

**Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos
funcionales: una aproximación desde la nutrición animal**

Dubán Ovidio González Álvarez

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de alimentos

Asesor

Julián Londoño-Londoño.

Químico Farmacéutico, Doctor en Ciencias Químicas.

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ingeniería

Ingeniería de Alimentos

Caldas – Antioquia

2013

Contenido

Justificación.....	13
Objetivos	20
General	20
Específicos.....	20
Marco teórico	21
Antioxidantes como ingredientes funcionales	21
Vitamina E.	23
Vitamina C (Ácido ascórbico).....	24
Carotenoides.....	24
Compuestos fenólicos y flavonoides:	25
Extracción y análisis de carotenoides	27
Residuos agroindustriales como fuente de ingredientes bioactivos.....	28
Residuos de cítrico.....	29
Residuos de mango	30
Residuos de banano	31
Residuos de uva.....	32
Residuos de tomate	33
Residuos de zanahoria	33
Residuos de remolacha	34
Deshidratación y procesamiento de residuos agroindustriales.	35

El secado solar controlado	36
El secado por aire caliente:	36
Deshidratación por ósmosis	37
Secado por aspersión	38
Metodología	39
Reactivos	39
Materias primas.....	39
Diagnóstico de la oferta de residuos orgánicos generados en Central Mayorista De Antioquia.....	39
Caracterización bromatológica de los residuos	40
Determinación de Humedad.....	40
Determinación de proteína	41
Determinación de grasa (extracto etéreo)	42
Determinación de cenizas	42
Determinación de fibra dietaria	43
Determinación de Carbohidratos	44
Determinación de sustancias bioactivas.....	44
Determinación del contenido de compuestos fenólicos.....	45
Determinación de capacidad antioxidante total (ORAC)	46
Determinación del contenido de carotenoides totales	47
Perfiles cromatográficos de los residuos y las materias primas empleadas para la elaboración de los concentrados para gallinas ponedoras	48

Extracción por fluídos supercríticos de compuestos bioactivos a partir de residuos vegetales (FSC- CO2).....	49
<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i>	50
Análisis de las sustancias bioactivas.....	50
Extracción por fluidos supercríticos de compuestos bioactivos de dos residuos vegetales (FSC)	50
Secado por lecho fluidizado.....	52
Resultados y discusión.....	52
<i>Diagnóstico de la oferta de residuos orgánicos generados en Central mayorista de Antioquia</i>	53
Determinación de sustancias bioactivas	55
Determinación de sustancias bioactivas después del secado.....	62
Análisis bromatológicos	64
Perfiles cromatográficos de los residuos.....	65
Perfiles cromatográficos de las materias primas empleadas para la elaboración de los concentrados para gallinas ponedoras	78
Extracción por fluídos supercríticos (FSC)	81
Conclusiones	86
Referencias	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño Central compuesto para la extracción por fluidos supercríticos de luteína proveniente de residuos vegetales y los resultados obtenidos	52
Tabla 2. Condiciones de secado	52
Tabla 3. Volumen de generación de residuos en la central Mayorista de Antioquia	55
Tabla 4. Contenido de carotenoides totales, Compuestos Fenólicos y Capacidad antioxidante (ORAC)	56
Tabla 5. Contenido de carotenoides totales, Compuestos Fenólicos y Capacidad antioxidante (ORAC) después del secado	62
Tabla 6. Composición bromatológica de cinco residuos vegetales en base seca	64
Tabla 7. Presencia relativa de carotenoides en los residuos	78
Tabla 8. Contenido de Zeaxantina en materias primas empleadas en la elaboración de los concentrados para gallinas ponedoras.	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aforo de residuos orgánicos (m ³) Bloques 26,27 por	53
Figura 2. Evacuación de residuos por parte de empresas de aseo.	54
Figura 3. Contenido de carotenoides totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) analizados en los 10 residuos vegetales.	61
Grafica 4. Efecto del secado sobre Contenido de carotenoides totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) analizados en los 5 residuos vegetales	63
Figura 5. Perfil Cromatográfico del tomate de aliño	66
Figura6. Perfil Cromatográfico del pimentón.	67
Figura 7. Perfil Cromatográfico de zanahoria.....	68
Figura 8. Perfil Cromatográfico de la naranja.....	69
Figura 9. Perfil Cromatografico de tomate de árbol.....	70
Figura 10. Perfil Cromatográfico del maracuyá.....	71
Figura 11. Perfil Cromatográfico de la papaya	72
Figura 12. . Perfil Cromatográfico de la auyama.	73
Figura 13. Perfil Cromatográfico del repollo	74
Figura. 14. Perfil Cromatográfico de la lechuga	75
Figura 15. Comparación de los perfiles cromatográficos de los residuos que contienen licopeno	76
Figura. 16. Comparación de los perfiles cromatográficos de los residuos que contienen luteína	77
Figura. 17. Comparación de los perfiles cromatográficos de las materias primas con respecto al contenido de zeaxantina.....	80

Figura 18. Perfil HPLC de carotenoides en residuos en la cual se observa la presencia de luteína en lechuga (*Lactuca sativa*), repollo (*Brassica oleracea*) y auyama (*Cucurbita maxima*). 81

Figura 19. Curvas 3D de superficie de respuesta donde se muestran los efectos de la temperatura y la presión a) rendimiento total, b) rendimiento de luteína82

Figura. 20. Comparación de los extractos obtenidos por FSC-CO₂ y EAU. La figura principal muestra un cromatograma típico de los extractos. La figura inserta muestra la comparación entre las técnicas de acuerdo a al rendimiento total (gramos extraídos/gramos de material), rendimiento de luteína (µg extraídos/g material) y valor ORAC (mmol TE/100 g extracto).....85

Tabla de apéndices

Apéndice A. Artículo presentado en el Tercer Congreso Iberoamericano de Fluidos Supercríticos	95
--	----

Resumen

Nuestras ciudades generan cada vez más cantidad de residuos cuya disposición final se realiza en botaderos a cielo abierto o cuerpos de agua constituyendo un problema para la salud pública, además los elevados volúmenes suponen importantes costos de recolección y disposición final.

Pese a esto, los residuos orgánicos también son una fuente importante de compuestos que pueden ser utilizados debido a sus propiedades favorables tecnológica o nutricionalmente, de hecho recientemente se ha mostrado que los residuos de cítricos contienen antioxidantes que pueden tener un efecto benéfico para la salud humana(Londoño-Londoño et al., 2010).

Este trabajo trata de sustentar conceptual y metodológicamente la importancia de aprovechar los residuos orgánicos generados en una Central de Abastos para obtener productos intermedios de alto valor agregado que serán utilizados bajo un concepto denominado "producción de alimentos funcionales desde la nutrición animal". De esta forma, se expone la importancia de los ingredientes bioactivos presentes en la dieta y su relación con la salud humana, abordando la información disponible actualmente para producir alimentos funcionales y finalmente mostrando un panorama general de cómo incorporar sustancias bioactivas provenientes de residuos agroindustriales en la dieta animal y su impacto en la calidad de los productos derivados para consumo humano.

Palabras claves: Carotenoides, luteína, residuos agroindustriales, extracción por fluidos supercríticos, extracción asistida por ultrasonido.

Abstract

Every time our cities produce higher amount of wastes, whose final disposal is made in open dumps or bodies of water constituting a problem for public health, furthermore the high volumes represent significant costs of collection and disposal.

Despite this, the organic residues are also an important source of compounds which can be used due to their technological or nutritionally favorable properties; in fact it has recently shown that residues of citrus fruits contain antioxidants that may have beneficial effects to human health (Londono Londono, Lima et al. 2010).

This work tries to support conceptual and methodological support the importance of using organic waste generated in a Supply Center to obtain intermediates products with high added value that will be used on a concept we call "functional food production from animal nutrition." In this way, it is exposed the importance of bioactive ingredients present in the diet and its relation to human health, addressing the information currently available to produce functional foods and finally showing an overview of how to incorporate bioactive substances from agro-industrial waste in the animal diet and its impact on the quality of the derived products for human consumption.

Key words: Carotenoids, lutein, agro industrial wastes, supercritical fluid extraction, ultrasound assisted extraction

En Colombia las centrales de abasto y las industrias agroalimentarias generan una gran cantidad de residuos sólidos vegetales que comprometen gravemente los ecosistemas por su alta concentración de materia orgánica. De hecho en la Central Mayorista de Antioquia, se generan diariamente 45.2 metros cúbicos de residuos de origen vegetal entre frutas y verduras, que pueden tener un gran potencial para ser usados en la industria avícola en la cual tiene gran importancia económica el color de los huevos y de la carne de la gallina, debido a la tendencia de los consumidores a preferir huevos con yemas de color amarillo-anaranjado. Por este motivo en explotaciones avícolas dedicadas a producir huevo, adicionan pigmentos sintéticos para reforzar los carotenoides aportados por las materias primas como el maíz, el gluten de maíz y el sorgo a las dietas de gallinas para así satisfacer las exigencias del consumidor a pesar que esto incrementa los costos en la producción.

Por lo anterior el presente trabajo pretende usar los residuos vegetales que tengan alto contenido de carotenoides para elaborar una premezcla para la alimentación de gallinas ponedoras, de manera que se substituyan los de origen sintético que son de alto costo; de esta manera se estarían beneficiando las centrales de abasto, las empresas agroalimentarias, las empresas productoras de concentrados para gallinas, las productoras de huevos y por último el consumidor.

Las centrales de abasto y las empresas agroindustriales disminuirán los costos asociados a la disposición de residuos sólidos vegetales y por lo tanto el impacto al ambiente será menor. Para las empresas de concentrados estos disminuirán los costos de producción pues dejarán de utilizar los pigmentos sintéticos utilizados actualmente para la elaboración de concentrados de gallinas ponedoras, las gallinas quedarán mejor alimentadas pues estarán comiendo una fuente natural de colorante y así podrán producir huevos no solo de mejor color si no de alto contenido

de sustancias funcionales, lo que los hará más atractivos para el consumidor por los consecuentes beneficios que trae la ingesta regular de este tipo de componentes logrando la prevención en la aparición de determinadas enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, degeneración macular y formación de cataratas entre otros.

Justificación

A nivel mundial, la preocupación por el aprovechamiento de residuos ha tomado gran fuerza entre la comunidad científica y sobre todo a nivel industrial, en donde los procesos de transformación generan subproductos que pueden ser útiles en otras actividades. De hecho, estudios recientes han demostrado que las cáscaras de frutas como la naranja contienen antioxidantes que podrían tener un efecto benéfico en la salud humana (Londoño-Londoño et al., 2010). Sin embargo, los residuos generados en las transformaciones agroindustriales y por las pérdidas postcosecha en nuestro país aún no han sido aprovechados eficientemente, en parte, porque su valor es aún desconocido y, sobretodo, por la falta de métodos apropiados para la preparación y caracterización de sustancias de mayor valor agregado con la suficiente calidad e inocuidad como para ser usadas en los procesos de mayor valor agregado.

Específicamente, los costos de secado, almacenamiento y transporte de los subproductos son factores que limitan económicamente su aplicación industrial y por lo tanto son a menudo utilizados con un escaso tratamiento como alimento para animales, como fertilizantes o simplemente se convierten en focos de contaminación para las fuentes de agua, los mismos cultivos o peor aún son un problema de salud pública en centros de abastecimiento urbanos, en donde su disposición final genera costos cada vez más insostenibles. Por lo tanto, la utilización eficiente, de bajo costo y ecológicamente racional de estos materiales es cada vez más importante, sobre todo por las restricciones legales que ya empiezan a surtir efecto en muchos países (Anand & Maini, 1997; Wadhwa, Bakshi, & Makkar, 2013).

Aunque los subproductos del procesamiento de alimentos representan un problema de disposición importante para la industria, también son fuentes prometedoras de compuestos que

pueden ser utilizados debido a sus propiedades favorables tecnológica o nutricionalmente. De hecho, existe un cuerpo creciente de literatura científica que demuestra la función de los metabolitos secundarios de las plantas en los alimentos y sus efectos potenciales sobre la salud humana. Además, los consumidores son cada vez más conscientes de los problemas de salud relacionados con la dieta, por lo tanto exigen ingredientes naturales que sean seguros y promuevan beneficios sobre la salud, promoviendo cada vez más la aparición de "alimentos funcionales", o sea un alimento cuyo consumo contribuye a aportar beneficios sobre la salud, por encima del aporte estrictamente nutricional. Es decir que presenta compuestos que han sido identificados como fisiológicamente activos y con demostrados efectos positivos para mantener y potenciar la salud, así como prevenir la aparición de determinadas patologías(ADA, 2003).

Existen diferentes alternativas para producir alimentos funcionales, entre ellas están: la adición a granel de ingredientes bioactivos durante la etapa de producción del alimento, el aumento de la biodisponibilidad de un ingrediente en especial o el aumento y/o aparición natural del ingrediente bioactivo desde la generación del alimento (variedades vegetales mejoradas, influencia en la dieta animal para generar subproductos con características funcionales).

En este sentido, productos alimenticios de consumo masivo como el azúcar, la sal, el huevo y la leche son buenos vehículos para el diseño de alimentos funcionales, puesto que es posible impactar una gran cantidad de personas con la ingesta de componentes bioactivos que pueden, a largo plazo, mejorar el estado de salud y prevenir la aparición de enfermedades crónicas de alto costo.

Particularmente, a pesar de que el huevo es un alimento de gran valor nutritivo y que a nivel mundial se consumen alrededor de un billón de huevos al año, la funcionalización de este alimento obliga a la intervención desde la nutrición del ave de postura, debido a que la presencia

de sustancias bioactivas en el huevo (antioxidantes y carotenoides principalmente), dependen exclusivamente de la dieta suministrada al animal, generando no solo de la aceptación sensorial en el consumidor de un huevo con alto nivel de pigmentación en la yema, sino también efectos biológicos que mejoran considerablemente la salud del animal.

Considerando lo anterior, el color de la yema del huevo, representa hoy una de las características de calidad más exigidas por el consumidor, tanto a escala industrial como individual, ya que la tendencia es preferir productos de colores vivos; tal como lo revelan algunos estudios realizados en Europa donde han encontrado que los consumidores prefieren huevos con yema de colores oscuros correspondientes a la escala 14 del abanico de color de yema de DSM (Coutts & Wilson; 2007;DSM, 2005). En el caso de los huevos se observa una mayor demanda por aquellos que poseen yemas de color amarillo-anaranjado más intenso, razón por la cual las explotaciones avícolas dedicadas a producir huevo, han acogido como una práctica normal la adición de pigmentos (carotenoides o xantofilas) en cantidades adecuadas a las dietas de gallinas ponedoras para colorear la yema del huevo, la grasa subcutánea y la piel de las aves (Hernández Gimeno, 2003).

Los carotenoides son pigmentos liposolubles responsables del color rojo, amarillo, naranja y púrpura de frutas y vegetales. Desde el punto de vista químico se pueden dividir en dos grupos, carotenos y xantofilas. Los carotenos se caracterizan por estar compuestos de carbono e hidrógeno, mientras que los segundos tienen en su estructura oxígeno como grupos, hidroxilo, ceto, epoxi, metoxi o ácidos carboxílicos (Rodríguez-B. de Quirós & Costa, 2006).

El color de la yema del huevo es debido en un 70% a las xantofilas y en un 2% a los carotenos, el resto corresponde a otros pigmentos. Los carotenos y la vitamina A que aparecen en algunos piensos en gran cantidad generalmente proporcionan una yema pálida, mientras que las

xantofilas dan yemas muy subidas de color. Las yemas pálidas por llevar gran cantidad de carotenos y vitamina A son de gran importancia bromatológica pues son más nutritivas que las de color subido(Periago Castón, 2011).

Las xantofilas están presentes en algunas materias primas de la dieta de gallinas ponedoras, tales como el maíz, el gluten de maíz y el sorgo que contienen xantofilas rojas; y la alfalfa que aporta principalmente xantofilas amarillas. Sin embargo, cuando el suministro de xantofilas aportadas por las materias primas es insuficiente, se incluyen pigmentos en la formulación de las dietas(Hernández Gimeno, 2003).

El trébol molido, la flor marigold (*Tagetes erecta*) y el chili rojo se han usado ampliamente en la dieta de gallinas ponedoras para aumentar el color de la yema del huevo. El maíz, el trébol y el Marigold contienen luteína que proporcionan color amarillo a la yema, mientras que el pimentón rojo contiene capsantina y capsorubina que proporcionan el color rojo(Rowghani, Maddahian, & Arab Abousadi, 2006). Cuando se proporcionan 0.35 mg de capsantina en 100 g de alimento como única fuente de pigmento se obtiene en los huevos un color similar a los que se comercializan en el mercado(Cuevas, Díaz, Molina, & Retanal, 2003).

En el maíz el 54% son xantofilas, el 23% zeaxantina y el 8% criptoxantina. La ventaja que posee la zeaxantina es que es altamente absorbible, es uno de los mejores compuestos pigmentantes y posee un intenso color naranja. En general, se necesitan 14 mg de xantofila por 1 kg de alimento para obtener una pigmentación adecuada (Cuevas et al., 2003).

En la alfalfa el principal pigmentante carotenoides es la luteína, que no es tan efectiva como la zeaxantina del maíz por su color menos intenso (Cuevas, Diaz et al. 2003). Con un 5% de harina de alfalfa en la ración se obtiene un color adecuado de la yema. Sin embargo raciones por encima del 5% tendrán un efecto moderado sobre la pigmentación y por encima del 20% se

pueden presentar problemas debido a las saponinas y ácidos fenólicos normalmente presentes en la alfalfa.(Roldan, Durán naranjo, Martínez Díaz, & Durán Ramírez, 2004) .

Las gallinas no son capaces de sintetizar los pigmentos, pero tienen la habilidad de transportar entre el 20 y el 60% de los pigmentos a la yema desde la alimentación ingerida.(Rowghani, Maddahian et al. 2006).De hecho, con una composición apropiada del pigmentos en el concentrado se puede intensificar el color de la yema, para lo que se utiliza sustancias disueltas en agua, tales como el éster etílico del β - apo-8'-caroteno, la citranaxantina (5',6'-dihidro 5'- apo- β -caroteno-6'-ona) y la cantaxantina(Belitz & Grosch, 2012).

En el mercado existen diversas ofertas de carotenoides sintéticos que pueden ser usados para intervenir la alimentación de las gallinas ponedoras y lograr un color más intenso en la yema del huevo. En la última década se han sintetizado una serie de ellos, donde se destacan: Cantaxantina, α -apo-8'-carotenal (Bac), éster etílico del ácido α -apo-8'-carotenoico, (Bace) y Zeaxantina. El Bac y Bace se transfieren de la dieta al huevo y proporcionan un aumento en el color de la yema en aves que son alimentadas con dietas pobres en pigmentos naturales, siendo el Bac un pigmento que puede ser transformado en vitamina A y en derivados de cadenas más cortas. Se ha comprobado experimentalmente que en la utilización de fuentes sintéticas, específicamente Bac y Bace, en comparación a fuentes naturales como: maíz, maravilla y alfalfa, no presentan diferencias significativas en la eficiencia de utilización(Cuevas et al., 2003).

La empresa DSM, ofrece dos productos comerciales (Carofil[®] y Lutenal[®]), cuyas diferencias radican en el contenido de distintos carotenoides con características específicas. El Carofil[®] se puede encontrar en tres colores distintos: amarillo, que corresponde a éster apocarotenoico, rojo, que corresponde a cantaxantina y naranja que es una mezcla de los dos anteriores. Por otro lado, el Lutenal[®] es una mezcla de un antioxidante y cinco xantofilas:

Zeaxantina, Capsantina, Bixina, Capsorubina, Astaxantina(DSM 2005).La utilización de los distintos colores dependerá del uso que se le dé al huevo. Así, para huevos de consumo (de mesa) se recomiendan pequeñas cantidades de Carofil[®] rojo y para huevos de pastelería, se recomienda Carofil[®] amarillo, el cual también es recomendado para pollos broilers(Cuevas et al., 2003).

El desarrollo de este tipo de productos, ha llevado a que se plantee la necesidad de extraer y concentrar carotenoides a partir de fuentes vegetales. De hecho, existen diferentes métodos de extracción como es la utilización de solventes, que es una operación clásica aplicada en muchos procesos industriales, sin embargo, el interés cada vez más creciente de que con estas metodologías se obtengan productos más naturales, se impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción menos contaminantes y con el máximo rendimiento, en un corto periodo de tiempo y con bajo costo.

