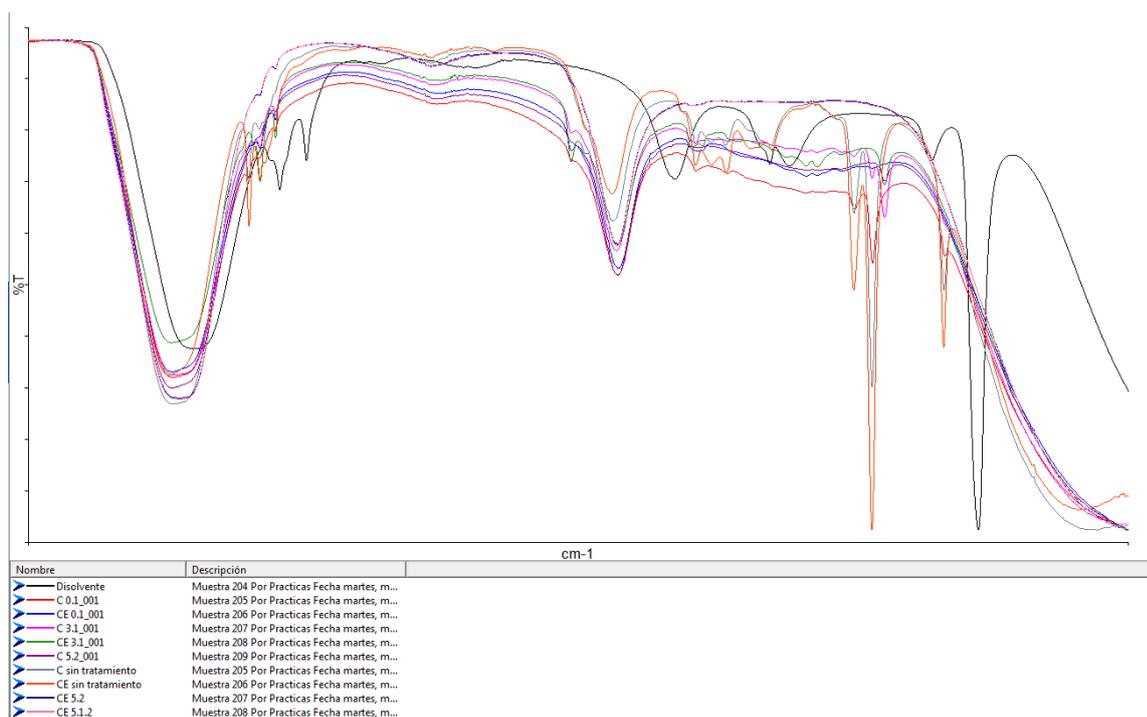


Figura 44. Espectro IR de todas las muestras sin disolvente.

El pico del disolvente que correspondía al metanol, destacado en color negro en la Figura 44, no está presente en las muestras, aunque podría corresponder a agua, ya que las muestras no se acabaron de disolver del todo, y la banda ancha del agua sigue apareciendo en las muestras. Por otro lado, se aprecia un pico sobre 1750cm^{-1} , al lado de uno que corresponde al agua (1633cm^{-1}). A continuación se muestra con más detalle.