En este sentido, surgen procesos alternativos que se han desarrollado siguiendo la tendencia de extracción limpia, entre ellas las más destacas son la extracción con fluidos supercríticos (EFS), la extracción acelerada con microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer selectivamente compuestos químicos bajo la combinación de temperatura y presión de un solvente, típicamente dióxido de carbono(Herrero, Cifuentes, & Ibañez, 2006)

La tecnología de extracción por fluidos supercríticos surge como una alternativa para sustituir métodos convencionales como la extracción sólido-líquido o soxhlet. Una propiedad importante de un FSC es su densidad, los valores son cercanos a la densidad de líquidos y dependen de las condiciones de presión y temperatura. Cuando se trata de bajas temperaturas la densidad podrá estar entre 0.9 - 1.22 g/mL y cuando las presión es baja la densidad será mayor a

1.0 g/mL, de esta manera la densidad del disolvente puede aumentar desde valores de un gas hasta valores de un líquido (0.1 - 2.5 g/mL). En la región supercrítica de un fluido, la densidad se controla por medio de la presión y temperatura. Esto hace posible regular el poder disolvente de un FSC. Es importante mencionar que al comprimir el disolvente a las densidades de líquido, únicamente aumentan las interacciones entre el soluto y disolvente. El poder de estas interacciones fija el comportamiento de la solubilidad de un soluto en el FSC(Mukhopadhyay, 2000).

El dióxido de carbono -CO₂- en estado supercrítico es uno de los disolventes más utilizados en este tipo de tecnología, pues abunda en la naturaleza, es barato, fácil de transportar y no es tóxico. En la obtención de carotenoides es el gas más empleado debido al carácter lipofílico de los carotenoides, los cuales se solubilizan fácilmente en el CO₂ supercrítico permitiendo su extracción a bajas temperaturas evitando la degradación de estos compuestos termolábiles, además de una posible extracción selectiva al permitir el cambio de la densidad del CO₂ combinando adecuadamente los valores de presión y temperatura(Zhang & Han, 2009).

Por todo lo anterior, se hace necesario buscar fuentes naturales de pigmentos que permitan el reemplazo de los sintéticos, utilizando métodos de extracción limpia que eviten su deterioro, de tal manera que este trabajo se realizó con el fin de evaluar el potencial de los residuos orgánicos generados en la Central Mayorista de Antioquia como una fuente de ingredientes funcionales.

Objetivos

General

Evaluar el potencial de los residuos orgánicos generados en la Central Mayorista de Antioquia como una fuente de ingredientes funcionales.

Específicos

Caracterizar los residuos con mayor potencialidad, evaluando su composición nutricional, el contenido total de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante usando el método ORAC.

Evaluar la actividad antioxidante, el contenido de fenoles y los carotenos totales de los residuos secados por lecho fluidizado.

Marco teórico

Antioxidantes como ingredientes funcionales

Los antioxidantes fueron comunes en la industria química y de alimentos durante los siglos XIX y XX. En la industria química se habían estudiado los antioxidantes, un grupo de compuestos caracterizados por su capacidad de oxidarse en lugar de otras sustancias presentes en el medio de reacción. Su uso varió, pasando de aditivos en la vulcanización del caucho hasta conservantes de alimentos. Sin embargo, fue solo hasta los años 60 cuando algunos estudios revelaron la importancia de los antioxidantes en la salud, con publicaciones acerca del efecto de los flavonoides, el ácido ascórbico y el estrés oxidativo en el cáncer (Cameron & Pauling, 1978). La expansión en la investigación de los antioxidantes se vería en las décadas subsiguientes, en donde varios investigadores se dedicaron a estudiar el efecto protector de los antioxidantes en diferentes patologías, intentando entender sus mecanismos y blancos moleculares (Willett & MacMahon, 1984).

En cuanto los hallazgos se difundían, el mercado crecía. Para los años 90 el uso de los antioxidantes se había popularizado en los Estados Unidos de América, de tal manera que la mitad de la población consumía suplementos dietarios, un tercio tomaba multivitamínicos y alrededor de una octava parte de la población consumía periódicamente suplementos de vitaminas E y C (Roldan et al., 2004).

La suplementación con antioxidantes está fundamentada en estudios epidemiológicos y clínicos que demuestran la estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desordenes neurodegenerativos y

envejecimiento. Todas estas condiciones patológicas están asociadas a un estado conocido como "estrés oxidativo", es decir, un aumento en las especies oxidantes (principalmente Especies Reactivas del Oxígeno-EROs) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas. Las EROs, según su propio nombre, presentan una reactividad más alta que el oxígeno molecular, algunas de ellas pueden ser radicales libres, es decir moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos periodos de tiempo (Valko et al., 2007).

De estas especies reactivas, las más frecuentes y entre ellas las más relevantes en los sistemas biológicos son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO) y los radicales formados en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (alcoxilo (alkO) y alquilperoxilo (alkOO)). Entre las EROs no radicales se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl). Por otra parte, además de las EROs, existen también especies reactivas del nitrógeno (ERNs) como el óxido nítrico (NO) radical del dióxido de nitrógeno (NO_2), y formas no radicales, como el anión del peroxinitrito (ONOO), el ácido peroxinitroso (ONOOH), el anión del nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCO_2^-$), el catión nitronium (NO^{2+}), y el trióxido del dinitrogeno (N_2O_3); los cuales, junto con las EROs se generan continuamente en cantidades pequeñas en procesos celulares normales como la señalización celular, la neurotransmisión, la relajación del músculo, el peristaltismo, la agregación de las plaquetas, la modulación de la presión arterial, el control del sistema inmune, la fagocitosis, la producción de la energía celular, la regulación del crecimiento celular, la síntesis de componentes biológicos importantes y el metabolismo de xenobióticos (Limon-Pacheco, Gonsebatt, 2009; Valko et al., 2007;).

La exposición a radicales libres de una variedad de fuentes ha hecho que los organismos desarrollen una serie de mecanismos de defensa que incluyen: 1) remoción catalítica de radicales libres por enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx). 2) unión de proteínas a metales prooxidantes como hierro y cobre (transferrina, ceruloplasmina). 3) protección contra daño, como las proteínas de choque térmico y 4) estabilización de radicales libres con donadores de protones o electrones como glutatión (GSH), vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bilirrubina y ácido úrico (Valko et al., 2007).

Vitamina E.

Este es el nombre genérico de una familia homogénea de compuestos que tienen en su estructura una porción hidroquinona metilada en mayor o menor grado y una cadena isoprenoide. El α -tocoferol, el componente más abundante de la vitamina E, es bien conocido y representa la mayor posibilidad de prevención de la peroxidación de membrana por estabilización de radicales peroxilo. La vitamina E tiene un grupo hidroxilo fenólico responsable de su actividad estabilizadora de radicales libres y una cadena (C₁₆H₃₃) que favorece su inserción en la región lipídica de la bicapa. En sistemas biológicos, una molécula de vitamina E permite proteger 10.000 moléculas de ácidos grasos insaturados (Traber & Atkinson, 2007).

La vitamina E puede reaccionar con radicales lipídicos peroxilo, para formar vitamina E radical que es poco reactiva como para reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados, actuando en la reacción de peroxidación lipídica como terminador de cadena. La vitamina E radical producida es estable porque el electrón desapareado del átomo de oxígeno puede ser deslocalizado dentro de la estructura del anillo aromático (Roberfroid & Calderon, 1994)

Vitamina C (Ácido ascórbico).

La vitamina C es un antioxidante que actúa en medios acuosos, como el líquido pleural, el fluido ocular y el espacio intersticial. Actúa en combinación con otros antioxidantes primarios como la vitamina E y los carotenoides, así como en conjunto con las enzimas antioxidantes. La vitamina C coopera con la Vitamina E regenerando el α -tocoferol desde el radical α -tocoferilo en membranas y lipoproteínas. La mayoría de plantas y animales sintetizan ácido ascórbico a partir de la glucosa; sin embargo, los humanos son incapaces de sintetizarlo y requieren obtenerlo de la dieta. El ácido ascórbico es requerido como un cofactor para la actividad enzimática, y su deficiencia dietética causa una enfermedad conocida como escorbuto. La donación de un electrón por el ácido ascórbico produce el radical semidihidroascorbil, que puede ser nuevamente oxidado para dar dihidroascorbato. El ácido ascórbico es el único antioxidante endógeno en plasma que puede proteger contra el daño peroxidativo inducido por radicales peroxilo (Griffiths & Lunec, 2001).

Carotenoides.

Son pigmentos liposolubles responsables del color rojo, amarillo, naranja y púrpura de frutas y vegetales (O'Connell, Ryan, & O'Brien, 2007). También pigmentan la yema de los huevos, la piel de animales como el salmón, pollo y camarón (Badui Dergal, 2006). Químicamente se dividen en Carotenos (ej. Licopeno y β caroteno), las cuales contienen grupos de carbono y de hidrógeno y Xantofilas (ej. luteína, zeaxantina, y β -criptoxantina) considerados derivados oxigenados. El β -caroteno, el α -caroteno, y la β criptoxantina, son considerados precursores de la vitamina A (O'Connell et al., 2007).

El β -caroteno se divide para formar dos moléculas de retinaldehído, una fracción de menor importancia se oxida irreversiblemente a ácido retinoico; la cantidad restante es reducida a retinol. El papel biológico de los carotenoides no está limitado solamente a la producción de retinoides o a la protección del aparato fotosintético de plantas contra el daño de la luz; también se ha demostrado que: previene el daño por fotosensibilidad en bacterias, animales y humanos; disminuye el daño genético y las transformaciones malignas; inhibe la inducción tumoral provocada por los rayos UV y agentes químicos y disminuye las lesiones premalignas en humanos. Su principal mecanismo de estabilización de radicales libres está determinado por su capacidad para estabilizar el oxígeno singlete y convertirlo nuevamente a su forma menos reactiva (triplete) a expensas de una activación intramolecular (Krinsky, 1989).

Compuestos fenólicos y flavonoides:

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos ampliamente distribuidos que abarcan aproximadamente 8.000 sustancias, divididas en 22 grupos con una estructura común, determinada por un anillo aromático unido al menos a un sustituyente hidroxilo (grupo fenol) y frecuentemente se encuentran como derivados de ésteres, éteres y glicósidos. Los compuestos fenólicos han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antiviral, antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, acciones vasodilatadoras, y prevención de enfermedades coronarias y desordenes neurodegenerativos(Havsteen, 2002;Skrede & Wrolstad, 2002)

Por su parte, los flavonoides son compuestos fenólicos con amplia distribución en plantas. Estructuralmente consisten de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos por un heterociclo piránico (anillo C). Biosintéticamente son de origen mixto, pues el anillo A proviene

de la ruta de la malonilcoenzima A, mientras que los anillos B y C provienen de la ruta del ácido shikímico. Para su estudio sistemático, los más de 4000 flavonoides descritos hasta ahora se han clasificado en varios grupos de acuerdo con las variantes estructurales que presenta el anillo C. De acuerdo con esto, los flavonoides se clasifican en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas e isoflavonoides (Tiwari, 2001). Las cantidades de flavonoides y polifenoles en alimentos y plantas incluidas en la dieta humana (frutas, vegetales, té, vino, café, cacao) son mucho más altas que las cantidades de otros antioxidantes como las vitaminas C y E, lo cual hace de estos compuestos los principales antioxidantes adquiridos en la dieta (Lotito & Frei, 2006).

Los flavonoides han mostrado una fuerte actividad antioxidante en sistemas in vitro, principalmente gracias a su bajo potencial de oxidación lo que les confiere capacidad de estabilizar radicales libres donando electrones o átomos de hidrógeno (Bors & Saran, 1987). Sin embargo, a pesar de su fuerte actividad in vitro, se ha visto que su efecto in vivo es limitado por varios factores, entre ellos la baja absorción, la baja biodisponibilidad y la alta tasa de depuración (Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Rémésy, 2005)

En general, la controversia es grande, pero se acepta que una dieta rica en frutas y vegetales con alto contenido de polifenoles está asociada con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, infarto, cáncer y otras enfermedades crónicas. De hecho, 7 de 12 estudios epidemiológicos que evaluaron el riesgo de enfermedades cardiovasculares reportan un efecto protector de los flavonoides (Arts & Hollman, 2005), atribuido principalmente a su actividad antioxidante, puesto que el hecho común de estas patologías es un desbalance (Aviram & Fuhrman, 2002)

Extracción y análisis de carotenoides

Originalmente las técnicas de separación de carotenoides se llevaban a cabo usando la cromatografía de columna abierta a presión atmosférica, con la desventaja de que este método requiere una gran cantidad de muestra. Sin embargo otros investigadores han indicado que esta técnica a pesar de esta desventaja, asegura una buena separación cuando se trata de muestras de alimentos con una composición de carotenoides complejos. Algunos investigadores han encontrado que con esta técnica se pueden obtener resultados similares que las de HPLC (Rodríguez-Bernaldo de Quirós & Costa, 2006)

El análisis general de carotenoides consiste en (1) preparación de la muestra, (2) extracción, (3) partición con un solvente compatible, (4) saponificación y lavado, (5) concentración o evaporación del solvente, (6) separación Cromatográfica, (7) identificación y (8) cuantificación (Rodríguez-Amaya, D. B., Kimura, Godoy, & Amaya-Farfan, 2008)

Debido a la variabilidad natural de las matrices alimentaria y a la variación en la composición cuantitativa y cualitativa de los carotenoides de los alimentos, no se debe usar un solo método para su análisis. Rodríguez-Amaya ha perfeccionado en su laboratorio el método utilizando extracción con acetona fría, partición con éter de petróleo, concentración por rotoevaporación, secado en corriente de nitrógeno, disolución en acetona, separación, identificación y cuantificación, el cual se adecua de acuerdo a la matriz alimentaria. por HPLC (Rodríguez-Amaya et al., 2008).

También existe el método oficial de la AOAC No 970.64 de 1974, para la determinación de carotenos y xantofilas en plantas deshidratadas y alimentos para animales. Dicho método se basa en la extracción de los carotenoides por saponificación en caliente para muestras con xantofilas y en frío para muestras sin xantofilas, seguida de una extracción en cromatografía

abierta de las diferentes fracciones de carotenos y una cuantificación por espectrofotometría (AOAC, 1974).

Residuos agroindustriales como fuente de ingredientes bioactivos

Las frutas cultivadas en las zonas templadas se caracterizan por tener una gran porción comestible y cantidades moderadas de material de desecho, tales como cáscaras y semillas. En contraste, el procesamiento de frutas tropicales y subtropicales genera una mayor cantidad de residuos que unido al aumento de la producción, representa un problema cada vez mayor, pues el material vegetal suele ser propenso a la descomposición microbiana, lo que limita su explotación comercial.

Los estudios epidemiológicos han señalado que el consumo de frutas y hortalizas confiere beneficios para la salud, por ejemplo, menor riesgo de enfermedad coronaria y accidentes cerebrovasculares, así como ciertos tipos de cáncer. Estos beneficios para la salud se atribuyen principalmente a micronutrientes orgánicos, tales como los carotenoides, polifenoles, tocoferoles, vitamina C y otros. Aunque los consumidores son cada vez más conscientes de los problemas de salud relacionados con la dieta (Gilbert, 1997), un grupo numeroso de la población carece de una ingesta abundante de frutas y verduras, de tal manera que los suplementos dietarios y la fortificación de alimentos se han convertido en una vía alternativa al consumo de sustancias bioactivas, sin embargo, dado que los aditivos sintéticos son cada vez más rechazados por los consumidores, los ingredientes funcionales de preferencia deben proceder de fuentes naturales. A continuación se detallan algunos residuos agroindustriales de importancia económica debido a la presencia de compuestos bioactivos.

Residuos de cítrico

El aprovechamiento industrial de las especies de cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en Colombia donde participan empresas dedicadas a toda la cadena productiva (cultivadores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco; pero a medida que la producción crece, se aumenta también la generación de residuos sólidos y líquidos, los cuales están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, aceites esenciales, flavonoides y vitaminas, estando en cantidades diferentes dependiendo de la fracción de la fruta (jugo, cáscara, pulpa, mesocarpio), su estado de madurez y el sistema empleado para la extracción del jugo (Braddock, 1995).

Específicamente, en cuanto a los flavonoides, la naringina es el mayoritario en la toronja, la hesperidina lo es en la naranja, mientras que rutina, hesperidina y diosmina son abundantes en el limón y la mandarina (Kawaii et al., 2000). Otros metabolitos importantes en los cítricos son las cumarinas y ácidos orgánicos como el ácido cítrico y ascórbico (Ogawa et al., 2000).

Las aplicaciones terapéuticas de algunos de estos compuestos son ya conocidas y utilizadas a nivel clínico. La mezcla micronizada de flavonoides Daflón®, que contiene 90 % de diosmina y 10 % de hesperidina es utilizada como un potente medicamento flebotónico para el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica (Lyseng-Williamson & Perry, 2003). Además, son numerosos los productos fitoterapéuticos y alimentos funcionales comercializados a nivel mundial que contienen, totalmente o como parte de sus principios activos, una fracción flavonoide, comúnmente llamada bioflavonoides e incluso denominada genéricamente como vitamina P.

Es tan promisoría la obtención de compuestos con alto valor a partir de residuos de cítricos, que en el estado de la Florida (EUA), una región productora de cítricos, ha surgido el Laboratorio de Investigación en Cítricos y Productos Subtropicales (Citrus and Subtropical Products Research Laboratory, por su nombre en inglés) precisamente con el interés de recuperar, a partir de residuos de cítricos, productos importantes para uso en la salud humana y en alimentos. Ellos han estimado que el aprovechamiento de los residuos generados por la industria procesadora de cítricos en los Estados Unidos de América, podría suministrar más de 10.000 toneladas de hesperidina por año, muy por debajo de la demanda mundial para esta materia prima (Grohmann, Manthey, & Cameron, 2000).

Residuos de mango

El mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) es una de las frutas tropicales más importantes (Ramteke, Vijayalakshmi & Eipeson, 1999), ha ganado gran popularidad en todo el mundo y cada vez mayor importancia también en el mercado europeo. Los principales residuos del procesamiento de mango son la cáscara y la semilla, los cuales corresponden al 35-60% del peso total del fruto (Larrauri, Ruperez, Borroto & Saura-Calixto, 1996).

El aceite de la semilla de mango es una prometedora fuente de aceite comestible y ha atraído la atención debido a su perfil de ácidos grasos y triglicéridos, similar a la de la manteca de cacao. Por lo tanto, la legislación ha permitido recientemente el uso de aceite de semilla de mango como un sustituto de la manteca de cacao. Adicionalmente, la semilla de mango se puede utilizar también como fuente de antioxidantes naturales, principalmente compuestos fenólicos y fosfolípidos (Puravankara, Boghra, & Sharma, 2000), siendo los compuestos fenólicos principalmente ácidos gálico, elágico, y galatos.

Adicionalmente, los extractos etanólicos de semilla de mango son un antimicrobiano de amplio espectro, más eficaces contra bacterias Gram-positivas que contra las bacterias Gram-negativas. Su componente activo parece ser una estructura de tipo polifenólica, sin embargo, su naturaleza exacta aún queda por dilucidar (Kabuki et al., 2000).

Residuos de banano

(*Musa paradisiaca* L., Musaceae) representa uno de los cultivos frutales más importantes, con una producción global anual de más de 50 millones de toneladas. La producción mundial de bananos de cocción (plátanos) se eleva a casi 30 millones de toneladas por año. Las cáscaras constituyen cerca del 30% de la fruta madura. Se estima que cerca de 1000 plantas de banano generan 20 a 25 toneladas de pseudotallos que proporcionarían cerca de 5% de almidón comestible (Anand & Maini, 1997). Los intentos de utilización de residuos de banano incluyen la producción biotecnológica de proteínas, etanol, α -amilasa, hemicelulasas y celulasas (Medeiros et al., 2000). Muy recientemente, los pigmentos tipo antocianinas presentes en las brácteas del banano fueron evaluados para su posible aplicación como colorantes naturales de alimentos. Se concluyó que las brácteas son una buena fuente de antocianinas teniendo las seis antocianidinas más comunes (delfinidina, cianidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y malvidina). Adicionalmente se ha encontrado que la mayoría de los carotenoides que se encuentran en cáscaras de plátano son xantofilas esterificados con miristato, y en menor medida con laurato, palmitato o caprato (Pazmiño-Duran, Giusti, Wrolstad & Gloria, 2001).