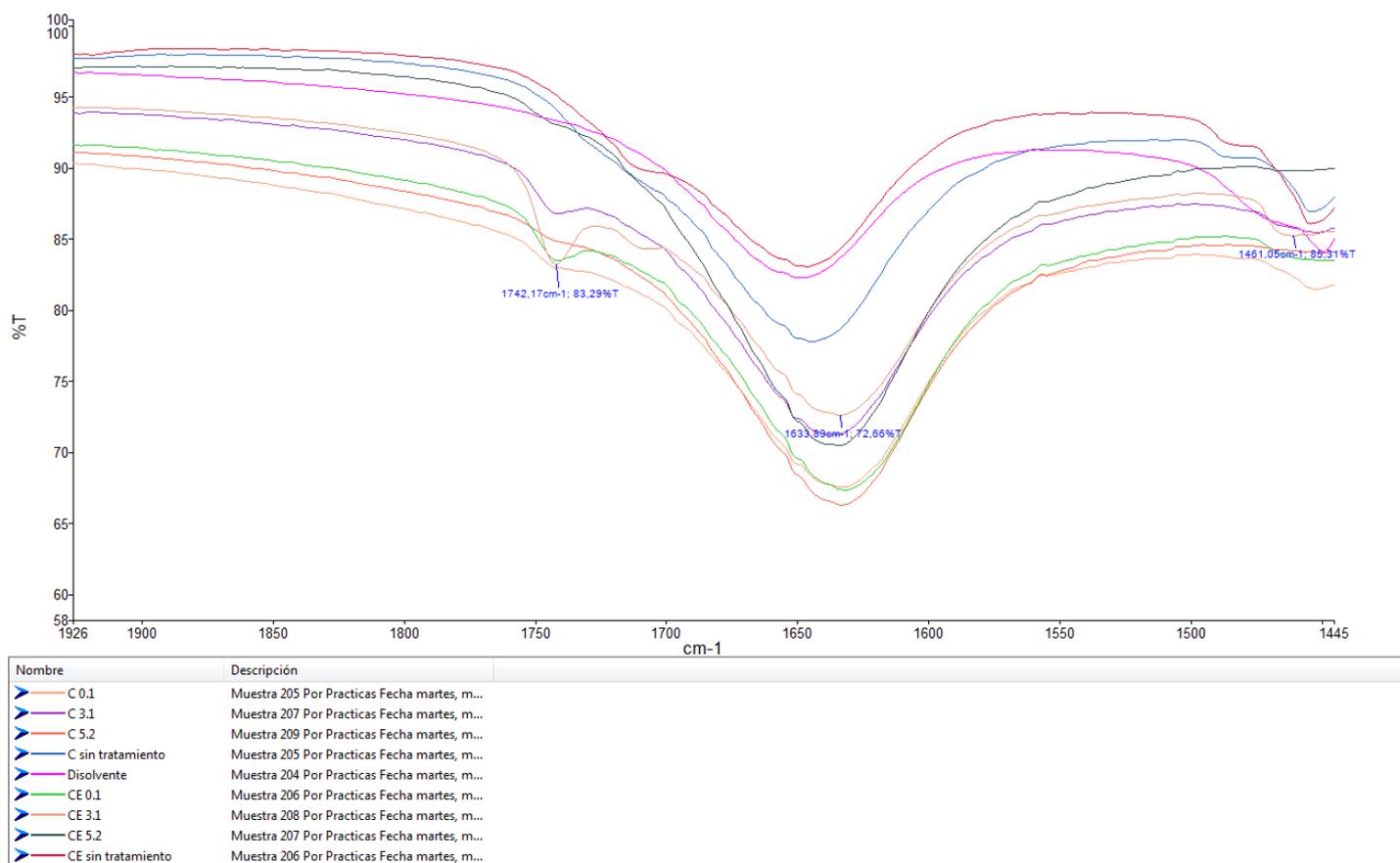
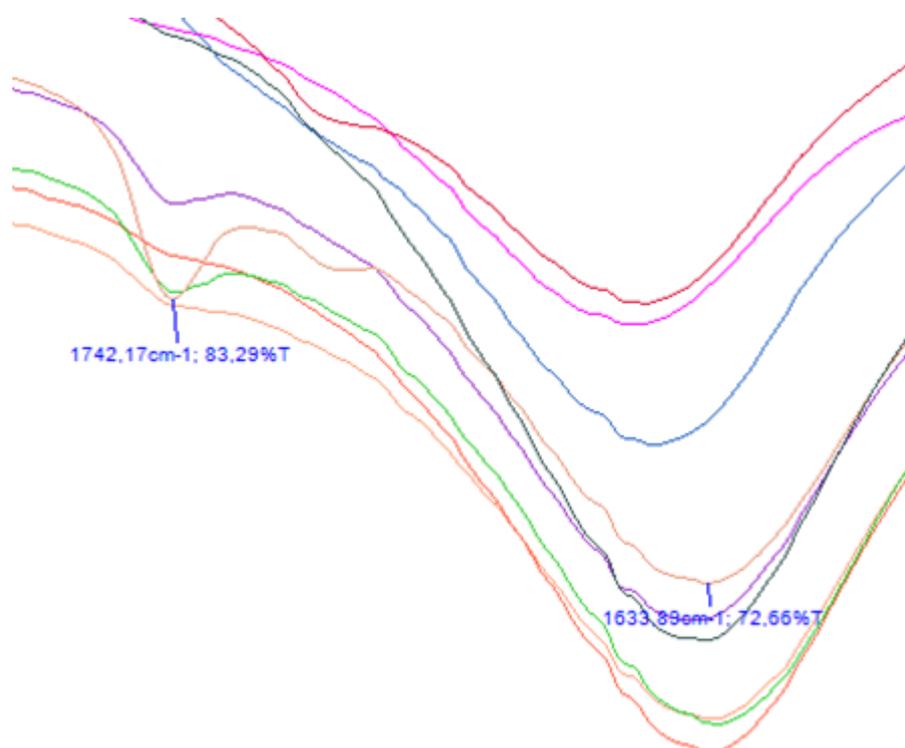