Residuos de uva

Aparte de las naranjas, las uvas (*Vitis* sp., Vitaceae) constituyen la mayor cosecha de fruta en el mundo con más de 60 millones de toneladas producidas anualmente. En Colombia, entre los años 2000 y 2008, se ha triplicado el área sembrada de uva, pasando de producir 12.191 Ton a 39.493 Ton, siendo el departamento del Valle del Cauca quien aporta más del 90% de la producción nacional. Gracias a las condiciones agroclimáticas (temperatura, humedad y luminosidad), Colombia produce uva durante todo el año, facilitando también el desarrollo de cepas finas y terruños complejos, lo cual ha permitido el cultivo exitoso de diversos tipos de uva, entre ellos: red-globe, roja, Italia, blanca, river, negra, entre otros; de hecho, el auge en la producción e industrialización de la uva en Colombia ha generado un incremento considerable de residuos agroindustriales, representados en cáscara (piel, orujo o hollejo), semilla, residuos líquidos y semisólidos obtenidos del prensado de la fruta. Los datos a nivel mundial muestran que alrededor del 80% de la cosecha total de uva se utiliza en la elaboración del vino (Mazza & Miniati, 1993), y el orujo representa aproximadamente el 20% del peso de las uvas procesadas. De estos datos se puede calcular que las cantidades de orujo de uva ascienden a más de 9 millones de toneladas por año. Su composición varía considerablemente, dependiendo de la variedad de uva y la tecnología de la vinificación. Una gran variedad de productos como etanol, tartratos, ácido cítrico, aceite de semilla de uva, hidrocoloides, y fibra dietaria se recuperan del orujo de uv (Mazza & Miniati, 1993). Adicionalmente, catequinas, antocianinas, glucósidos de flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos son los principales constituyentes fenólicos de la uva. Particularmente, las antocianinas se han considerado como uno de los componentes más valiosos en la uva, puesto que se ha demostrado que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja

densidad, lo cual está relacionado con su potencial efecto sobre enfermedades cardiovasculares(Frankel, Waterhouse, & Teissedre, 1995).

Residuos de tomate

El jugo de tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL., Solanaceae) es el jugo vegetal más importante con respecto al consumo per cápita, seguido por el jugo de zanahoria. Cerca de 7.3% de la materia prima se pierde en forma de residuos durante la preparación de jugo de tomate. El orujo de tomate está compuesto de las pieles y las semillas de la fruta(Avelino, Avelino, Roseiro, & Collaco, 1997). Las semillas representan aproximadamente el 10% de la fruta y el 60% del total de residuos y son una fuente de proteína (35%) y grasa (25%), de hecho, el aceite de semilla de tomate ha despertado el interés, ya que es rico en ácidos grasos insaturados, especialmente en ácido linoleico (Askar, 1998). Por su parte, el licopeno es el carotenoide principal responsable del color rojo característico de los tomates y constituye aproximadamente del 80 al 90% del contenido total de carotenoides (J. Shi, Le Maguer, & Mike., 2002). La mayoría del licopeno se asocia con la fracción insoluble en agua y con la piel (S. K. Sharma & Maguer, 1996) y por lo tanto, los extractos de la piel son particularmente ricos en licopeno. Recientemente, también se ha descrito la utilización de orujo de tomate como sustrato para la producción de vitamina B12.

Residuos de zanahoria

La zanahoria (*Daucus carota* L., Apiaceae) sus jugos y mezclas se encuentran entre las bebidas no alcohólicas más populares. A pesar de ciertas mejoras técnicas en la transformación, incluido el uso de enzimas de despolimerización, se sabe que una parte importante de compuestos valiosos, tales como los carotenos, los ácidos urónicos y azúcares neutros se conserva aún en el orujo de zanahoria, el cual suele ser desechado. El contenido de caroteno total

en orujo puede ser de hasta 2 g por kg de materia seca, dependiendo de las condiciones de procesamiento(Stoll, Schieber, & Carle, 2001).

Se han hecho varios intentos para la utilización de pulpa de zanahoria en alimentos como el pan, la torta, el aderezo y encurtidos y para la producción de bebidas funcionales. Sin embargo, la aceptación del consumidor de estos productos todavía tiene que demostrarse, sobre todo porque la calidad sensorial puede verse afectada(Henn, T., & Kunz, 1996).

En cuanto a las tecnologías de secado empleadas para la utilización de residuos de zanahoria se ha mostrado que los pigmentos obtenidos por secado por aspersión son sensibles a la degradación durante el almacenamiento, dependiendo de la hora y la temperatura de almacenamiento. Se sugirió que la estabilidad de los carotenoides en polvo puede ser mejorado considerablemente mediante el empleo de métodos adecuados de envasado y las condiciones de almacenamiento. Por su parte, el polvo liofilizado mostró una mayor estabilidad del pigmento durante el almacenamiento de los productos secos(Tang & Chen, 2000). La isomerización que también puede contribuir a la decoloración de los pigmentos de zanahoria no se observó después de 15 semanas de almacenamiento de β -caroteno encapsulado en una matriz de maltodextrina (Desobry, Netto, & Labuza, 1997)

Residuos de remolacha

Solamente en Europa Occidental se producen más de 200.000 toneladas de remolacha (*Beta vulgaris* L. *Chenopodiaceae*) cada año, la mayoría de los cuales (90%) se consume como verdura. El resto se transforma en jugo y en colorante alimentario, conocido como rojo remolacha (Henry, 1996)

El orujo de la industria de la remolacha es rico en betalaínas, corresponde al 15-30% de la materia prima y en su mayoría se dispone para la alimentación animal o producción de abono. La

porción coloreada de la remolacha varía entre 0,4 a 2,0% de la materia seca, dependiendo de la variabilidad intraespecífica, factores edáficos y tratamientos post-cosecha. Las remolachas se encuentran entre los 10 vegetales más potentes en cuanto a capacidad antioxidante, atribuida a un contenido de fenoles totales de 50-60 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco (Vinson, Hao, Su, & Zubik, 1998).

En cuanto a la composición química, se conoce que la fracción coloreada consiste principalmente de betacianinas y betaxantinas, mientras que la porción fenólica de la cascara muestra principalmente triptofano, ácido p-cumárico y ácido ferúlico (Kujala, Lojonen, Klika, & Pihlaja, 2000)

Deshidratación y procesamiento de residuos agroindustriales.

El secado de los alimentos es uno de los métodos más antiguos que ha utilizado el hombre para conservar las propiedades de los productos de la cosecha. El hombre primitivo utilizó la energía solar que calentaba el medio ambiente, para secar sus alimentos al aire libre. Actualmente el secado de frutas y hortalizas es un proceso industrial muy importante en la preservación de la calidad de los productos agrícolas. El secado o deshidratación consiste en la extracción del agua contenida en los alimentos por medios físicos hasta que el nivel de agua sea adecuada para su conservación por largos periodos. El nivel de agua deseado lo determina el tipo de producto final, por ejemplo, el secado de granos y cereales se realiza hasta obtener alrededor de 12% de agua en el producto que es parecido a la humedad del aire normal, en el caso de las frutas secas, los niveles son más bajos (8-10%), en el caso de nueces y semillas los niveles son todavía más bajos (3-5%). Cuando la humedad final que se desea está por debajo de la humedad del aire normal o del medio ambiente, es necesario realizar un proceso controlado de secado utilizando aire calentado por cualquier fuente de energía: solar, eléctrica, por combustión de la madera u otros combustibles derivados del petróleo (R. P. Singh & Heldman, 2009)

El secado solar controlado

Es una alternativa barata en regiones tropicales secas. No así en regiones tropicales húmedas, debido al cambio o aumento repentino de la humedad relativa en el medio ambiente por las lluvias. Para contrarrestar las desventajas del secado al aire libre se han diseñado los secadores o deshidratadores solares, usando la luz solar y las corrientes de aire en forma mucho más eficiente. El secador solar puede ser de varias formas por ejemplo se puede presentar como un cajón semi aislado pintado de negro en su interior y la cara superior de plástico (el vidrio y el plástico dejan pasar la radiación solar sin que se salga nuevamente(Almada, Cáceres, Machaín-Singer, & Pulfer, 2005).

El secado por aire caliente:

Orientado a túneles o cabinas en donde se coloca el producto, es el más eficiente y recomendado, ya que los equipos construidos pueden controlar el proceso de secado: temperatura y velocidad del aire, y la disposición del alimento a secar. Para este secado se utiliza combustible ya sea directamente o sea que el alimento se va a deshidratar por efecto de los gases que se forman quemando el combustible, o indirectamente de tal manera que el combustible calienta el aire que luego se va a utilizar para deshidratar el producto (Singh et al., 2009).

En el secado indirecto se presenta una transferencia de calor por convección y contacto directo del material a deshidratar con el aire caliente en el cual tiene lugar la evaporación. Para que el proceso de secado se realice eficientemente, se requiere establecer las condiciones básicas del proceso como son: temperatura, humedad relativa del aire de secado, flujo de aire, tamaño y forma del producto(Brennan, Butters, & Cowell, 1998).

La temperatura del aire de secado constituye un parámetro básico en el proceso de deshidratación con aire caliente. El incremento de la temperatura aumenta la difusividad del agua

dentro del producto, acelerando de esta forma el proceso. Pero no se debe hacer un excesivo incremento de la temperatura, porque provoca deterioro de la calidad del producto, debido a que se pueden presentar reacciones de pardeamiento, formación de costra superficial, gelatinización de los productos que presentan altos contenidos de almidones y pérdidas de compuestos volátiles (aromas)(Brennan et al., 1998).

El tiempo de secado depende en gran medida de la cantidad de aire que pasa a través del producto. Por lo tanto, se debe establecer la cantidad de producto que se quiere secar por unidad de tiempo y dimensionar el flujo de aire que se requiere para tal fin. Otros factores importantes son el tamaño y la forma del material a deshidratar. La velocidad de secado de un trozo delgado de producto húmedo, es inversamente proporcional al cuadrado del espesor de la pieza. Esta relación está basada en el hecho de que se presenta una mayor resistencia para remoción de la humedad en las áreas internas que en las áreas externas. Como consecuencia de esto, se puede disminuir el tiempo de secado, si disminuye el tamaño de partículas hasta niveles adecuados (Brennan et al., 1998).

Existen variaciones en la geometría de los equipos de secado, entre los equipos más comúnmente utilizados se encuentran los secadores de tambor, secadores rotatorios, secador de túnel, de banda(Singh et al., 2009).

Deshidratación por ósmosis

Este proceso consiste en preservar el alimento conservándolo en jarabe de azúcar en la superficie de la fruta. Luego se deshidratarán directa o indirectamente. Entre las ventajas de este procedimiento están que la concentración de azúcar en la superficie reduce la decoloración y oscurecimiento del producto, adicionalmente el período de deshidratado se reduce considerablemente (R. S. Sharma, Mulvaney, & Rizvi, 2003)

Secado por aspersión

El secado por aspersión es la operación unitaria en la que se transforma un producto desde un estado líquido hasta un estado en forma pulverizado. Es un proceso prácticamente instantáneo de producir un sólido seco a partir de un fluido, siendo el aire caliente el medio que suministra el calor necesario para la evaporación y al mismo tiempo el medio de transporte del agua eliminada (Singh et al., 2009).

Comparado con otros procesos de evaporación, el secado por aspersión tiene la gran ventaja que el producto puede ser secado sin mucha pérdida de volátiles o componentes termolábiles (R. S. Sharma et al., 2003). Estas ventajas son especialmente importantes en la producción de alimentos, de hecho en Colombia es común la presencia de estos equipos a nivel industrial en empresas del sector lechero, plantas de procesamiento de café y producción de aditivos para alimentos (Sharma et al., 2003b).

Una ventaja adicional del secado por atomización es que permite el uso de agentes encapsulantes para lograr, al mismo tiempo que ocurre el secado, la formación de sistemas microencapsulados. En la industria alimentaria se utilizan diferentes materiales como agentes encapsulantes, tales como: carbohidratos, esteroides, gomas, lípidos, proteínas y materiales inorgánicos. Dentro de los carbohidratos, las maltodextrinas son importantes para la preparación de jugos para aspersión ya que son incoloras, inodoras y de baja viscosidad; además permite la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original (Desobry et al., 1997)

Metodología

Reactivos

Se utilizaron reactivos de grado analítico Sigma (St. Louis, MO, USA) como Trolox (6-hidroxi-2,5,7-terametilmroman-2-acido carboxílico), fluoresceína, AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamidina) dihidrocloruro y β -cyclodextrina metilada aleatoriamente (RMCD) para la determinación de las sustancias bioactivas. Para los análisis cromatográficos se emplearon acetona grado HPLC de Merck (Darmstadt, Alemania). Los estándares de luteína, zeaxantina, licopeno, β -caroteno y cantaxantina se adquirieron en ChromaDex Inc. (Irvine, CA, USA).

Para la extracción por fluidos Supercríticos se utilizó dióxido de carbono de 99.9% de pureza de la empresa Indura-Cryogas (Medellín, Colombia)

Materias primas

Los residuos agroindustriales fueron recolectados en la Central Mayorista de Antioquia, localizada en el municipio de Itagüí. Los residuos vegetales empleados fueron Lechuga (*Lactuca sativa*), Tomate de aliño (*Lycopersicum esculentum*), Naranja (*Citrus sinensis*), Repollo (*Brassica oleracea* L.), Pimentón (*Capsicum annum*), Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), Auyama (*Cucurbita máxima*), Maracuyá (*Passiflora edulis*) Papayuela (*Carica papaya* L) y Zanahoria (*Daucus carota*).

Diagnóstico de la oferta de residuos orgánicos generados en Central Mayorista De Antioquia

Para conocer la oferta de residuos orgánicos se hizo una recopilación de la información del archivo de la Central Mayorista de Antioquia especificando el tipo de residuo y volumen de generación, para tener así un panorama de la producción histórica de residuos.

Este diagnóstico, será uno de los criterios de selección de residuos con potencialidad para ser incluidos en un concentrado para gallinas ponedoras.

Caracterización bromatológica de los residuos

En cuanto a sus características bromatológicas se realizaron pruebas de humedad, contenido de proteína, grasa, fibra dietaria, ceniza y carbohidratos, siguiendo los métodos establecidos por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) y descritos a continuación:

Determinación de Humedad

El contenido de humedad se cuantificó utilizando el método No 925.10 de la AOAC. Se pesó una cápsula de porcelana con tapa previamente deshumedecida (H_0), luego se pesaron 5 gramos de muestra fresca en la cápsula y se llevó a una estufa a 105 °C durante 5 horas (H_1). Se retiró de la estufa y se llevó a desecador, se pesó y nuevamente se llevó a la estufa durante una hora más hasta que dos pesadas sucesivas no excedan de 5 mg (H_3).

La humedad del producto expresada en porcentaje, es igual a:

$$\% \text{ humedad} : \frac{H_2 - H_3}{H_2 - H_1} * 100$$

Dónde:

H_1 : masa de la cápsula vacía y de su tapa, en gramos

H_2 : masa de la cápsula tapada con la muestra antes del secado, en gramos

H_3 : masa de la cápsula con tapa más la muestra desecada, en gramos

Determinación de proteína

El contenido de proteína cruda se cuantificó utilizando el método No 954.01 de la AOAC. Se pesaron 0,3000 g de muestra seca en un papel filtro previamente tarado, se llevó al tubo digestor y posteriormente se adicionaron 4 g de catalizador ($K_2SO_4 - CuSO_2$) y 10 mL de ácido sulfúrico al 96% de igual forma se preparó un blanco utilizando un papel filtro. Los tubos digestores se llevaron al equipo de digestión de nitrógeno (VelpScientifica, Italia) durante 45 min a $420^\circ C$ y se dejaron enfriar. Pasado este tiempo se llevó a la unidad de destilación automática (VelpScientifica, Italia) se programó el respectivo protocolo de adición de reactivos (50 mL de agua destilada, 50 mL de NaOH 40 % y 50 mL H_3BO_3), luego de recoger el destilado se procedió a titular, adicionado 3 gotas de indicador de tashiro y se valoró con solución volumétrica de HCl 0.1N hasta que el destilado vire de color verde a violeta y este permanezca por 30 segundos.

El cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula.

$$\%N = \frac{(14 \text{ mg / meq}) \times (V_m - V_b) \times N \times 100}{W}$$

$$\%P = \%N \times F$$

Donde:

%N= Porcentaje de Nitrógeno total

N= Normalidad del Titulante

14mg = Peso de un miliequivalente de Nitrógeno

V_b= Volumen en mL de HCl 0.1N gastados por el blanco de reactivos

V_m= Volumen en mL de HCl 0.1N gastados por la muestra en la titulación

W= Peso en mg de la muestra alimenticia/agrícola

F= 6,25 (Factor de conversión de N a proteína para vegetales)

%P= Porcentaje de proteína en base seca

Determinación de grasa (extracto etéreo)

El contenido de extracto etéreo se cuantificó utilizando el método No 989.05 de la AOAC. Se Pesaron 3 g (P_E) de muestra triturada y seca sobre un papel filtro, luego se llevó a un dedal. Posteriormente se adicióno 200 mL de hexano en un balón con perlas de ebullición previamente pesado (P_0). Se llevó al montaje de soxhlet y la extracción se efectuó durante 3 horas. Se evaporó el solvente, se transfirió a un desecador y se pesó (P_2). Para calcular el porcentaje de extracto etéreo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% EE : \frac{P_1 - P_0}{P_2}$$

Dónde:

- P_0 = Peso del matraz
- P_1 = Peso de la muestra triturada y seca
- P_2 = Peso del residuo

Determinación de cenizas

El contenido de cenizas se cuantificó utilizando el método No 942.05 de la AOAC. Se pesaron 2 g de muestra en un crisol previamente tarado, calcinado y deshumedecido (C_1) y posteriormente calcinados en una mufla a 550°C durante 3 h hasta obtener unas cenizas blancas o grisáceas. Luego se enfrió la mufla hasta $\pm 40^\circ\text{C}$, el crisol se traspasó a un desecador y se pesó a temperatura ambiente (C_2) (Hotwitz and Latimer 2007). El porcentaje de cenizas (%p/p) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%cenizas: \frac{C_2 - C_0}{C_1} \times 100$$

Dónde:

C0: Peso del crisol vacío calcinado

C1: Peso del crisol más la muestra

C2: Peso del crisol más la muestra calcinada

Determinación de fibra dietaria

El contenido de fibra dietaria se calculó utilizando el método No 993.21 de la AOAC. Se pesaron $0.5g \pm 0.1 mg$ de la muestra previamente seca, desengrasada y homogenizada en un beaker de 250 mL, se mezcló con 25 mL de agua desionizada y se llevó al baño María con agitación por 90 minutos a $37^{\circ}C$. Pasado este tiempo se adicionaron 100 mL de etanol al 95%, quedando en reposo a temperatura ambiente por 1 hora y tapado. Luego se filtró al vacío sobre un crisol, previamente tratado con calor, celita y etanol. El residuo se lavó dos veces con 10 mL de etanol al 78%, 2 veces con 10mL de etanol 95% y una vez con 10mL de acetona. Los crisoles se dejaron secando toda noche en estufa a $105^{\circ}C$. Luego se pesaron y se incineraron uno de los duplicados en mufla a $550^{\circ}C$ y al otro duplicado se le analizó las proteínas según Kjeldahl usando el factor de 6.25. El porcentaje de fibra se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \% \text{Residuo} - \% \text{ proteínas} - \% \text{ cenizas}$$

Determinación de Carbohidratos

El contenido de carbohidratos se determinó sustrayendo del 100 % el contenido de Humedad, proteínas, grasa (extracto etéreo), fibra dietaria y cenizas (Primo Yufera 1998).

Determinación de sustancias bioactivas

La determinación de sustancias bioactivas se realizó a los 10 residuos vegetales por triplicado. Los análisis se realizaron durante todo el tiempo bajo luz amarilla para prevenir la degradación de dichas sustancias por acción de la luz (Trela & Waterhouse, 1996) Extracción de carotenoides totales, compuestos fenólicos y antioxidantes

Los extractos para la determinación de carotenoides totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, se prepararon moliendo 10 g de muestra en molino de laboratorio (Dimaq, Rionegro, Colombia) por 30 segundos. Para la preparación de los extractos lipofílicos e hidrofílicos se modificó el método empleado por Sales y Resurrección (2010) para lo cual se adicionaron 0,1 g de la muestra molida en un Eppendorf de 2 mL al cual se le agregó 1.5 mL de una mezcla de hexano y diclorometano (1:1), se llevó al vortex durante un minuto. Luego se sometió a sonicación por 10 minutos a 25°C, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se separó en un tubo de ensayo, considerando este como la primera extracción. (Sales and Resurreccion 2010). El residuo fue sometido nuevamente a una segunda extracción tal como fue descrito anteriormente; el sobrenadante se unió con el primer extracto y fue sometido a secado bajo una corriente de nitrógeno hasta evaporación completa del extractante, constituyéndose este en la fase lipofílica para el análisis de ORAC y de carotenoides totales. El residuo también fue sometido a una corriente de nitrógeno para eliminar el exceso de extractante, siendo este la fase hidrofílica para el análisis de ORAC y compuestos fenólicos. Ambas fases secas se conservaron a – 20°C hasta su análisis.

Determinación del contenido de compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales fue determinado usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y leyendo la absorbancia en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico en concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$, preparados a partir de una solución madre de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico en agua destilada. La muestra utilizada fue la obtenida del extracto hidrofílico reconstituido con 2mL de una mezcla de acetona, agua y ácido acético (70:29,5:0,5), se agitó durante 30 segundos en agitador mecánico y luego se sonicó 3 minutos a 25°C para posteriormente centrifugar a 14.000 rpm por 15 min (Sales & Resurreccion, 2010).

Con las muestras diluidas se procedió al ensayo espectrofotométrico utilizando una microplaca de poliestireno de 96 pozos (Costar, USA) agregando los reactivos en el siguiente orden: agua destilada, dilución respectiva de ácido gálico (10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$), cada muestra a las diluciones indicadas (M). A todos los pozos se les adicionó carbonato de sodio reactivo de folin excepto al blanco (Agua destilada). La microplaca con las muestras, blanco y estándares se llevó al lector de placas a 25 °C durante 60 minutos. Se registró la absorbancia a 760 nm por triplicado (Kahkonen et al., 1999).

La curva de calibración fue construida mediante la ecuación de regresión lineal $Y=mx+b$. Los valores interpolados de x corresponden a la concentración en $\mu\text{g/mL}$ equivalentes de ácido gálico en la muestra. El modelo de cálculo para expresar los resultados como GAE (mg/g) o (mg/100mL) fue:

$$\text{GAE}(\text{mg/g seco}) = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ de la curva}\right) \left(\frac{1\text{mg}}{1000 \text{ug}}\right) (\text{Factor Dilución}) (10\text{ml})}{2 \text{ gramos}}$$

Los valores de GAE de los tres experimentos independientes se expresaron como la media \pm desviación estándar.

Determinación de capacidad antioxidante total (ORAC)

La capacidad antioxidante fue determinada usando el método capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés). Para ello se midió la disminución en la fluorescencia de la fluoresceína como resultado del daño oxidativo causado por el AAPH como fuente de radicales peróxido (ROO)(Ou, Hampsch-Woodill et al. 2001). De esta manera se midió la capacidad de los antioxidantes presentes en las muestras para proteger la fluoresceína del daño oxidativo, midiendo la intensidad de fluorescencia en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Para la curva de calibración se utilizó el análogo soluble en agua del tocoferol conocido como Trolox en concentraciones de 5,10, 25, 50, 100, 150, 200 μ M, en buffer de fosfato 10Mm a pH 7,4. La muestra utilizada fue el extracto lipofílico reconstituido, siguiendo el método modificado de Sales y Resurrección (2010) con acetona; esta solución se mezcló con una solución de β ciclo dextrina metilada al azar (RMCD, de sus siglas en inglés).

En una microplaca de 96 pozos (Costar, USA) se adicionaron en estricto orden fluoresceína, buffer fosfato (B), la dilución respectiva de trolox (5,10, 25, 50, 100, 150, 200 μ M) y la muestra. Se llevó el plato al lector de placas donde se preincubó durante 30 min a 37°C. Pasado este tiempo se le adicionó a cada pozo la solución de AAPH y se procedió a la medición por triplicado de la intensidad de la fluorescencia cada 2 min durante 2 horas con una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente.

La protección del antioxidante se midió a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente. La AUC se calculó mediante la siguiente expresión:

$$AUC = \left(0,5 + \left(\sum_{i=1}^{i=31} \frac{i}{f_1} \right) \right) \cdot CT$$

Dónde:

I = número de ciclos

F = unidades de fluorescencia

CT = tiempo de cada ciclo en minutos. En este caso, CT=2

El área limpia bajo la curva (AUC limpia) se encontró por diferencia entre el AUC de la muestra y el AUC del blanco. Esta AUC limpia (y) se representó delante de la concentración de Trolox como patrón (X) obteniendo la recta de regresión lineal; a partir de aquí, se calcularon las moles equivalentes de Trolox (ET) por litro de muestra.

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} \times \frac{[Trolox]}{[AH]}$$

Dónde:

ABC AH: Área bajo la curva en presencia de antioxidante.

ABC Trolox: Área bajo la curva de Trolox.

[Trolox]: Concentración de Trolox.

[AH]: Concentración de Antioxidante

Determinación del contenido de carotenoides totales

El contenido total de carotenoides fue determinado por medio del espectrofotómetro, para lo cual se utilizó el extracto lipofílico reconstituido en acetona. La absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA); utilizando un plato de cuarzo de 96 pozos de 300 μ L de capacidad (Hellma Analytics, USA). Las curvas de calibración se prepararon usando β -caroteno en concentraciones desde 0,10 a 3,50 μ g/mL. Se

graficaron cinco curvas usando el método de mínimos cuadrados que resulta de la ecuación $y = (0.262x \pm 0.007) - (0.0042 \pm 0.0026)$, $R^2 = 0.9999$, RSD pendiente = 0.85% (n = 5). El resultado final se expresó como mg de β -caroteno por 100 g de muestra (Szydłowska-Czerniak, Trokowski et al. 2011)

Perfiles cromatográficos de los residuos y las materias primas empleadas para la elaboración de los concentrados para gallinas ponedoras

A los residuos vegetales de Lechuga (*Lactuca sativa*), Tomate de aliño (*Lycopersicon esculentum*), Naranja (*Citrus sinensis*), Repollo (*Brassica oleracea* L.), Pimentón (*Capsicum annuum*), Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), Auyama (*Cucurbita máxima*), Maracuyá (*Passiflora edulis*) y Papaya (*Carica papaya* L) y a las materias primas empleadas en la elaboración de concentrados para gallinas como harina de pescado, torta de soya, sorgo, harina de trigo de tercera, harina de carne y hueso, harina de pollo, maíz amarillo y gluten de maíz, se les realizó una extracción previa del contenido de carotenos con saponificación en caliente siguiendo el método No 970.64 de la AOAC. Para ello se pesaron 2 g de muestra en un erlenmeyer de 250 mL, luego se le agregó el extractante compuesto por hexano, acetona, alcohol absoluto y tolueno, se agitó durante un minuto, luego se le agregó KOH y se agitó nuevamente por un minuto, se llevó al baño María a 56 °C por 20 minutos usando un condensador para evitar pérdidas por evaporación del extractante. Pasado este tiempo el contenido se pasó a un balón volumétrico de 100 mL, se le agregó hexano, se agitó por un minuto y se ajustó el volumen con Na_2SO_4 al 10%, para dejarlo en reposo durante una hora en la oscuridad. Pasado este tiempo se extrajo la parte superior y se envasó en viales color ámbar para cromatografía(AOAC 1974).

El perfil cromatográfico se realizó en un HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipado con una columna de fase reversa YMC J'Sphere ODS (250 mm x 4.6 mm, 4 μm de tamaño de partícula) (Waters Co., Milford, MA, USA) con acetona (A) y agua (B) como eluentes. 75% de A se mantuvo durante los primeros 20 minutos, luego se aumentó hasta 80% A hasta 25 minutos y finalmente se regresó a 75% a 30 minutos. El flujo del solvente fue de 1 mL/min, una detección a 452 nm, una temperatura de 30 °C y un volumen de inyección de 20 μL (Znidarcica R, Banb, & Sircelja, 2011). La identificación de los picos de carotenoides se hizo por comparación del tiempo de retención de los estándares inyectados y por su espectro de absorción. Los estándares empleados fueron licopeno, luteína, β-caroteno, zeaxantina y cantaxantina preparados a una concentración de 0,1 mg/mL, disueltos en hexano.

Extracción por fluidos supercríticos de compuestos bioactivos a partir de residuos vegetales (FSC- CO₂)

Para la extracción por fluidos supercríticos se empleó un equipo SFT-150 (Supercritical Fluid Technologies, Newark, DE, USA). 20 g del residuo previamente liofilizado se colocó en el cilindro del equipo de 100 mL de capacidad, acoplado a una manga de lana de polipropileno en la parte superior de esta para proveer un flujo continuo de CO₂. Cada experimento tuvo 10 minutos de remojo (Extracción estática) para aumentar el contacto entre las partículas y el CO₂, seguido por 120 minutos de extracción dinámica a un flujo de 1,8 g/min. Se analizó el efecto de un rango de temperatura (40 a 70 °C) y presión (300 a 600 bares) en el rendimiento de extracción de luteína. El flujo de CO₂ supercrítico del cilindro fue expandido en un vial, donde la muestra extraída y el CO₂ fueron fácilmente separados. Para minimizar la descomposición, oxidación y degradación por la luz ultravioleta de los compuestos extraídos, estos fueron recolectados en viales color ámbar. El rendimiento total fue calculado como la relación de la

masa total del extracto con la masa inicial de la materia prima (base seca), mientras que el rendimiento de la luteína corresponde a los μg de soluto extraído por gramo de material crudo (base seca).

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) fue realizada utilizando un baño de multifrecuencia ultrasónica (Scientz, Ningbo City, China). Las condiciones óptimas para la extracción fueron ajustadas previamente (Datos no mostrados). La extracción se hizo a 25 khz de frecuencia, 300 W de potencia, 40 °C de temperatura, un tiempo de 60 minutos y una relación soluto/solvente del 1% (w/v).

Diseño experimental y análisis estadístico

Análisis de las sustancias bioactivas

Para los análisis de las sustancias bioactivas los datos presentados son el valor promedio resultante de por lo menos tres análisis independientes y fueron analizados estadísticamente usando el software Prisma (Graphpad Software Inc., San Diego, CA).

Extracción por fluidos supercríticos de compuestos bioactivos de dos residuos vegetales (FSC)

La influencia de la presión y la temperatura en la obtención de luteína se midió usando el método de superficie de respuesta. Para el diseño experimental se tuvo en cuenta las respuestas cuadráticas y las interacciones. Para este propósito se propuso un diseño central compuesto, de acuerdo al plan experimental que se observa en la Tabla 1. Se usó un modelo completo de segundo orden polinomial para evaluar el rendimiento total y el rendimiento de luteína (Variable respuesta Y) como una función de variables independientes (X) y sus interacciones, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_j x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{jj} x_j^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

Donde Y es la respuesta, β_0 es el coeficiente constante, β_i, β_j son los coeficientes lineares β_{ii}, β_{jj} son los coeficientes cuadráticos β_{ij} , el coeficiente lineal por interacción lineal y x_i, x_j los valores codificados de la variable independiente.

El diseño experimental, el análisis de datos y la construcción del modelo cuadrático se realizaron usando el software de Statgraphics Centurion (StatPoints Technology Inc., Minneapolis, MN, USA). Se usaron dos réplicas en el centro del diseño para permitir la estimación del error puro de la suma de cuadrados. Las diferencias significativas entre las variables se probaron mediante el procedimiento de análisis de ANOVA de una vía usando GraphPad Prism version 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Las diferencias significativas fueron aceptadas a $P < 0.05$, ver Tabla 1.

Tabla 1. Diseño Central compuesto para la extracción por fluidos supercríticos de luteína proveniente de residuos vegetales y los resultados obtenidos

Corrida	Bloque	Variables		Respuesta	
		Temperatura (°C)	Presión (bar)	Rendimiento Total (g/g)	Luteína (µg/g)
1	1	40	300	3,90	0,18
2	1	70	300	5,60	0,48
3	1	55	600	6,35	1,30
4	1	55	300	4,91	0,26
5	1	55	450	5,80	1,08
6	1	70	450	6,70	1,30
7	1	55	450	5,60	1,12
8	1	40	600	5,69	1,00
9	1	70	600	7,55	1,90
10	1	40	450	5,00	0,60
11	2	40	300	4,00	0,20
12	2	70	300	5,50	0,50
13	2	55	600	6,20	1,25
14	2	55	300	4,80	0,25
15	2	55	450	5,75	1,00
16	2	70	450	6,60	1,20
17	2	55	450	5,70	1,20
18	2	40	600	5,60	0,98
19	2	70	600	7,60	2,00
20	2	40	450	4,90	0,65

Secado por lecho fluidizado

Los cinco residuos seleccionados fueron secados en un equipo de lecho fluidizado (Dimac, Rionegro, Colombia) con las condiciones observadas en la tabla 2, hasta alcanzar un porcentaje de humedad del 10±2

Tabla 2. Condiciones de secado

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	50
Válvula alveolar (rpm)	50
Válvula de corte de flujo, abertura (s)	1
Válvula de corte de flujo, cierre (s)	1
Ventilador (rpm)	3120

Resultados y discusión

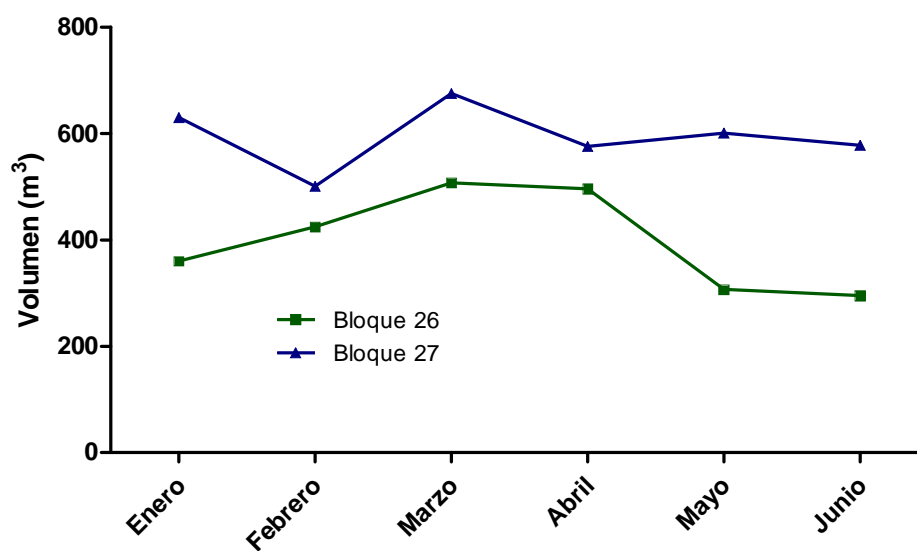
Diagnóstico de la oferta de residuos orgánicos generados en Central mayorista de Antioquia

La Central Mayorista de Antioquia es una empresa dedicada a la comercialización y distribución de abarrotes, frutas y verduras tanto internamente como a clientes externos.

Dentro de la Central Mayorista de Antioquia se establece una clasificación de los residuos generados al interior de la institución, que en términos de orgánicos corresponde a restos de alimentos, residuos de vegetales, y rechazo de legumbres, frutas y verduras.

En términos de la investigación es de especial interés el rechazo de legumbres, frutas y verduras ya que estos son los que mayor volumen representan, según los siguientes datos de aforo de residuos orgánicos (entiéndase residuos orgánico como la mezcla entre residuos de alimentos, vegetales, y rechazo de fruta y verdura) de los bloques 26 y 27 para el año 2010 (CMA, 2010), ver figura 1.

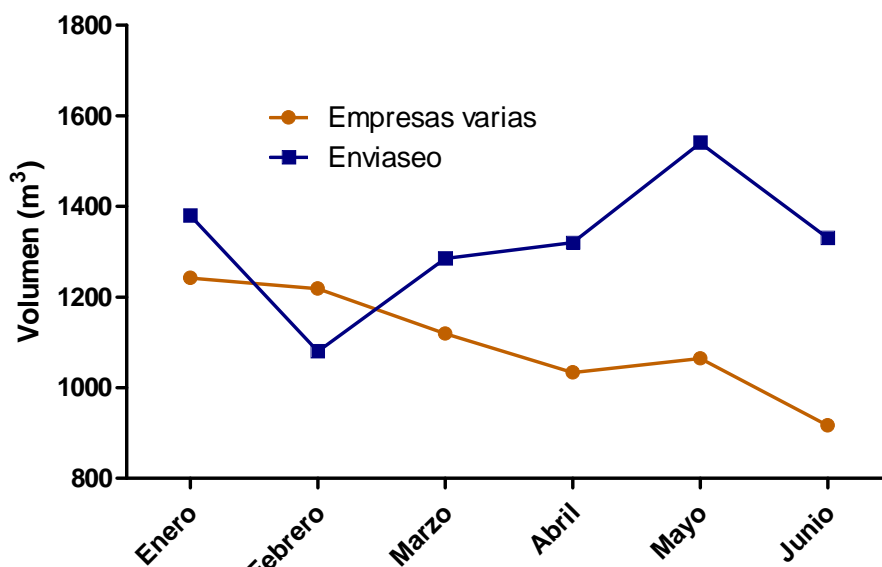
Figura 1. Aforo de residuos orgánicos (m³) Bloques 26,27 por



Teniendo en cuenta que estos residuos orgánicos son mezclados, es de importancia vital para que el producto final sea industrializable, una separación en la fuente permitiendo así que la carga microbiana de los rechazos de frutas y vegetales disminuya notablemente y el resultado final sea apto para el consumo animal.

Esta separación de residuos posibilita una reducción de los residuos entregados a los operadores de aseo que recolectan los residuos, que para el caso de La Central Mayorista son Enviaseo y Empresas Varias de Medellín como se muestra en la Figura.

Figura 2. Evacuación de residuos por parte de empresas de aseo.



La disminución en la evacuación de los residuos podría representar para los copropietarios un ahorro en la tasa retributiva que se paga por entregar los desechos a estos operadores.

Los rechazos de frutas y vegetales por parte de la Central Mayorista de Antioquia ocurren por uno o varios de los siguientes motivos:

- Planificación inadecuada de cosechas
- Temporadas altas de cosecha
- Daños mecánicos (Cortes, magulladuras)
- Causas biológicas (hongos, virus, bacterias)
- Empaque, transporte y almacenamientos inadecuado

- Inadecuado manejo de inventarios
- Clasificación en el campo

Consecuente con estos problemas observados se escogieron los 10 residuos de mayor volumen de producción y con reportes de contenido de carotenoides según literatura, ver tabla 3.

Tabla 3. Volumen de generación de residuos en la central Mayorista de Antioquia

Residuo	Volumen generado en m³/ día
Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	8,17
Tomate de aliño (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	6,57
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	6,34
Repollo (<i>Brassica oleracea L.</i>)	3,69
Pimentón (<i>Capsicum annum</i>)	2,18
Tomate de árbol (<i>Cyphomandra betacea</i>)	1,35
Auyama (<i>Cucurbita máxima</i>)	1,14
Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)	1,14
Papaya (<i>Carica papaya L.</i>)	1,04
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	0,31

Determinación de sustancias bioactivas

Los resultados de contenido de carotenoides totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) analizados en los 10 residuos vegetales se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Contenido de carotenoides totales, Compuestos Fenólicos y Capacidad antioxidante (ORAC)

Muestra	*Carotenoides totales Mg β -caroteno/100g	*Compuestos fenólicos mg GAE/100g	*Capacidad Antioxidante (ORAC) μ molesTEAC/100g
Pimentón	16,16	96,63	2550,61
Zanahoria	10,36	5,90	3151,46
Tomate de aliño	8,37	16,45	1783,90
Repollo	7,36	44,48	1569,71
Lechuga	4,41	19,80	863,53
Auyama	1,51	10,69	142,70
Papaya	1,35	57,13	743,48
Tomate de árbol	1,94	69,62	1776,48
Naranja	1,08	217,45	3500,12
Maracuyá	2,31	69,42	1619,08

*Los resultados están expresados en base húmeda

Los residuos con mejor contenido de carotenoides totales son en orden pimentón, zanahoria, tomate de aliño, repollo y lechuga, por dicha razón se escogieron para formular la premezcla, sumado a que la mayoría de ellos presentan volúmenes altos de generación en la Central Mayorista de Antioquia, ver Figura 3.

En cuanto al contenido de carotenoides hallados en el pimentón estos se encuentran dentro del rango de los reportados por García *et al* 2007 en pimentones frescos de diferentes años de cosecha que están entre 7 a 25 mg/100g (García et al., 2007)

La zanahoria presenta un contenido de carotenos mucho mayor al reportado por Niizu y Rodríguez-Amaya, en zanahorias frescas recolectados en 6 diferentes épocas del año en tres supermercados diferentes Sao Paulo, Brasil, cuyo concentración estuvo alrededor de 6,195 mg/100g. Lo mismo sucede con el tomate de aliño y la lechuga en el cual ellos reportan 3,9 y 2,98 mg/100g respectivamente (Niizu & Rodríguez-Amaya, 2005)

Una base de datos sobre contenido de carotenos en alimentos brasileiros fue recolectada por Rodríguez-Amaya y Kimura, en donde se puede apreciar que el contenido de carotenos de diversas frutas y verduras; en este caso el valor encontrado del repollo supera enormemente al

reportado en esta base de datos que es de 1,6 mg/100g para hojas externas de repollo. Lo mismo sucede con el maracuyá, el cual reporta una cantidad de 0,47 mg/100g, 10 veces menor a la nuestra. En cuanto a la auyama se encontró exactamente el mismo (Rodríguez-Amaya, D. B., Kimura et al., 2008).