Figura 46. Enfoque de espectro de todas las muestras superpuestas.



El pico de la derecha corresponde a 1634 cm^{-1} , por tanto correspondería a agua ($1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$), y el de la izquierda, es el pico que no se encuentra presente en el disolvente y según las tablas encontradas en la bibliografía, podría corresponder a un éster ($\text{C}=\text{C}$). Las muestras con el pico más marcado son las muestras CE 0.1 y CE 3.1, que corresponden a los colores verde y color carne.

Figura 45. Enfoque espectro más ampliado de todas las muestras superpuestas.

Conclusiones

El objetivo principal de este proyecto es investigar el efecto de la extrusión y la fermentación en estado sólido sobre la caracterización física y las propiedades antioxidantes de la cáscara de nuez pecana. Se puede dividir en los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Búsqueda bibliográfica sobre la fermentación en estado sólido en pieles o cáscaras de otros alimentos, así como de los diferentes antioxidantes y su beneficio para el ser humano.
- ❖ Investigación de la actividad antioxidante de la cáscara de nuez mediante análisis DPPH y ABTS.
- ❖ Determinación de los polifenoles totales de las diferentes muestras mediante análisis de Folin-Ciocalteu y Flavonoides totales.
- ❖ Determinación del contenido de taninos de las muestras.
- ❖ Selección de las muestras con mejores resultados y caracterización morfológica mediante FTIR y SEM.
- ❖ Evaluación de los resultados y aceptabilidad del producto para posibles aplicaciones en la industria.

En el presente proyecto se ha analizado el efecto de la extrusión y fermentación en estado sólido en parámetros físicos y químicos.

La cáscara de nuez contiene un elevado número de compuestos fenólicos. Los resultados indican que en todos los casos, las muestras extruidas se encuentran entre 22,89 y 74,01 mg GAE/g de muestra. El valor máximo obtenido es para la muestra sin fermentar, la muestra control, con un proceso de extrusión.

Se ha comprobado la actividad antiradicalaria con diferentes métodos. En todos ellos la muestra fermentada presenta valores inferiores a la muestra no fermentada. En el análisis DPPH las muestras extruidas se encuentran entre 150,95 y 174,46 $\mu\text{mol Trolox/ g muestra}$ y las muestras no extruidas entre 113,82 y 157,60 $\mu\text{mol Trolox/ g muestra}$. Para el análisis ABTS, las muestras extruidas presentan valores entre 2,37 y 3,76 $\mu\text{mol Trolox/ g muestra}$ y las muestras no extruidas, valores entre 1,41 y 2,39 $\mu\text{mol Trolox/ g muestra}$. En el análisis FRAP, las muestras extruidas se encuentran entre 81,46 y 278,06 $\mu\text{mol Trolox/ g muestra}$, y las muestras no extruidas entre 33,17 y 151,90 $\mu\text{mol Trolox/ g muestra}$.

Se destaca una disminución cuantitativa de los compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante a medida que transcurren los días de fermentación.

La muestra CE 0.1, cáscara extruida correspondiente al primer día de fermentación es la que presenta mejores resultados en prácticamente todos los métodos. Por ejemplo, en el caso del

análisis de los flavonoides totales, su resultado es de $13,37 \pm 0,018$ mg ER / g muestra, y para el método de análisis de la actividad antiradicalaria DPPH, es de $174,46 \pm 0,003$ μ mol Trolox/ g muestra.