Con respecto a la naranja se encontró que su valor de carotenos es 10 veces superior a los reportados por Gama y Sylos, quienes encontraron en el jugo de la naranjas Valencia brasilera entre 0,099 a 0,192 mg/100g(Gama & Sylos, 2005), mientras que Rodríguez-Amaya y Kimura solo encontraron trazas.

En cuanto al tomate de árbol, los reportes en la literatura de su contenido de carotenos son muy pocos, quizás por ser esta una fruta autóctona, ya que se conoce que es una planta originaria de los Andes Peruanos dispersa en otros países de la región andina como Chile, norte de Argentina, Ecuador, Bolivia y Colombia (Velástegui & Cherrez, 1992). Por lo anterior, el dato reportado en este estudio se constituye en una referencia para la comunidad científica interesada en el estudio de las sustancias bioactivas presentes en este tipo de frutas. Sin embargo Hernández y Moreno reportaron un contenido de carotenos mucho más bajo que el nuestro de entre 0,004 a 0012 mg/mL en Tamarillo (*Cyphomandra betacea Sendt*) cultivado artesanalmente en algunas regiones de Venezuela y similar al tomate de árbol cultivado en Colombia(Hernández & Alvarez, 2000)

Los residuos con mayor contenido de fenoles totales fueron en orden Naranja, pimentón, maracuyá, papaya y repollo, diferente al orden encontrado para carotenos totales, coincidiendo solo el pimentón y el repollo en estos cinco primeros.

Con respecto a los valores de fenoles totales, se encontró que el pimentón, la naranja, el maracuyá y la lechuga presentaron valores mayores a los reportados por algunos investigadores.

En el caso del pimentón este presentó un contenido un poco mayor en fenoles totales a los hallados por Serrano de 80 mg GAE/100 g en pimentones cultivados por métodos tradicionales en Murcia, España (Serrano Martinez, 2008). De igual forma sucedió con la naranja donde se encontró el doble del valor reportado por Fadlinizal de 135 mg GAE/100 g en naranja de Malasia(*Citrus sinensis*)(Fadlinizal, Ghafar, Prasad, Weng, & Ismail, 2010). Para el maracuyá se encontró un valor tres veces y medio superior al encontrado por Kuskoki de 20 mg GAE/100 g en pulpa congelada de maracuyá(Kuskoski, Asuero, Troncoso, & Fett, 2006). Para la lechuga el valor encontrado estuvo cercano al reportado por Khanam de 15, 22 mg GAE/100 g (Khanam, Oba, Yanase, & Murakami, 2012).

El repollo, la zanahoria y la papaya presentaron valores de fenoles totales que estuvieron muy por debajo de los reportados por la literatura, mientras que los de la auyama, el tomate de aliño y el tomate de árbol fueron menores pero más cercanos. Kusznierewicz *et al* reportaron valores de fenoles totales de entre 241 a 491 mg GAE/100 g para repollos procedentes de cuatro países diferentes como Inglaterra, Bélgica, Alemania y Polonia, mientras que en este estudio se encontró un valor muy inferior de 44,48 mg GAE/100 g(Kusznierewicz et al., 2008). En cuanto a la zanahoria Goncalves *et al* reportaron un valor para zanahoria fresca procedente de un mercado local en Lisboa, Portugal de 84 mg GAE/100 g 14 veces mayor al reportado en este trabajo(Gonçalvesa, Pinheiroa, Abreu, Brandão, & Silvab, 2010). Para la papaya un estudio realizado en Tailandia reportó un valor cinco veces mayor correspondiente a 300 mg GAE/100 g en papaya procedente de los supermercados locales de Bangkok(Patthamakanokporn, Puwastien, Nitithamyong, & Sirichakwal, 2008). Otro estudio también realizado en Tailandia con calabaza (*Curcubita máxima*), similar a la auyama reportó un valor un poco más cercano de 23,6 mg GAE/100g (Wangcharoen & Morasuk, 2007). Para el tomate de aliño y el tomate de árbol se

encontraron valores cercanos de 25, 8 y 92 mg GAE/100 g respectivamente(Bravo, S., García-Alonso, & Al., 2003;Torres Fasantes, 2006)

Los residuos con mayores valores de ORAC fueron en su orden naranja, zanahoria, pimentón, tomate de aliño y tomate de árbol. De acuerdo a la base de datos para valores ORAC del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) de algunos alimentos seleccionados, se encontró que la zanahoria tiene un valor en ORAC cuatro veces y media más que el reportado en dicha base, así mismo para el tomate de aliño y repollo cuyo valor encontrado fue 3 veces mayor; para la papaya dos veces y medio mayor y para la naranja dos veces más. Caso contrario sucedió con el pimentón cuyo valor es 8 veces menor que el reportado para pimentón rojo (Cayenne o Red Pepper en inglés). La auyama presentó un valor tres veces menor que el reportado, aclarando que fue comparada con calabaza que es la especie que más se asemeja a la auyama colombiana; similar sucedió con la lechuga cuyo valor es dos veces menor a la reportada en esta base de datos(Haytowitz & Bhagwat, 2010).

En una investigación realizada en la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Ecuador, encontraron un valor de ORAC para el tomate de árbol cultivar amarillo puntón (*Solanum betaceum Cav*), similar al cultivado en Colombia de 720 μ moles TEAC/100g, aproximadamente dos veces menor al encontrado en esta investigación(Torres Fasantes 2006).

En cuanto al maracuyá en un estudio realizado en pulpas de frutas congeladas en Brasil, encontraron un valor de ORAC de 836 μ moles TEAC/100g, mucho menor al encontrado en este estudio que fue de 1629,08 μ moles TEAC/100g (Kuskoski et al., 2006).

Las diferencias encontradas en los valores de las sustancias bioactivas de las frutas y vegetales analizados con respecto a otros investigadores pueden estar influenciadas por el

cultivar, grado de madurez, año de la cosecha, condiciones edafoclimáticas y el protocolo empleado

Determinación de sustancias bioactivas después del secado

Los resultados de contenido de carotenoides totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) analizados en los 5 residuos vegetales seleccionados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Contenido de carotenoides totales, Compuestos Fenólicos y Capacidad antioxidante (ORAC) después del secado

Muestra	*Carotenoides totales Mg β -caroteno/100g	*Compuestos fenólicos mg GAE/100g	*Capacidad Antioxidante (ORAC) μ molesTEAC/100g
Pimentón	5,10	10,95	352,68
Zanahoria	0,87	2,11	229,97
Tomate de aliño	0,97	6,81	67,80
Repollo	0,24	6,21	141,73
Lechuga	1,38	5,24	243,69

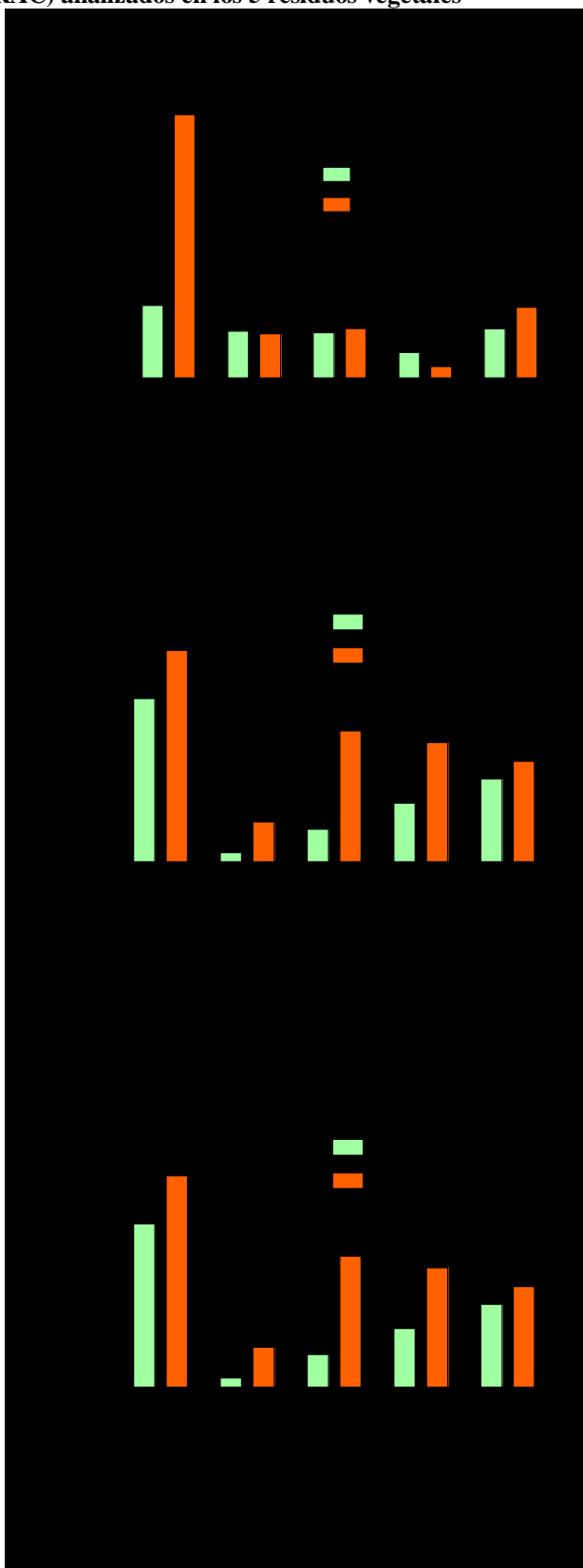
*Los resultados están expresados en base seca.

En la gráfica 4 se puede observar como el contenido de carotenos no se vio influenciado por el tratamiento térmico para la zanahoria lechuga, repollo y tomate de aliño, caso contrario ocurrió con el pimiento el cual presento un incremento 5 veces más que en el producto fresco

Se puede evidenciar que el contenido de compuestos fenólicos se incrementó en los 5 materiales vegetales con el secado, tal comportamiento es debido a que el incremento de temperatura permite que los grupos hidroxilo queden más expuestos, facilitando la donación de protones de los compuestos fenólicos, los cuales se encontraban inicialmente condensados (Rababah, Ereifej, & Howard, 2005)(Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, 2009)

En cuanto a la capacidad antioxidante del pimiento, repollo y tomate de aliño se presentó un incremento en el valor ORAC con respecto al producto fresco, dicho aumento es debido a que la deshidratación de ciertos frutas y vegetales favorece la conservación de las sustancias bioactivas (Gamboa-Santos, Soria, Villamiel, & Montilla, 2013)(Rababah et al., 2005)

Figura 4. Efecto del secado sobre Contenido de carotenoides totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (ORAC) analizados en los 5 residuos vegetales



En el caso de la zanahoria y la lechuga se vio afectada la capacidad antioxidante debido al tratamiento térmico tal y como lo reporta Rodríguez-Amaya (2001), esto ocurre gracias a la termolabilidad que presenta ciertos compuestos (Rodríguez-amaya, 2001)

Análisis bromatológicos

Los análisis bromatológicos se realizaron a los cinco residuos con mejor contenido de carotenoides totales en su orden pimentón, zanahoria, tomate de aliño, repollo y lechuga, ver Tabla 6.

Tabla 6. Composición bromatológica de cinco residuos vegetales en base seca

Muestra	Humedad (%)	Extracto Etéreo (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Fibra Dietaria (%)
Pimentón	88,59	5,79	7,47	5,19	20,90
Zanahoria	88,72	2,22	6,51	8,46	9,55
Tomate de aliño	90,56	3,43	12,47	9,23	1,20
Repollo	85,57	4,01	20,96	12,57	36,04
Lechuga	95,43	3,01	16,80	19,07	52,38

Es importante resaltar que la humedad es un dato muy importante a tener en cuenta en el proceso de secado de los residuos, en este caso el residuo con mayor contenido de humedad es la lechuga.

Los demás parámetros, en especial el contenido de proteína, son importantes en la formulación del alimento balanceado para animales, pues la inclusión del residuo como premezcla no debe afectar considerablemente los requerimientos nutricionales los cuales deben ser de 16.5 a 17% de proteína cruda.

Cabe anotar también, el alto contenido de fibra dietaria de algunos residuos como lechuga, repollo y pimentón, lo cual pudiera abrir otras posibilidades de aplicación distintas a las visualizadas en este trabajo.

Perfiles cromatográficos de los residuos

A continuación se presentan los perfiles cromatográficos de los residuos correspondientes a Pimentón, Zanahoria, Tomate de aliño, Repollo, Lechuga, Auyama, Papaya, Tomate de árbol, Naranja y Maracuyá, ver figura 5 a la Figura 15. En la Figura 16 se puede observar una comparación de los perfiles cromatográficos de los residuos que contienen licopeno y en la Figura 17 se comparan los perfiles cromatográficos de los residuos que contienen luteína. En la tabla 7 se presenta la abundancia relativa de los carotenoides presentes en ellos.

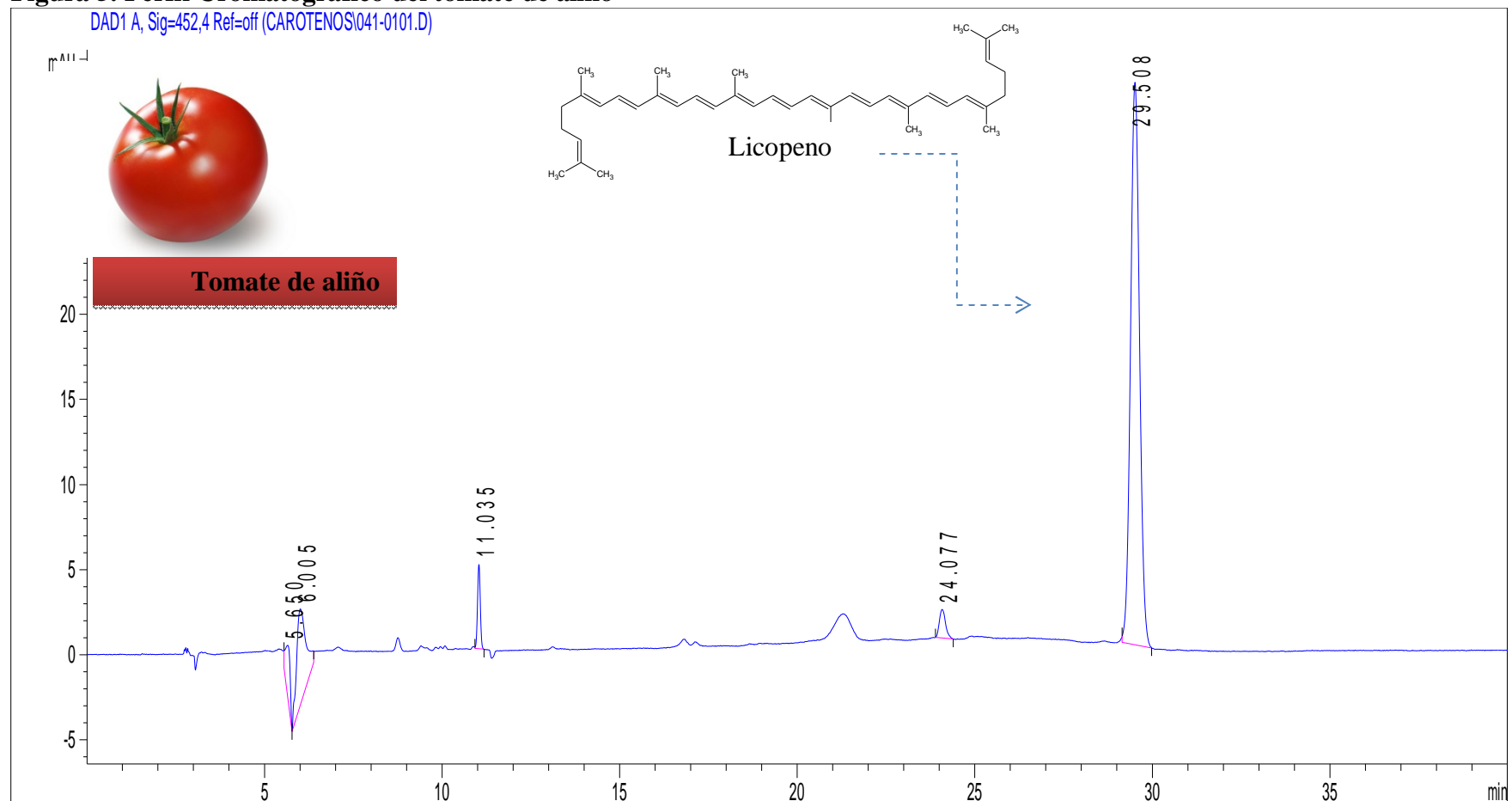
Figura 5. Perfil Cromatográfico del tomate de aliño

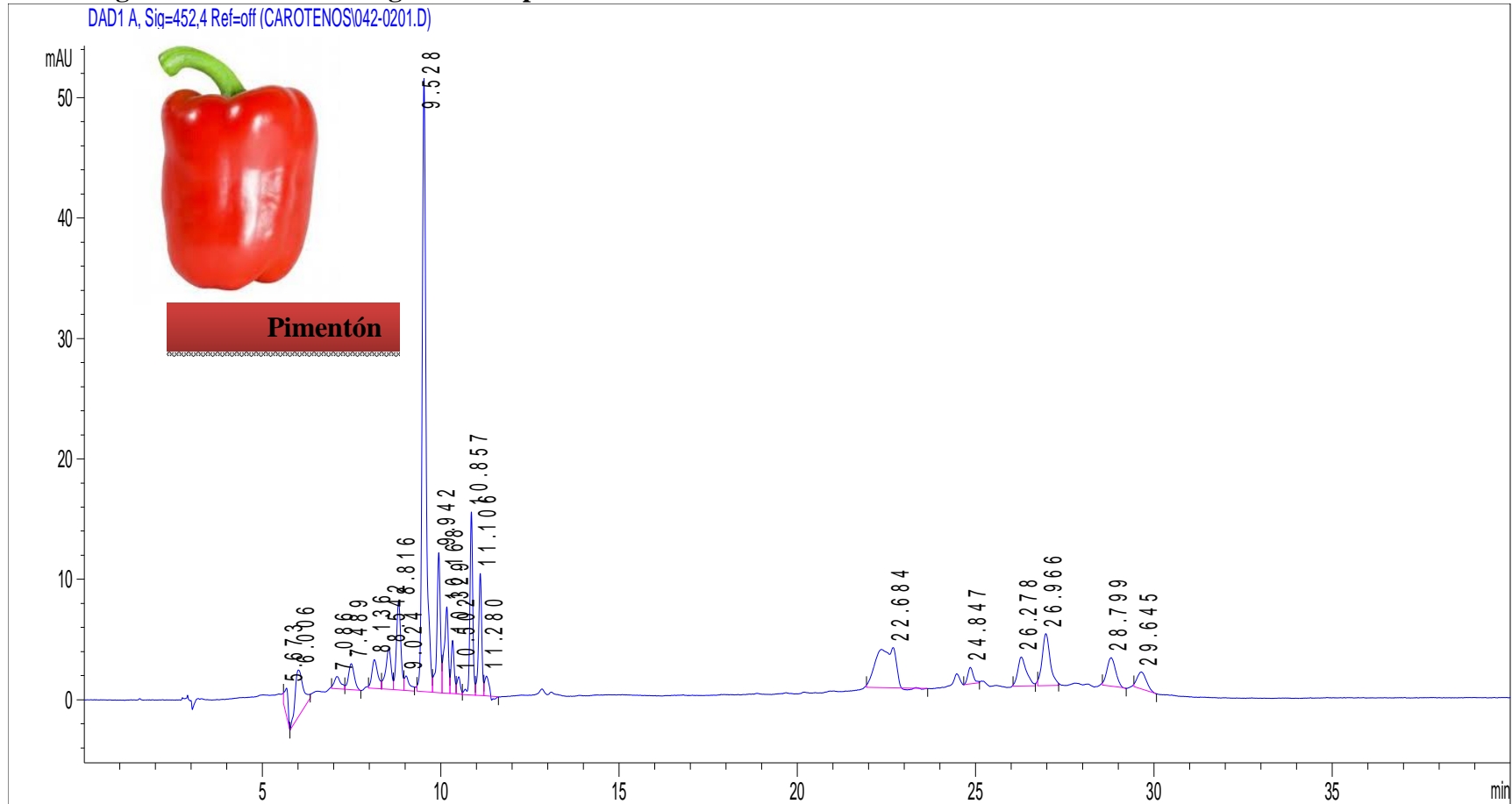
Figura 6. Perfil Cromatográfico del pimentón.