El análisis de barrido SEM, indica que se podría haber producido crecimiento del hongo ya en el primer día. Por lo tanto, la disminución podría verse causada por un efecto de dilución debido a la biomasa del hongo.

El análisis por FTIR (control, primer y último día de fermentación) ha permitido sugerir alguna estructura fenólica. Un pico podría corresponder a un éster.

La cáscara es un antioxidante natural prometedor que contiene muchos compuestos beneficiosos para la salud y que podría ser utilizado para sustituir los antioxidantes sintéticos disponibles. Además, si el hongo ha crecido de manera muy efectiva en la cáscara, se podría plantear un uso de la cáscara como sustrato para el crecimiento del hongo para la producción de enzimas, ya que la cáscara es un residuo industrial.

Experimentos futuros

- Para poder realizar la corrección en los valores en los métodos de actividad antioxidante, se investigó y se encontró en varios estudios un método para determinar el crecimiento del hongo en la muestra. La cuantificación se lleva a cabo a través de la determinación de la glucosamina, ya que es un compuesto que se encuentra en la pared celular de los hongos. A través de este análisis, se podría determinar el crecimiento del hongo en las muestras.
- Para poder determinar mejor a qué tipo de estructura hace referencia este pico, se pensó en realizar un análisis con HPLC, también para poder cuantificar la fibra presente en la cáscara, ya que el proceso de extrusión reduce la fibra insoluble y aumenta la soluble, para hacer de la cáscara un alimento digerible para el ser humano.

Planificación y Presupuesto

En este apartado se muestra un diagrama de la planificación aproximada del proyecto y en la Tabla 22 se muestran las principales tareas en las que se ha repartido y su duración. Quiero destacar que esta planificación es muy aproximada, ya que los experimentos se han repetido en distintos momentos del proyecto.

Tabla 22. Diagrama de la planificación del proyecto.

Tareas	Fechas de trabajo															
	15/ 01	31/ 01	12/ 02	21/ 02	25/ 02	28/ 02	18/ 03	25/ 03	27/ 03	04/ 04	08/ 04	16/ 04	29/ 04	02/ 05	08/ 05	26/ 05
1	■	■	■													
2			■	■												
3				■	■											
4					■	■	■									
5							■	■								
6							■	■								
7								■	■							
8									■	■	■	■				
9										■	■	■				
10												■	■	■		
11												■	■	■		
12															■	■
13													■	■	■	■

Tabla 23: Tareas numeradas en la Tabla 22 y su contenido

Número tarea	Contenido tarea
1	Búsqueda bibliográfica y aprendizaje métodos principales
2	Extracción antioxidantes muestras
3	Experimentos previos
4	TP
5	Flavonoides
6	DPPH
7	ABTS
8	FRAP
9	Taninos
10	DSC-OIT
11	SEM
12	FTIR
13	Redacción memoria

Los costes del trabajo están detallados en las tablas siguientes. Los principales costes se distribuyen en: costes productos alimentarios, reactivos, depreciación equipos, servicios externos en otros laboratorios y coste de los recursos humanos.

Tabla 24: Coste de productos alimentarios

Producto	Coste (€)
Nuez pecana	16 € / kg

Aceite de girasol	2 € / L
Total	18

Tabla 25: Coste de productos y reactivos

Producto	Proveedor	Precio	Cantidad	Coste de la cantidad usada
Metanol	Panreac	16,40€/L	1 L	16,40
Folin-Ciocalteu DC	Panreac	41,30€/250mL	50 mL	8,26
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	Panreac	27,6€/500g	20 g	1,10
Ácido gálico	Sigma-Aldrich	47,70€/100g	0,3 g	0,14
DPPH	Sigma-Aldrich	59,40€/g	20 mg	1,19
Troxol	Sigma-Aldrich	129€/5g	0,3 g	7,74
Etolol	Sigma-Aldrich	88,5€/500mL	80 mL	14,16
ABTS	Sigma-Aldrich	81,20€/2g	0,3 g	12,18
Acetato de sodio 3-hidratado (CH ₃ COONa·3H ₂ O)	Sigma-Aldrich	53,60€/250g	2 g	0,43
Persulfato de potasio (K ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich	27,50€/250g	0,5g	0,06
Ácido acético	Panreac	27,80€/L	30 mL	0,83
Ácido Clorhídrico (37%)	Panreac	68,00€/5L	50 mL	0,68
Cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	Sigma-Aldrich	49,30€/250g	0,5 g	0,10
TPTZ	Sigma-Aldrich	54,10€/1g	0,2 g	10,82
Tricloruro de aluminio hexahidratado (AlCl ₃ ·6H ₂ O)	AppliChem	73,20€/500g	10 g	1,46

Vainillina	Sigma- Aldrich	20,40 / 2g	2 g	20,40
			Total	95,95

Tabla 26. Coste asociado al uso de los equipos

Equipo	Precio amortizable	Vida útil	Tiempo de uso (días)	Depreciación (€)
Báscula analítica (COBOS aw 220)	1300	10	50	17,81
Centrifugador (Orto-Alresa)	4200	10	15	17,26
Agitador magnético (SBS Multipoint)	456	6	15	3,12
Espectrofotómetro UV (FLUOStar Omega)	19600	10	35	187,95
Espectrofotómetro IR (Pelkin Elmer)	20000	10	2	10,95
Vórtex (Agitador de tubos SBS)	220	10	25	1,50
Agitador orbital (Ika Labortec)	1000	6	2	0,91
			Total	239,5

Tabla 27. Coste asociado al uso de equipos en laboratorios externos

Método	Precio/hora	Horas de uso	Precio
Scanning electron microscope (SEM)	30,4	5	152

Para calcular los costes totales de los recursos humanos (HR), se tiene en cuenta el salario bruto anual (SBA) y el coste de la seguridad social (SS) de cada trabajador. Estos costes se han calculado a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Coste recursos humanos (€)} = \text{HR} (h \cdot \text{persona}) \cdot \frac{\text{SBA} + \text{SS} \left(\frac{\text{€}}{\text{persona} \cdot \text{año}} \right)}{\left(\frac{h}{\text{año}} \right)}$$

Hay diferentes grupos de profesionales según el XVIII Convenio general de la Industria Química. A continuación se definen las responsabilidades de los dos grupos que han participado en este proyecto:

- Grupo Profesional número 5. Se encarga de coordinar y supervisar la ejecución de varias tareas y/o colaboraciones. También incluye tareas que no implican órdenes pero que tienen un contenido intermedio de actividad intelectual y relaciones humanas. Ej.: persona encargada del proyecto o autor del proyecto.

- Grupo Profesional número 7. Incluye funciones que involucran actividades complejas con un alto grado de exigencia, autonomía y responsabilidad. Dirección de un conjunto de tareas que requieren conocimientos técnicos o profesionales especializados. Ej.: director del proyecto.

Tabla 28. Salario bruto mínimo de los diferentes grupos profesionales

Grupo profesional	€/persona·año	€/persona·h
5	20185,52	11,52
7	28699,97	16,38

Con los salarios brutos anuales de los diferentes grupos de profesionales, podemos calcular los costes de recursos humanos, desglosados en la siguiente tabla:

Tabla 29. Coste de los recursos humanos del proyecto.

	Nº de personas	Nº de horas	Salario (€/persona · h)	Salario (€)	Coste SS	Coste recursos humanos
Autora del proyecto	1	900	11,52	10368	3317,76	13685,76
Tutora intermediario	1	300	11,52	3456	1474,56	4930,56
Directora del proyecto	1	50	16,38	819	262,08	1081,08
					Total	19696,64

En la Tabla 30, se resumen los costes totales de todos los apartados y se presenta el coste total del proyecto:

Tabla 30. Resumen coste total proyecto

	Coste total
Coste de productos alimentarios	18
Coste de reactivos y productos	95,95
Coste asociado equipos	239,5
Coste uso equipos externos	152
Coste recursos humanos	19696,64
Total	20202,09

Impacto medioambiental

Como este proyecto está relacionado con la comida, no hay prácticamente productos que puedan producir un impacto negativo en el medio ambiente. La Tabla 30 muestra los diferentes tipos de residuos que pueden ser dañinos para el medioambiente y/o para organismos vivos. Por esta razón, durante el proyecto se ha prestado especial atención a la clasificación, deposición y/o recuperación de los diferentes residuos generados.

Por tanto, se puede concluir que no hay impacto medioambiental derivado de este proyecto.

Tabla 31. Clasificación de los residuos generados en el proyecto.