Figura 7. Perfil Cromatográfico de zanahoria

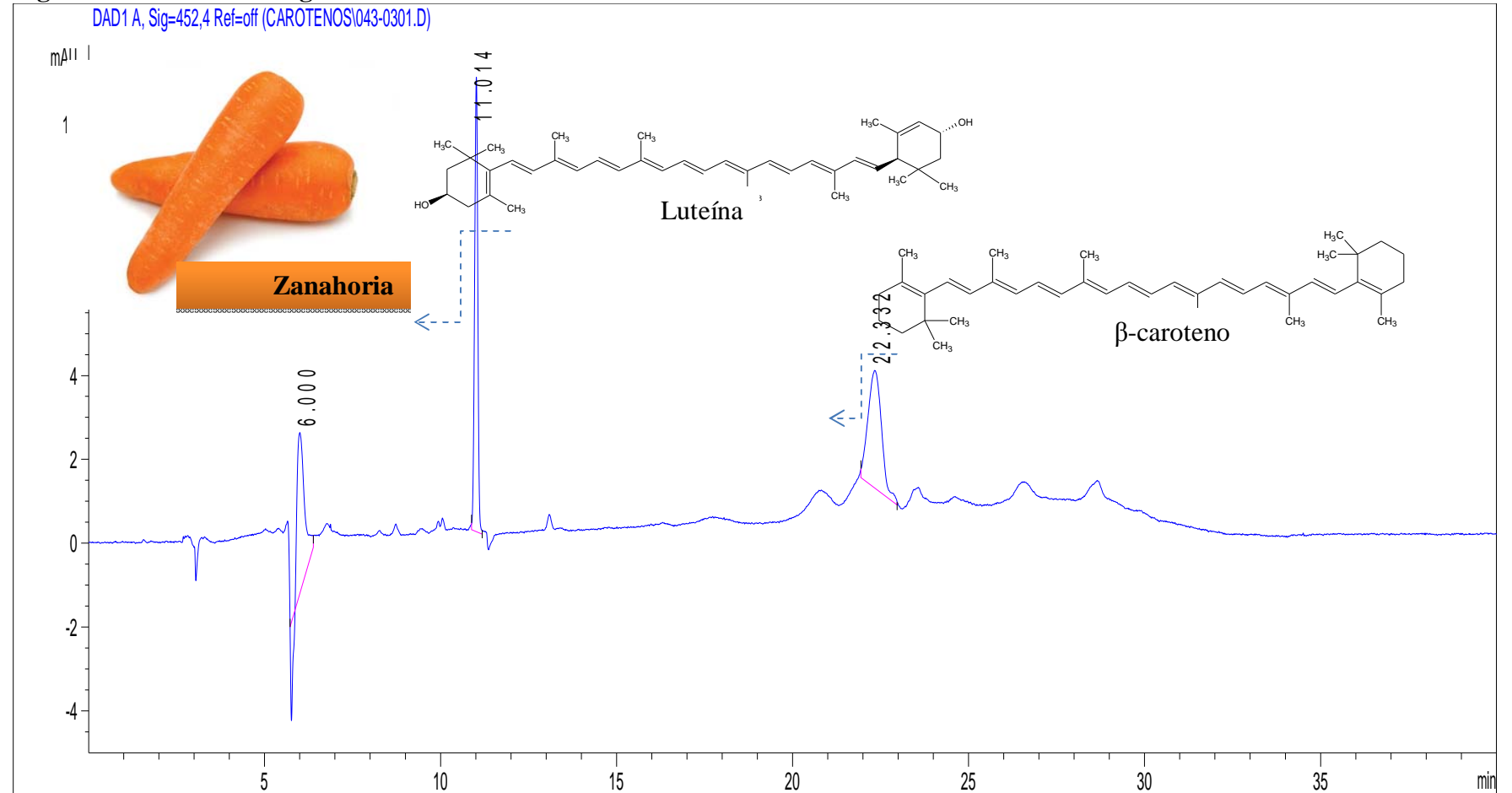


Figura 8. Perfil Cromatográfico de la naranja

DAD1 A, Sig=452,4 Ref=off (CAROTENOS\044-0401.D)

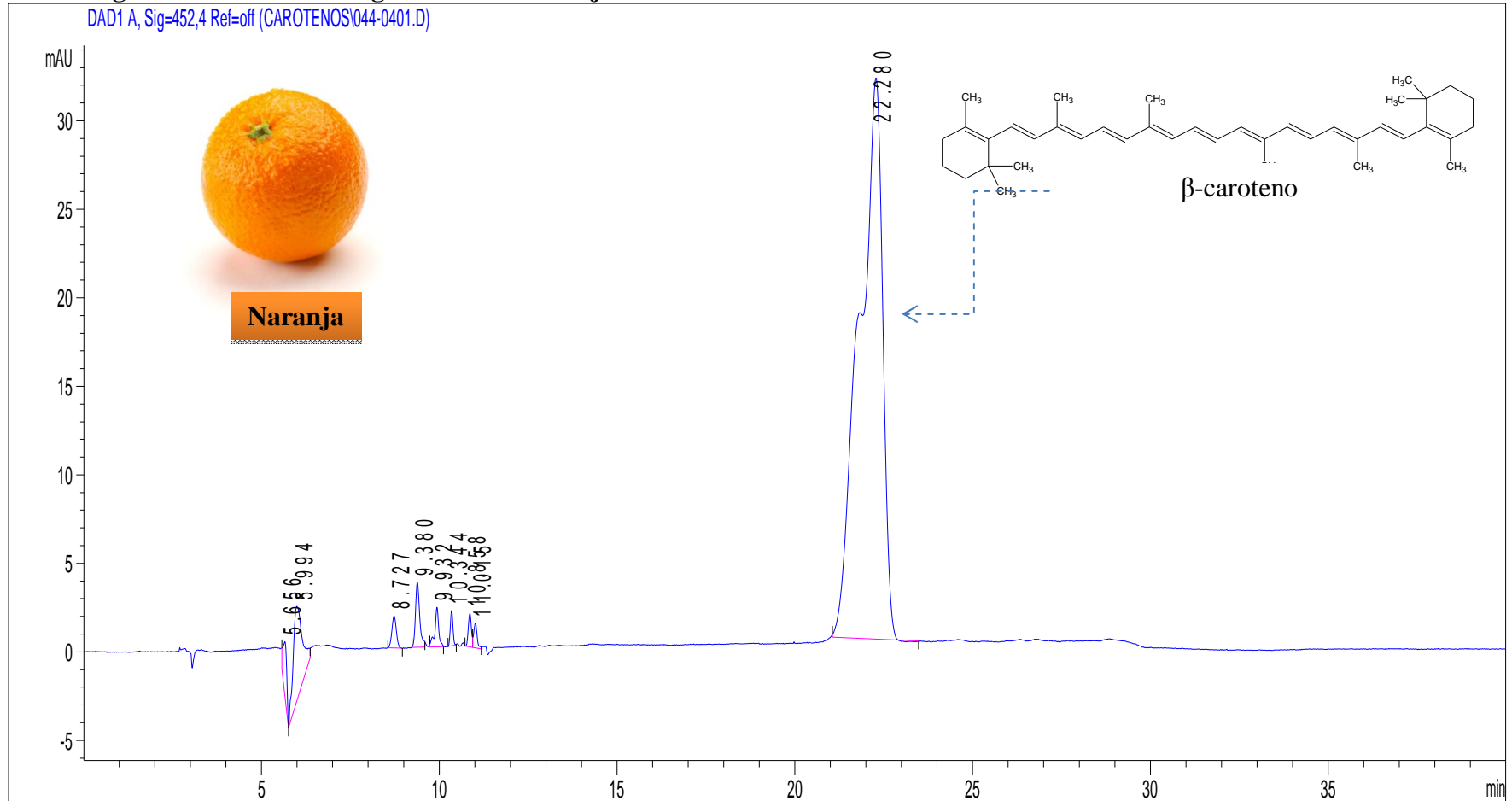


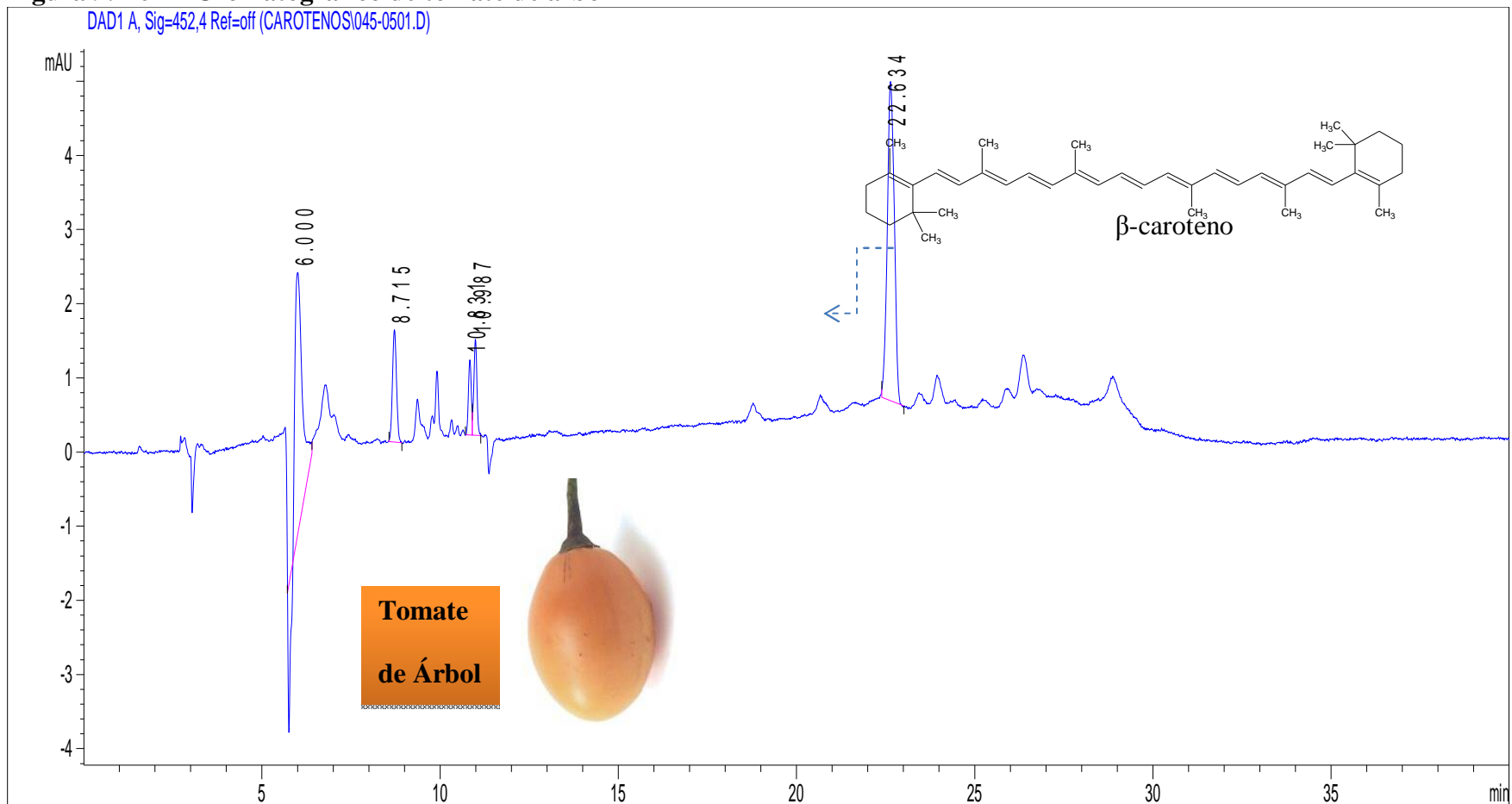
Figura 9. Perfil Cromatografico de tomate de árbol

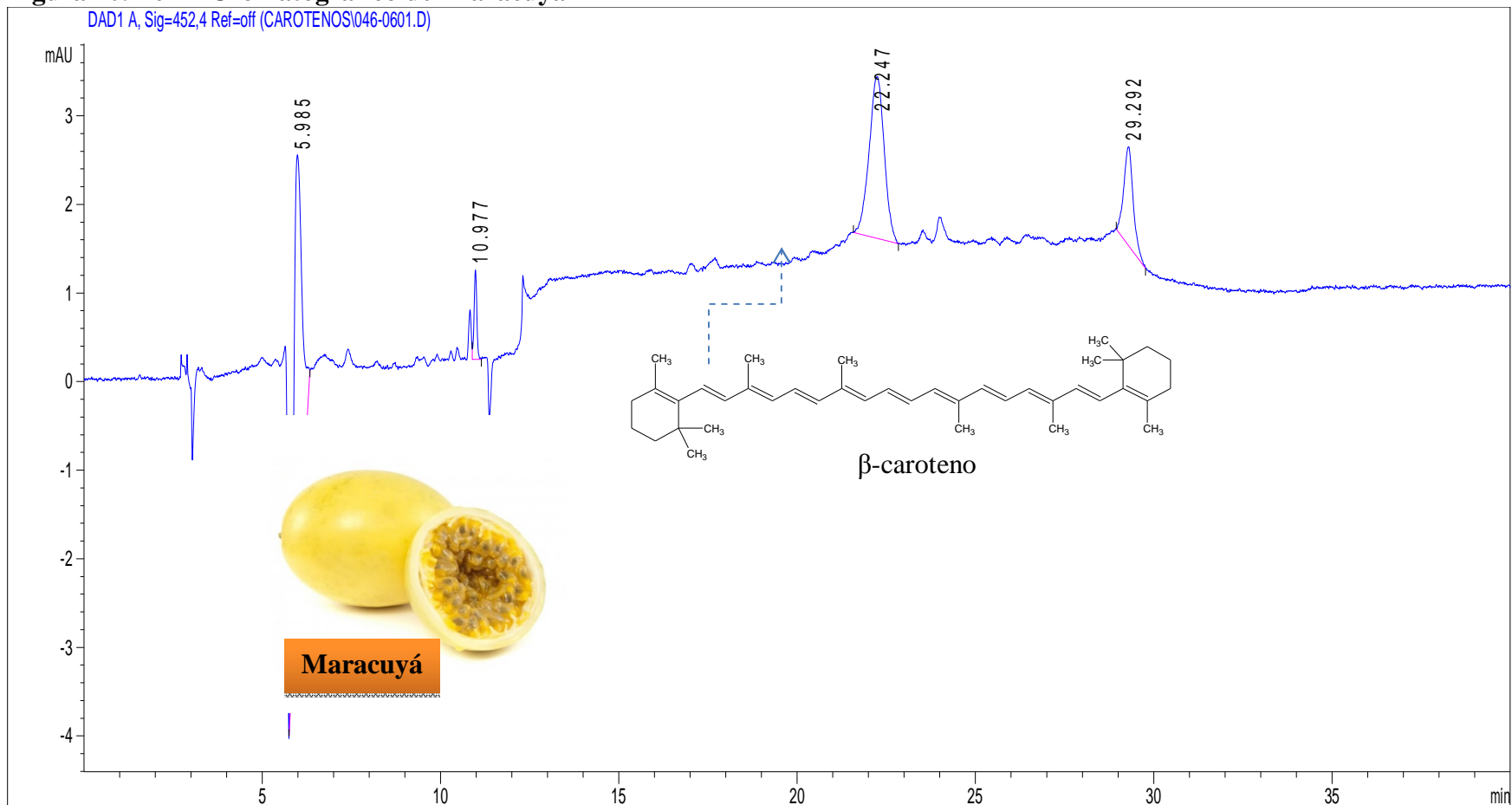
Figura 10. Perfil Cromatográfico del maracuyá

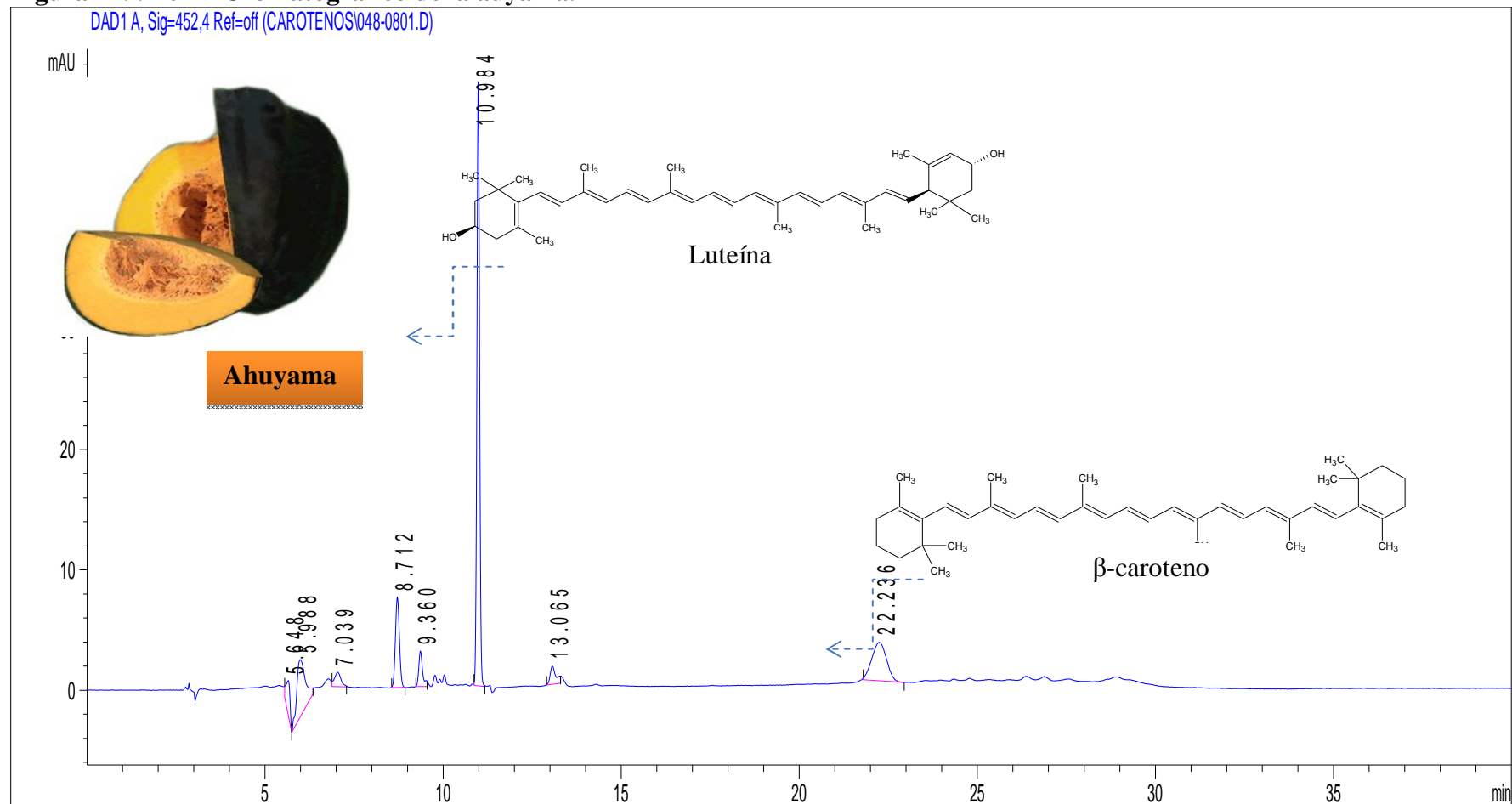
Figura 12. . Perfil Cromatográfico de la auyama.

Figura 13. Perfil Cromatográfico del repollo

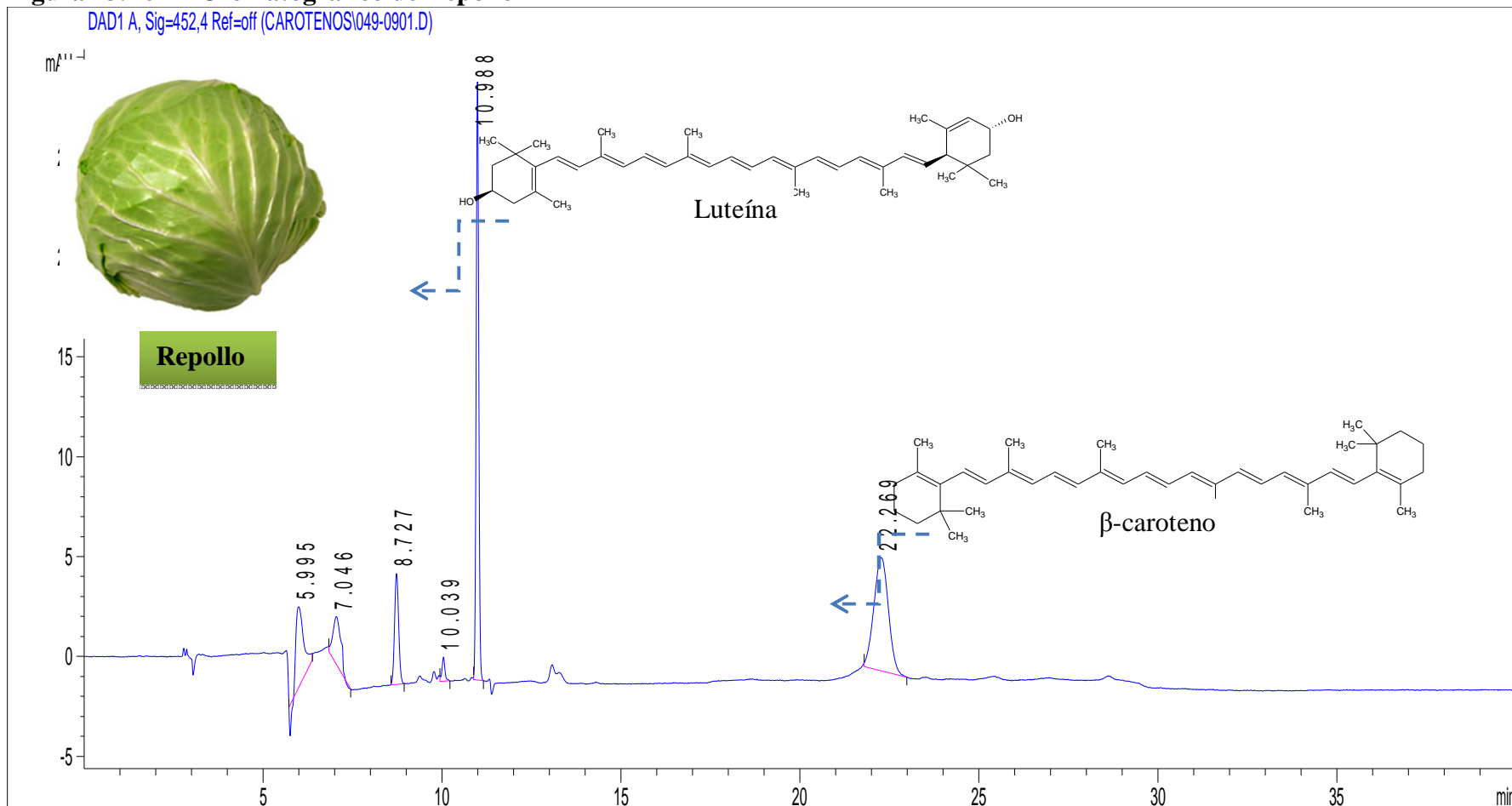


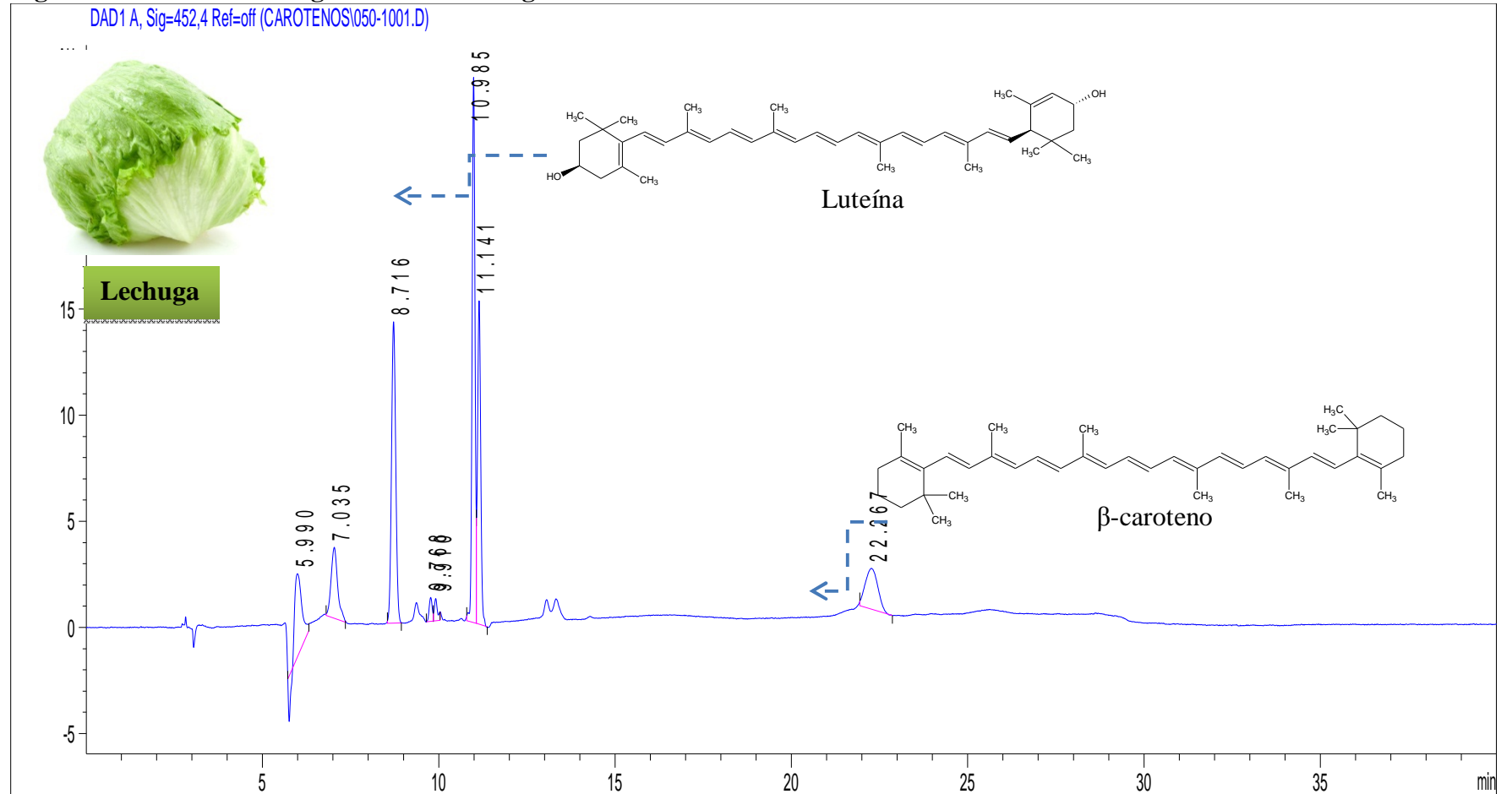
Figura. 14. Perfil Cromatográfico de la lechuga

Tabla 7. Presencia relativa de carotenoides en los residuos

Residuo	Componente				
	β -caroteno	Licopeno	Luteína	Cantaxantina	Zeaxantina
Tomate de aliño	*	***	*		
Pimentón					
Zanahoria	*		**		
Naranja	***				
Tomate de árbol	*				
Maracuyá	*	*			
Papaya	**	***			
Ahuyama	*		***		
Repollo	*		***		
Lechuga	*		***		

* No es un valor cuantitativo. Hace referencia a la abundancia relativa del componente de acuerdo con su área en el cromatograma.

Perfiles cromatográficos de las materias primas empleadas para la elaboración de los concentrados para gallinas ponedoras

En las primas empleadas para la elaboración de los concentrados para gallinas ponedoras, se analizó el contenido de zeaxantina, ya que este es uno de los pigmentos responsables de la pigmentación de la yema del huevo y se deseaba saber si todas las materias primas lo contenían, ver Tabla 8 y la Figura 17

Tabla 8. Contenido de Zeaxantina en materias primas empleadas en la elaboración de los concentrados para gallinas ponedoras.

Muestra	Contenido De Zeaxantina (mg/g)
Harina de pescado	NC
Torta de soya importada	NC
Sorgo	NC
Harina de trigo de tercera	NC
Harina de carne y hueso	NC
Harina de pollo	NC
Maíz amarillo	0.82
Gluten de maíz	44.28

NC: no cuantificable

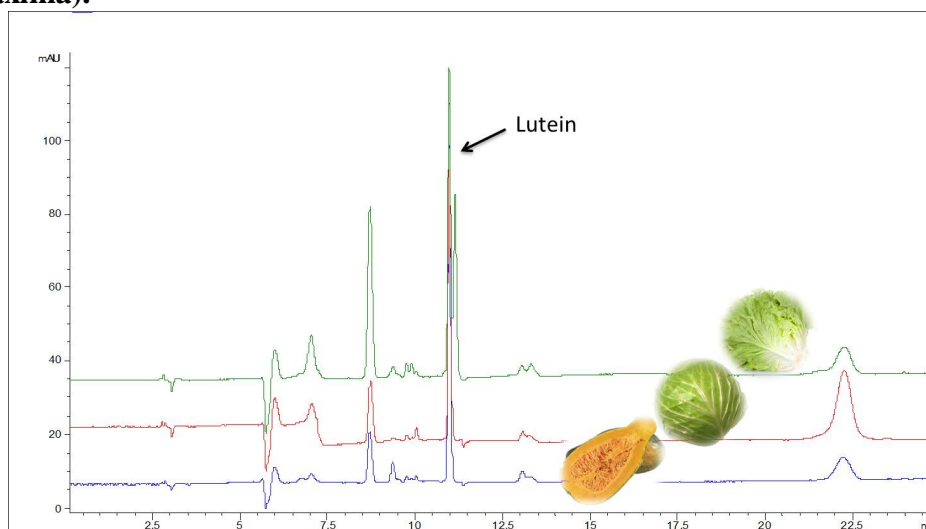
Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 17 y en los resultados de la Tabla 8, el gluten de maíz es el que mayor contenido de zeaxantina tiene, seguido del maíz entero, mientras que las otras materias primas contienen cantidades no cuantificables de esta, por ello es importante tener en cuenta que el maíz constituye la fuente principal de carotenos cuando se usa como materia prima para la elaboración de concentrados de gallinas ponedoras.

Sin embargo, al comparar en composición de carotenos el maíz con los residuos que se proponen para la pmezcla, se puede apreciar que contienen compuestos diferentes, lo cual permitirá rastrear químicamente de dónde proviene la pigmentación conferida a la piel de las aves o a sus huevos.

Extracción por fluidos supercríticos (FSC)

En la Figura 18 se puede ver el perfil químico de residuos vegetales analizados. La presencia de luteína se puede ver en la lechuga, el repollo y la auyama. Otros estudios han reportado que los vegetales provenientes de la familia *Brassicaceae* como el repollo son una fuente importante de carotenoides, especialmente luteína (Singh, Upadhyay, Prasad, Bahadur, & Rai, 2007). La lechuga y otros vegetales de hojas verdes que se consumen crudos pueden brindar un alto contenido de carotenoides a la dieta, especialmente luteína y zeaxantina (Perry, Rasmussen, & J. Johnson, 2009). Mientras que la auyama contiene diferentes carotenoides dependiendo de la variedad (Murkovic, Mülledera, & Neunteuflb, 2002)

Figura 18. Perfil HPLC de carotenoides en residuos en la cual se observa la presencia de luteína en lechuga (*Lactuca sativa*), repollo (*Brassica oleracea*) y auyama (*Cucurbita maxima*).

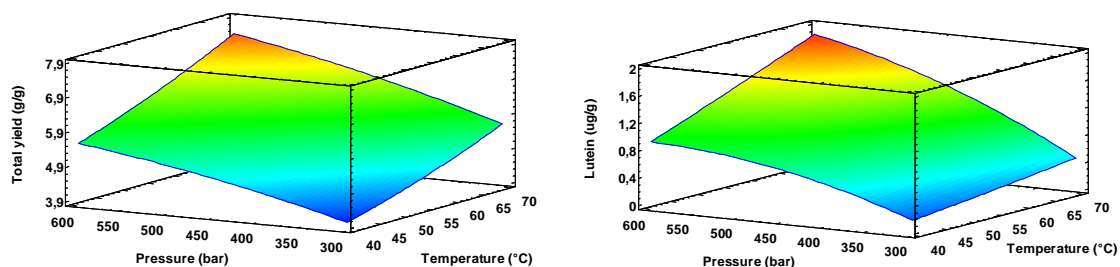


En resume el rendimiento total y el rendimiento de la extracción de la luteína procedente del repollo, lechuga y auyama bajo condiciones de extracción por fluidos supercríticos. El rendimiento de la extracción total aumentó con la temperatura y la presión. El mayor rendimiento total se obtuvo a una presión de 600 bares y a una temperatura de 70 °C, el menor

rendimiento total fue a 300 bares y 40 °C. El mayor rendimiento de luteína (microgramos de luteína por gramo de material crudo) se obtuvo a 55 °C y 600 bares ver tabla 1

Mediante la metodología de superficie de respuesta, el diseño estadístico y el procedimiento para el análisis se pudo obtener información sobre la importancia y la significancia estadística de los efectos de la temperatura, la presión, el rendimiento total el rendimiento de luteína, los cuales se muestran en la Figura 19.

Figura 19. Curvas 3D de superficie de respuesta donde se muestran los efectos de la temperatura y la presión a) rendimiento total, b) rendimiento de luteína



En la siguiente ecuación se expresa la relación empírica entre el rendimiento total el test de variables en términos de las variables independientes, temperatura y presión.

$$\text{Rendimiento Total} = 1,04762 - 0,00884921 * \text{Temperatura} + 0,00896587 * \text{Presión} + 0,00045873 * \text{Temperatura}^2 + 0,0000366667 * \text{Temperatura} * \text{Presión} - 0,00000585714 * \text{Presión}^2$$

Un segundo modelo polinomial se ajustó a los datos experimentales para el rendimiento total. El R^2 del modelo fue 0.9807, el cual indica que el modelo adecuadamente representó la relación observada entre los parámetros de extracción selectiva, con un 98.7% de la variación en los datos.

Para el rendimiento de la luteína la siguiente ecuación expresa la relación empírica entre el rendimiento total y el test de variables en términos de las variables independientes, temperatura y presión.

$$\text{Luteína} = -1,28341 - 0,017119*\text{Temperatura} + 0,00609683*\text{Presión} + 0,0000460317*\text{Temperatura}^2 + 0,0000733333*\text{Temperatura}*\text{Presión} - 0,00000720635*\text{Presión}^2$$

También un segundo modelo de orden polinomial se ajustó a los datos experimentales para la luteína extraída. El R^2 del modelo fue 0,97721, el cual indica que el modelo adecuadamente representó la relación observada entre los parámetros de extracción selectiva, con un 97,21% de la variación en los datos.

La significancia de cada coeficiente determinado por el valor F y el valor P mostró que la temperatura, la presión y el término cuadrático para la presión son significativos para el rendimiento total, mientras que para el rendimiento de luteína la interacción lineal entre la temperatura y la presión fueron también significativas.

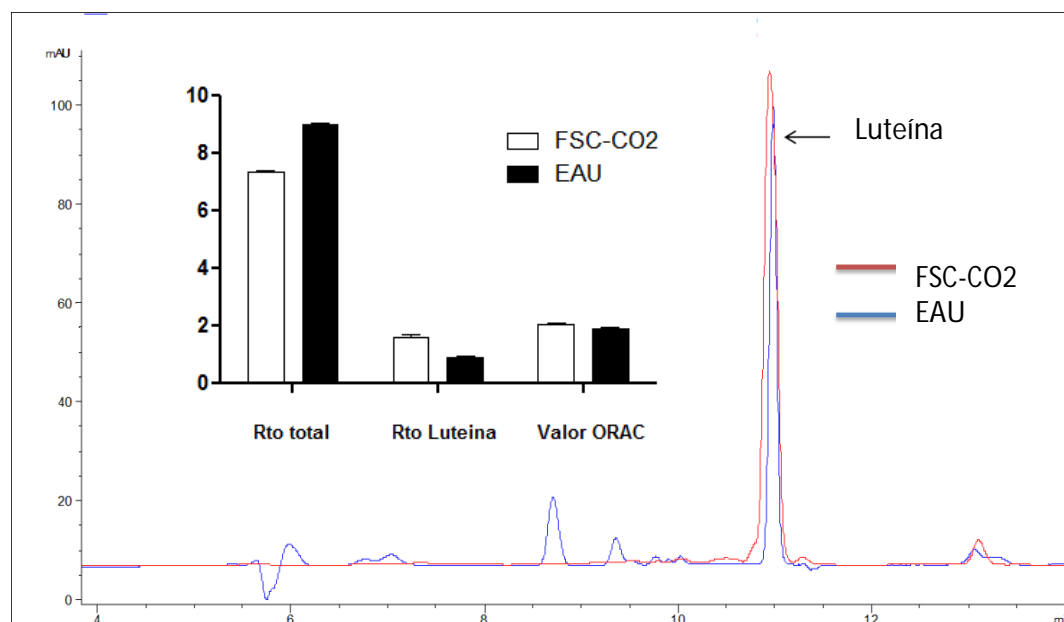
La recuperación y selectividad de la extracción por fluidos supercríticos depende en gran medida del equilibrio entre la densidad del fluido y la presión de vapor del soluto. Generalmente un incremento en la presión podría incrementar la densidad del fluido incrementando consecuentemente la solubilidad. Sin embargo un incremento en la temperatura también podría incrementar la presión de vapor del soluto. Comúnmente temperaturas por debajo de 40 °C se recomiendan para la extracción de carotenoides, debido a la degradación térmica que a menudo ocurre, mientras que el uso de temperaturas por encima de 70 °C se ha encontrado que incrementan el rendimiento de extracción de carotenoides en un estudio previo por FSC-

CO₂(Sovová, Stateva, & Galushko, 2001). Por lo tanto los valores actuales de temperatura y presión escogidos deben tomarse en consideración para la degradación térmica de carotenoides y el balance de la densidad y la presión de vapor por la solubilidad del soluto.

Los rangos de temperatura y presión que se encontraron estuvieron entre 40 y 70°C y 300 a 600 bares respectivamente. Aquí puede verse que la presión es el término más significativo con un efecto positivo ($P < 0,0001$) mientras que la temperatura fue importante pero a 600 bares, el efecto del incremento de la temperatura en la cantidad de carotenoides extraídos no fue significativo. Los resultados obtenidos están en concordancia con otros aún reportados para carotenoides y luteína usando extracción por fluidos supercríticos (Mattea, Martín, & Cocero, 2009). De hecho Shi *et al.*, encontraron un alto rendimiento en la extracción de luteína de calabazas a altas temperaturas (70°C), sin embargo, únicamente evaluaron presiones por encima de 350 bares (Shi *et al.*, 2010).

Bajo óptimas condiciones para ambos FSC-CO₂ (600 bares y 70°C) y UAE fue realizado un experimento de extracción para comparar las técnicas y confirmar el desarrollo del modelo predictivo. Los extractos obtenidos fueron caracterizados de acuerdo al rendimiento total, al rendimiento de luteína y la actividad antioxidante, que se observan en la Figura 20.

Figura. 20. Comparación de los extractos obtenidos por FSC-CO₂ y EAU. La figura principal muestra un cromatograma típico de los extractos. La figura inserta muestra la comparación entre las técnicas de acuerdo a al rendimiento total (gramos extraídos/gramos de material), rendimiento de luteína (µg extraídos/g material) y valor ORAC (mmol TE/100 g extracto)



En general la extracción por fluidos supercríticos puede producir extractos más puros que los obtenidos por extracción asistida por ultrasonido debido a la selectividad de la extracción como puede verse por el perfil cromatográfico y el rendimiento de la luteína. De otro lado la EAU asegura un rendimiento más alto, probablemente como resultado de la extracción simultánea de otros componentes, los cuales también tienen actividad antioxidante, ya que el valor de ORAC se mantuvo aunque se extrajo menos luteína con EAU. Los resultados presentados aquí de actividad antioxidante de los extractos son similares a los reportados en la literatura por ejemplo Hayes *et al* encontraron valores de ORAC de 3,715 mmol TE/100 g de luteína pura, los cuales no están lejos de los encontrados en el presente estudio ($2,08 \pm 0,06$) en los extractos obtenidos a partir de los residuos vegetales (Hayes, Allen, Brunton, O'Grady, & Kerry, 2011)

Conclusiones

Los residuos escogidos para formular la premezcla para la elaboración de concentrados para gallinas ponedoras fueron en orden pimentón, zanahoria, tomate de aliño, repollo y lechuga, por presentar los mayores contenidos en carotenoides totales y porque la mayoría de ellos presentan volúmenes altos de generación en la Central Mayorista de Antioquia.