Residuo	Uso	Clasificación
Metanol	Extracción y análisis DPPH	Disolvente orgánico
Etanol	Extracción	Disolvente orgánico
HCl	Análisis Taninos	Disoluciones ácidas
Radical ABTS	Análisis ABTS	Ninguno (*)
Radical DPPH	Análisis DPPH	Ninguno (*)
Reactivo Folin-Ciocalteu	TPC	Ninguno (*)
Reactivo FRAP	Análisis FRAP	Ninguno (*)

(*) Los radicales libres no necesitan ningún tratamiento especial, ya que tienen una vida útil de horas.

Las demás disoluciones que se han utilizado tienen una vida útil más longeva por lo que se han reservado en viales ámbar y en nevera/armario para futuros usos.

Los materiales fungibles de plástico que han sido usados con reactivos se han depositado en el contenedor de plástico contaminado y los que han sido usados solo con agua o con residuo no contaminante, se han reciclado en el contenedor amarillo de plástico y envases.

5. Bibliografía

1. Sadh, P.K. et al. Bio-enrichment of functional properties of peanut oil cakes by solid state fermentation using *Aspergillus oryzae*. A: *Journal of Food Measurement and Characterization* [en línea]. Springer US, 2018, Vol. 12, núm. 1, p. 622-633. ISSN 21934134. DOI 10.1007/s11694-017-9675-2. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1007/s11694-017-9675-2>.
2. Wu, W. et al. Optimization of production conditions for antioxidant peptides from walnut protein meal using solid-state fermentation. A: *Food Science and Biotechnology*. 2014, Vol. 23, núm. 6, p. 1941-1949. ISSN 12267708. DOI 10.1007/s10068-014-0265-3.
3. Novelli, P.K., Barros, M.M. i Fleuri, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. A: *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 2016, Vol. 198, p. 119-124. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.11.089.
4. Dos Santos, T.C. et al. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. A: *Food Chemistry* [en línea]. Elsevier Ltd, 2012, Vol. 133, núm. 4, p. 1299-1304. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.11.115. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.115>.
5. Fang, Y. et al. Solid-state fermentation of *Acanthogobius hasta* processing by-products for the production of antioxidant protein hydrolysates with *Aspergillus oryzae*. A: *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2015, Vol. 58, núm. 3, p. 343-352. ISSN 16784324. DOI 10.1590/S1516-8913201500297.
6. Handa, C.L. et al. Parameters of the fermentation of soybean flour by *Monascus purpureus* or *Aspergillus oryzae* on the production of bioactive compounds and antioxidant activity. A: *Food Chemistry*. 2019, Vol. 271, núm. October 2017, p. 274-283. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.07.188.
7. Lee, J.H. et al. Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. A: *Food Chemistry* [en línea]. 2019, Vol. 272, p. 362-371. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.08.052. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.052>.
8. Queiroz Santos, V.A. et al. Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. A: *Lwt* [en línea]. Elsevier Ltd, 2018, Vol. 92, p. 509-515. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2018.02.067. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.067>.
9. Shin, H.Y. et al. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. A: *Food Chemistry* [en línea]. 2019, Vol. 272, p. 235-241. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.07.174. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.174>.
10. Zambrano, C. et al. Mobilization of phenolic antioxidants from grape, apple and pitahaya residues via solid state fungal fermentation and carbohydrase treatment. A: *LWT - Food Science and Technology* [en línea]. Elsevier Ltd, 2018, Vol. 89, p. 457-465. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2017.11.025. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.025>.

11. Zhao, G. et al. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. A: *Food Chemistry* [en línea]. 2019, Vol. 271, p. 606-613. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.07.199. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.199>.
12. Wagener, EA, Kerr, W.. No Title. A: *Effects of oil content on the sensory, textural and physical properties of pecan butter (Carya illinoensis)*. *Texture Stud.* 2018, p. 286-292.
13. Plants Food. A: Kureck, I., Policarpi, P., Toaldo, I.M. et al. *Plant Foods Hum Nutr* (2018) 73: 137.
14. Domínguez-Avila, J.A. et al. The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets. A: *Food Chemistry*. 2015, Vol. 168, p. 529-537. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.07.092.
15. Atanasov, A.G. et al. Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects. A: *Trends in Food Science and Technology*. 2018, Vol. 71, núm. October 2017, p. 246-257. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2017.10.019.
16. Prado, A.C.P. do et al. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. A: *Industrial Crops and Products* [en línea]. Elsevier B.V., 2013, Vol. 45, p. 64-73. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2012.11.042. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.042>.
17. Justo, O. i Pérez, W. Tecnología de extrusión en alimentos. A: . 2006, Vol. 16, núm. 3, p. 78-87.
18. ARTICULO *antioxidants 1202*.
19. Article *FERMENTATION sin nom*.
20. No Title. A: <http://eprints.ucm.es/11255/1/T32158.pdf>
21. De La Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E. i Shahidi, F. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Kernels and Shells of Mexican Pecan (*Carya illinoensis*). A: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea]. 2011, Vol. 59, núm. 1, p. 152-162. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf1034306. Disponible a: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf1034306>.
22. Cheftel, J.C. Extrusion cooking: operating principles, research trends and Food applications. A: . 1990, Vol. 1, p. 60.
- 23.NoTitle.A:<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/sustancias/aflatoxinas/aflatoxinas>
24. No Title. A: <https://ecopractica.blogspot.com/2015/01/fermentacion-en-estado-solido.html>
25. Muñoz, W. et al. Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). A: *Revista CENIC Ciencias Químicas* [en línea]. 2015, Vol. 46, p. 38-46. Disponible a: <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181643224027.pdf>.
26. Sandhu, K.S., Punia, S. i Kaur, M. Effect of duration of solid state fermentation by *Aspergillus*

awamorinakazawa on antioxidant properties of wheat cultivars. A: *LWT - Food Science and Technology* [en línea]. Elsevier Ltd, 2016, Vol. 71, p. 323-328. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2016.04.008. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.008>.

27. Rashid, N.Y.A. et al. Quantification of phenolic compounds changes by *Aspergillus oryzae* on rice bran fermentation. A: *Food Research*. 2018, Vol. 3, núm. 2, p. 133-137. ISSN 25502166. DOI 10.26656/fr.2017.3(2).122.

28. Cornet, I. et al. FTIR as an easy and fast analytical approach to follow up microbial growth during fungal pretreatment of poplar wood with *Phanerochaete chrysosporium*. A: *Journal of Microbiological Methods* [en línea]. Elsevier, 2018, Vol. 145, núm. January, p. 82-86. ISSN 18728359. DOI 10.1016/j.mimet.2018.01.004. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.004>.

29. C.H Choi, J.S Kim, and K.K.O. Evaluation the efficacy of extrusion pretreatment via enzymatic digestibility and simultaneous saccharification & fermentation with rapessed straw. A: *Biomass and Bioenergy*. 2013, Vol. 54, p. 211-218.

30. Heredia-Olea, E. et al. Effects of Extrusion Pretreatment Parameters on Sweet Sorghum Bagasse Enzymatic Hydrolysis and Its Subsequent Conversion into Bioethanol. A: *BioMed Research International*. 2015, Vol. 2015, p. 1-10. ISSN 2314-6133. DOI 10.1155/2015/325905.

31. De La Rosa-Millán, J., Pérez-Carrillo, E. i Guajardo-Flores, S. Effect of germinated black bean cotyledons (*Phaseolus vulgaris* L.) as an extruded flour ingredient on physicochemical characteristics, in vitro digestibility starch, and protein of nixtamalized blue maize cookies. A: *Starch/Stärke*. 2017, Vol. 69, núm. 3-4, p. 1-35. ISSN 1521379X. DOI 10.1002/star.201600085.

32. Dai, J. i Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. A: *Molecules*. 2010, Vol. 15, núm. 10, p. 7313-7352. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules15107313.

33. Naczki, M. i Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. A: *Journal of chromatography. A* [en línea]. 2004, Vol. 1054, núm. 1-2, p. 95-111. ISSN 0021-9673. DOI 10.1016/j.chroma.2004.08.059. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15553136>.

34. Singleton, V.L., Orthofer, R. i Lamuela-Raventós, R.M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. A: [en línea]. 1999, p. 152-178. DOI 10.1016/S0076-6879(99)99017-1. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171>.

35. Gallego, M.G. et al. Antioxidant Properties of Three Aromatic Herbs (Rosemary, Thyme and Lavender) in Oil-in-Water Emulsions. A: *Journal of the American Oil Chemists' Society* [en línea]. 2013, Vol. 90, núm. 10, p. 1559-1568. ISSN 0003-021X. DOI 10.1007/s11746-013-2303-3. Disponible a: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-013-2303-3>.

36. Shahidi, F. i Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. A: *Journal of Functional Foods* [en línea]. Elsevier Ltd, 2015, Vol. 18, p. 820-897. ISSN 17564646. DOI 10.1016/j.jff.2015.06.018. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.

37. Haminiuk, C.W.I. et al. Phenolic compounds in fruits - an overview. A: *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, Vol. 47, núm. 10, p. 2023-2044. ISSN 09505423. DOI 10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x.
38. Prior, R. L., Wu, X., & Scaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement. *J. Agric. Food Chem*, 53, 4290-4302. A: . 2005, p. 4290-4302.
39. Nanditha, B., & P. Antioxidants in bakery products: A review. A: *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. 2009, Vol. 49, p. 1-27.
40. Halliwell, B., Aeschbacht, R., Lorigert, J., & Aruoma, O.. The characterization of antioxidant. A: *Food and Chemical Toxicology*. 1995, Vol. 33, p. 601-617.
41. Osorio, E. et al. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. A: *Industrial Crops and Products*. 2010, Vol. 31, núm. 1, p. 153-157. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2009.09.017.
42. Kiokias, S., Varzakas, T. i Oreopoulou, V. In Vitro Activity of Vitamins, Flavonoids, and Natural Phenolic Antioxidants Against the Oxidative Deterioration of Oil-Based Systems. A: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [en línia]. 2008, Vol. 48, núm. 1, p. 78-93. ISSN 1040-8398. DOI 10.1080/10408390601079975. Disponible a: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390601079975>.
43. Saad, B., Sing, Y. Y., Nawi, M.A., Hashim, N.H., Ali, A.S.M., Saleh, M.I, Sulaiman, S.F., Talib, K. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. A: *Food Chemistry*. 2007, Vol. 105, p. 389-394.
44. Berdahl, D., Nahas, R.I, & Barren, J.P. Synthetic and natural in food stabilization: Current applications and future research. A: *Oxford, UK: Woodhead Publishing*. 2010, p. 272-320.
45. Ikawa, M., Schaper, T.D., Dollard, C.A. & Sasner, J.J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. A: *Agricultural and Food Chemistry*. 2003, Vol. 51, p. 1811-1815.
46. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. A: *Agricultural and Food Chemistry*. 2000, Vol. 48, p. 3396-3402.
47. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. A: *Wiss. Technology*. 1995, Vol. 28, p. 25-30.
48. Cano, A.; Alcaraz, O.; Acosta, M.; Arnao, M.B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS+ assay. A: *Redox report*. 2002, Vol. 7, p. 103-109.
49. Liu, S.C. et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. A: *Food Chemistry*. 2009, Vol. 114, núm. 2, p. 577-581. ISSN 03088146. DOI

10.1016/j.foodchem.2008.09.088.

50. Antioxidante, A. et al. CAPÍTULO Palabras clave. A: [en línea]. 2016, p. 41-76. DOI 10.3926/oms.333. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.333>.

51. No Title. A: [en línea]. Disponible a: <https://sie.sea.es/tematica/convenio-colectivo-estatal-de-la-industria-quimica-tablas-salariales-2017/>.

52. Seiko, T. i Dsc, E. Oxidative Induction Time (Oit) Measurements By Dsc. A: . p. 29-31.

53. Time, O.I. Oxidation Induction Time Measurements by DSC 1. A: . 1988, p. 2-4.

54. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión de cafetera.

55. Shin, H.Y. et al. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. A: *Food Chemistry* [en línea]. 2019, Vol. 272, p. 235-241. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.07.174. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.174>.

56. Bei, Q. et al. Enzymatic action mechanism of phenolic mobilization in oats (*Avena sativa* L.) during solid-state fermentation with *Monascus anka*. A: *Food Chemistry* [en línea]. Elsevier, 2018, Vol. 245, núm. October 2017, p. 297-304. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.10.086. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.086>.

57. Liu, S.C. et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. A: *Food Chemistry*. 2009, Vol. 114, núm. 2, p. 577-581. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.09.088