Los residuos con mayor contenido de fenoles totales fueron en su orden Naranja, pimentón, maracuyá, papaya y repollo, diferente al orden encontrado para carotenos totales, coincidiendo solo el pimentón y el repollo en estos cinco primeros.

El repollo, la zanahoria, la papaya presentaron valores de fenoles totales que estuvieron muy por debajo de los reportados por la literatura, mientras que los de la auyama, el tomate de aliño y el tomate de árbol estuvieron fueron menores pero más cercanos. Los residuos con mayores valores de ORAC fueron en su orden naranja, zanahoria, pimentón, tomate de aliño y tomate de árbol.

La composición de carotenos en los residuos seleccionados para la premezcla muestra la presencia de luteína, licopeno y β -caroteno. No se encontró presencia de cantaxantina y zeaxantina en los residuos seleccionados, lo cual es importante debido a que esta última xantofila es la responsable de la pigmentación en las demás materias primas utilizadas en el alimento balanceado para animales, de esta manera, es posible asegurar que la posterior presencia de licopeno, β -caroteno y luteína en huevos se debe a la transferencia de estos componentes exclusivamente de la premezcla.

De acuerdo al contenido de carotenos, fenoles totales y capacidad antioxidante, el pimentón es el residuo que presenta mejores valores en estos tres parámetros en conjunto, por lo tanto su uso en la premezcla hará que esta tenga gran capacidad para pigmentar los huevos de las

gallinas y conferirle además propiedades funcionales, dichos componentes además se incrementaron con la deshidratación del vegetal.

No se presentaron pérdidas significativas de carotenos por el secado, en cuanto al contenido de fenoles se ve favorecida por el tratamiento térmico, al igual que ocurre con la capacidad antioxidante para el pimiento, el repollo y el tomate de aliño.

El ensayo de extracción por FSC-CO₂, demostró que esta técnica puede ser utilizada para darle valor agregado al esquema de recuperación de extractos ricos en antioxidantes de residuos agroindustriales. La explotación de estos productos podría incrementar el valor de la agroindustria en países tropicales, los cuales comúnmente manejan con gran dificultad la disposición de sus altos volúmenes de residuos. Además, el uso de un solvente limpio como el CO₂ demuestra el valor potencial de la obtención de extractos para diferentes mercados (alimentos, farmacia y cosméticos), así como un compromiso con el medio ambiente.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS, Colombia (Proyecto No 127552128647) y de la Vicerrectoría de Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista, a través del Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos - GRIAL.

Referencias

- ADA. (2003). The position of The American Dietetic Association on Functional Food.
- Almada, M., Cáceres, M. S., Machaín-Singer, M., & Pulfer, J. C. (2005). *Guía de Uso de secaderos solares para frutas, legumbres, hortalizas, plantas medicinales y carnes*. Asunción, Paraguay: UNESCO.
- Anand, J. C., & Maini, S. B. (1997). Utilization of fruit and vegetable wastes. *Indian Food Packer*, 51(2), 45–63.
- AOAC. (1974). Carotenes and Xanthophylls in Dried Plant Materials and Mixed Feeds: Spectrophotometric Method. In AOAC (Ed.), *AOAC, AOAC Official Method 970.64* (2nd ed.). USA.
- Arts, I. C. W., & Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 317–325.
- Askar, A. (1998). Importance and characteristics of tropical fruits. *Fruit Processing*, 8, 273–276.
- Avelino, A., Avelino, H. T., Roseiro, J. C., & Collaco, M. T. A. (1997). Saccharification of tomato pomace for the production of biomass. *Bioresource Technology*, 61(2), 159–162.
- Aviram, M., & Fuhrman, B. (2002). Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Sciences, Annals of the New York Academy of*, 957, 146–161.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (4th ed., p. 736). Pearson Educación.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (2012). *Química de los alimentos* (p. 1087). Zaragoza: Editorial Acribia.
- Bors, W., & Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free radical research communications*, 2(4-6), 289–294.
- Braddock, R. J. (1995). By-products of citrus fruits. *Food Technology*, 49, 74–77.
- Bravo, S., J., García-Alonso, & Al., E. (2003). The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, β -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. *Food Research International*, 28(6), 328–333.
- Brennan, J. G., Butters, J. R., & Cowell, N. D. (1998). Introducción a la Deshidratación. *Las Operaciones de la Ingeniería de Alimentos* (pp. 381–388). Zaragoza: Acribia.
- Cameron, E., & Pauling, L. (1978). Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9), 4538–4542.
- Coutts, J. A., & Wilson, G. C. (2007). *Optimum Egg Quality: A Practical Approach. Revised Versio* (5M Publish.). UK.
- Cuevas, B., Díaz, G., Molina, A., & Retamal, C. (2003). *Pigmentos Utilizados en Raciones de Gallinas Ponedoras*. Cuevas, Benjamín Díaz, Gonzalo Molina, Andrea Retamal, Constanza (p. 5). Chile.
- Desobry, S. A., Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62, 1158–1162.
- DSM, N. P. (2005). Egg Yolk Pigmentation with CAROPHYLL® Red 10% and CAROPHYLL® Yellow 10% Switzerland.

- Fadlinizal, M., Ghafar, A., Prasad, K. N., Weng, K. K., & Ismail, A. (2010). Flavonoid , hesperidine , total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*, 9(3), 326–330.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Teissedre, P. L. (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4), 890–894.
- Gama, J. J. T., & Sylos, C. M. (2005). Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. *Food Research International*, 38(8-9), 899–903.
- Gamboa-Santos, J., Soria, A. C., Villamiel, M., & Montilla, A. (2013). Quality parameters in convective dehydrated carrots blanched by ultrasound and conventional treatment. *Food chemistry*, 141(1), 616–24. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.028
- García, M. I., Lozano, M., De Espinosa, V. M., Ayuso, M. C., Bernalte, M. J., & Vidal-Aragón, M. Carmen , Pérez, M. M. (2007). Agronomic characteristics and carotenoid content of five Bola-type paprika red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 113(3), 202–207.
- Gilbert, L. (1997). The consumer market for functional foods. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Food*, 1, 5–21.
- Gonçalves, E. M., Pinheiroa, J., Abreu, M., Brandão, T. R. S., & Silvab, C. L. M. (2010). Carrot (*Daucus carota* L.) peroxidase inactivation, phenolic content and physical changes kinetics due to blanching. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 574–581.
- Griffiths, H. R., & Lunec, J. (2001). Ascorbic acid in the 21 st century - more than a simple antioxidant. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 10(4), 173 – 182.
- Grohmann, K., Manthey, J. A., & Cameron, R. G. (2000). Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydrate Research*, 328(2), 141–146.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, 96(2-3), 67–202.
- Hayes, J. E., Allen, P., Brunton, N., O’Grady, M. N., & Kerry, J. P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 948–955.
- Haytowitz, D. B., & Bhagwat, S. (2010). *USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 Prepared by.* (U. S. D. of A. – USDA, Ed.)*Beltsville Human Nutrition Research Center* (pp. 10 – 48). Beltsville, Maryland 20705.
- Henn, T., & Kunz, B. (1996). Pflanzliche Reststoffe zur Herstellung von Functional Drinks. *Obst, Flüssiges*, 63, 715–719.
- Henry, B. S. (1996). Natural food colours. In G. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.), *Natural food colorants* (pp. 40–79). London: Blackie Academic & Professional.
- Hernández, G., & Alvarez, M. J. M. (2000). Efecto del secado y del ácido cítrico sobre la degradación de los carotenoides de tamarillo (*Cyphomandra betacea* Sendt). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2(5), 228–233.
- Hernández Gimeno, J. M. (2003). Carotenoides pigmentantes estables: Un nuevo concepto para optimizar los costes en la formulación de piensos de gallinas. *Selecciones Avícolas*, XLV(2), 88–96.

- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136–148.
- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y., & Dosako, S. i. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica*). *Food Chemistry*, 71(1), 61–66.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. J. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954 – 3962.
- Kawai, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., Ito, C., et al. (2000). Quantitative Study of Flavonoids in Leaves of Citrus Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3865–3871.
- Khanam, U. K. S., Oba, S., Yanase, E., & Murakami, Y. (2012). Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 979–987. doi:10.1016/j.jff.2012.07.006
- Krinsky, N. I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(6), 617–635.
- Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., & Pihlaja, K. (2000). Phenolics and Betacyanins in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5338–5342.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2006). Capacidad antioxidante (ORACFL) de pulpas de frutos congelados. *Revista Nutrire, Sociedad Brasileira de Alimentación y Nutrición*, 31(1), 53–64.
- Kusznierewicz, B., Bartoszek, A., Wolska, L., Drzewiecki, J., Gorinstein, S., & Namieśnik, J. (2008). Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 1–9. doi:10.1016/j.lwt.2007.02.007
- Limon-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation. Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 81–87.
- Londoño-Londoño, J., Lima, V. R. De, Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119(1), 81–87. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.075
- Lotito, S. B., & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727–1746.
- Lyseng-Williamson, K. A., & Perry, C. M. (2003). Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs*, 63(1), 71–100.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230–242.

- Mattea, F., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2009). Carotenoid processing with supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 93(3), 255–265.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Grapes. In A. Arbor (Ed.), *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains* (pp. 149–191). Tokio: Boca Raton, CRC Press.
- Mukhopadhyay, M. (2000). *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. (C. P. Inc, Ed.) (p. 360).
- Murkovic, M., Müllender, U., & Neunteufl, H. (2002). Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 633–638.
- Niizu, P. Y., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2005). New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(8), 739–749. doi:10.1016/j.jfca.2004.09.001
- O'Connell, O. F., Ryan, L., & O'Brien, N. M. (2007). Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, 27(7), 258–264.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 241–248. doi:10.1016/j.jfca.2007.10.002
- Periago Castón, M. J. (2011). Higiene, inspección y control de huevos de consumo. *Higiene, Inspección y Control Alimentario*.
- Perry, A., Rasmussen, H., & J. Johnson, E. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(1), 9–15.
- Puravankara, D., Boghra, V., & Sharma, R. S. (2000). Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 522–526.
- Rababah, T. M., Ereifej, K. I., & Howard, L. (2005). Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4444–7. doi:10.1021/jf0502810
- Roberfroid, M., & Calderon, P. B. (1994). *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems*.: New York: Marcel Dekker Inc.
- Rodriguez-amaya, D. B. (2001). *Aguide to carotenoid analysis in foods* (p. 71). Washington, D.C.
- Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Godoy, H. T., & Amaya-Farfan, J. (2008). Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(6), 445–463.
- Rodríguez-B. de Quirós, A., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 97–111.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 97–111.
- Roldan, J. ., Durán naranjo, L. ., Martínez Díaz, H., & Durán Ramírez, F. (2004). *Manual de Explotación en Aves de Corral*. (G. Latino, Ed.) (p. 86). Colombia.
- Rowghani, E., Maddahian, A., & Arab Abousadi, M. (2006). Effects of Addition of Marigold Flower, Safflower Petals, Red Pepper on Egg-yolk Color and Egg Production in Laying Hens. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(7), 1333–1337.

- Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. A. (2010). Maximizing phenolics, antioxidants and sensory acceptance of UV and ultrasound-treated peanuts. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1058–1066.
- Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from Cactus pear (*Opuntia ficus - indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622.
- Serrano Martinez, A. (2008). *Efectos de diferentes factores: Fertilización, salinidad y procesado, sobre parámetros objetivos de calidad en pimiento*. Universidad Católica San Antonio.
- Sharma, R. S., Mulvaney, S. J., & Rizvi, S. S. H. (2003). Deshidratación Osmótica de Alimentos. *Ingeniería de los Alimentos: Operaciones Unitarias y Prácticas de Laboratorio* (pp. 225–230). Mexico: Limusa Wiley.
- Sharma, S. K., & Maguer, M. L. (1996). Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Italian Journal of Food Science*, 2, 107–113.
- Shi, J., Le Maguer, M., & Mike, B. (2002). Lycopene from Tomatoes. In L. Boca raton (Ed.), *J. Shi, G. Mazza, & M. Le Maguer, Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects* (2nd ed., pp. 134–167). New York, Washington, D.C: CRS Press.
- Shi, John, Yi, C., Ye, X., Xue, S., Jiang, Y., Ma, Y., & Liu, D. (2010). Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. *LWT - Food Science and Technology*, 43(1), 39–44.
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., & Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 106–112. doi:10.1016/j.jfca.2006.08.002
- Singh, R. P., & Heldman, D. R. (2009). Deshidratación. *Introducción a la Ingeniería de Alimentos* (pp. 467–477). Zaragoza: Acribia.
- Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2002). Flavonoides from Berries and Grapes. In L. Boca Raton (Ed.), *J. Shi, G. Mazza, & M. Le Maguer, Functionals Foods: Biochemical and Processing Aspects* (2nd ed., pp. 71–133). New York, Washington, D.C: CRC Press.
- Sovová, H., Stateva, R. P., & Galushko, A. A. (2001). Solubility of b-carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers. *The Journal of Supercritical Fluids*, 21(3), 195–203.
- Stoll, T., Schieber, A., & Carle, R. (2001). Carrot pomace an underestimated by-product?. In G. R. W. Pfannhauser, Fenwick, & S. Khokhar (Eds.), *Biologically-active phytochemicals in food: analysis, metabolism, bioavailability and function* (pp. 525–527). Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Tang, Y. C., & Chen, B. H. (2000). Pigment change of freeze-dried carotenoid powder during storage. *Food Chemistry*, 69(1), 11–17.
- Tiwari, A. (2001). Imbalance in antioxidant defence human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current Science*, 89(9), 1179–1187.
- Torres Fasantes, N. R. (2006). *Determinación del potencial nutritivo y nutracéutico de cuatro cultivares de Tomate de árbol (Solanum betaceum Cav)*. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 211–219.
- Trela, B. C., & Waterhouse, A. L. (1996). Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1253–1257.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Velástegui, J., & Cherrez, R. (1992). *Manual del cultivo del tomate de árbol Ambato*. Ecuador, Sena.
- Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., & Zubik, L. (1998). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3630–3634.
- Wadhwa, M., Bakshi, M. P. S., & Makkar, H. P. S. (2013). *Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products*. (H. Makkar, Ed.) (p. 68). Roma.
- Wangcharoen, W., & Morasuk, W. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of some Thai culinary plants. *Journal of Science and Technology, Maejo International*, 1(2), 100–106.
- Willett, W. C., & MacMahon, B. (1984). Diet and Cancer An Overview. *New England Journal of Medicine*, 310(11), 697–703.
- Zhang, J., & Han, B. (2009). Supercritical CO₂-continuous microemulsions and compressed CO₂-expanded reverse microemulsions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 531–536.
- Žnidarčič, R., Banb, D., & Šircelj, H. (2011). Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries. *Food Chemistry*, 129(3), 1164–1168.

Apéndice

Apéndice A. Artículo presentado en el Tercer Congreso Iberoamericano de Fluidos Supercríticos

Cartagena agosto 1 al 13 de 2013, PROSCIBA, (Proceedings del evento, ISBN 978-958-99607-2-1) y a ser publicado en una edición especial del Journal of Supercritical Fluids

RECOVERY OF CAROTENOIDS FROM AGROINDUSTRIAL BY-PRODUCTS USING CLEAN EXTRACTION TECHNIQUES: SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION AND ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION

Luz María Alzate, Duban González, Julian Londoño-Londoño*

Faculty of Engineering, Food Engineering Research Group

Corporación Universitaria Lasallista

Caldas-Antioquia, Colombia

E-mail: jalondo@gmail.com

Abstract. One of the main reasons for unsuccessful recovery of carotenoids from agroindustrial by-products is the absence of effective extraction procedures. In this work, lutein was obtained from a mixture of agroindustrial wastes produced in tropical conditions (lettuce, cabbage, auyama) using an optimized supercritical fluid extraction method (SFE-CO₂). This study analyzed the effect of a range of temperatures (40-70 °C) and pressures (300-600 bar) on lutein yield using response surface methodology (RSM). With mathematical model, optimal conditions were predicted to 70°C and 600 bar to obtain maximum lutein yield. Validation of the model was achieved, obtaining a SFE-CO₂ extract with total yield of 7,34±0,11 g/g material, lutein yield of 1,6±0,15 µg/g material and ORAC value of 2,08±0,06 mmol TE/100 g material, which had lower yield but higher selectivity compared to ultrasound assisted extraction (UAE).

Keywords : Carotenoids, lutein, agroindustrial wastes, supercritical fluid extraction, ultrasound assisted extraction

Introduction

Due to increasing of food production, disposal of by-products represents a growing problem since the plant material is usually prone to microbial spoilage, thus limiting further exploitation. On the other hand, costs of drying, storage and shipment of by-products are economically limiting factors for use in applications with low added value. The problem of disposing by-products is further aggravated by legal restrictions. Thus, efficient, inexpensive and environmentally sound utilization of these materials is becoming more important especially since profitability and jobs may suffer [1].

By-products of plant food processing represent a major disposal problem for the industry concerned, but they are also promising sources of compounds which may be used because of their favorable technological or nutritional properties. Furthermore, consumers are increasingly aware of diet related health problems, therefore demanding natural ingredients which are expected to be safe and health-promoting [2]. For instance, the use of artificial dyes is a common practice in the modern food industry, but there is growing concern about their actual or potential effect on human health. This concern has led to an increasing interest and utilization of natural products as alternative food colorants [3].

Carotenoids are one of the major groups of natural pigments that find widespread utilization in the food industry. The addition of carotenoids to food serves two purposes: 1) impartation of color and 2) nutritional value, since its role as bioactive compounds. Specially, Lutein is one of the most important carotenoids and is widely found in foods and also in human serum. Lutein, together with zeaxanthin, imparts color to the macula lutea, the spot in the human retina that allows the appreciation of fine details, and it is believed to have an important role as an antioxidant. Moreover, during the past few years, lutein has attracted increasing attention with regard to its application to human health. In a number of studies, lutein has been found to play a role in the prevention of age-related macular degeneration (AMD), cataracts, amelioration of the first stages of atherosclerosis and even some types of cancer [4].

However, key steps in the production of lutein for food industry are related to: 1) the exploration of “unlimited” sources with low cost, 2) the development of extraction techniques, which can minimize alteration of the carotenoids during the extraction process and 3) the use of GRAS (Generally Recognized As Safe) materials for extraction in order to guarantee food application.

Thus, the present study has been conducted to evaluate the feasibility of lutein extraction from agroindustrial wastes produced under tropical conditions using Supercritical Fluid Extraction and Ultrasound Assisted Extraction.

Materials and Methods

Reagents and chemicals

Carbon dioxide, 99.9% pure, was acquired from Indura- Cryogas (Medellín, Colombia). Acetonitrile and ethanol high-performance liquid chromatography (HPLC) grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Trolox, fluorescein, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide), dihydrochloride (AAPH) and the other reagents were all of analytical grade from Sigma (St. Louis, MO, USA). Reference standard of lutein was purchased from ChromaDex Inc. (Irvine, CA, USA).

Raw material

Agroindustrial wastes were collected in Public Market of the city (Central Mayorista de Antioquia, Medellín, Colombia). A preliminary study showed the by-products with high production throughout the year. It were selected the largest volume wastes and became a screening to assess the presence of lutein. The residues were dried directly in a freeze-dryer (Eyela, Tokyo, Japan) for 24 h and then ground with a blade mill (Ika works Inc, Wilmington, NC, USA), sieved and collected in a 24-80 mesh.

Extraction

Supercritical fluid extraction with carbon dioxide (SFE-CO₂) was performed using a SFT-150 (Supercritical Fluid Technologies, Newark, DE, USA). Approximately 20 g of powder from the lyophilized material was placed in the extractor vessel (capacity 100 ml) fitted with a plug of polypropylene wool at the top and bottom of the vessel to provide a continuous flow of CO₂. Each experiment had 10 min of soaking time (static extraction) to promote greater contact between the particles and the CO₂, followed by 120 min of dynamic extraction at flow rate of 1.8 g/min. This study analyzed the effect of a range of temperatures (40-70 °C) and pressures (300-600 bar) on lutein yield. The supercritical CO₂ flowing through the fixed bed in the extraction vessel was expanded into a collection vial tube, where the extracted sample and the CO₂ solvent were easily separated. To minimize the decomposition and oxidation of the extracted compounds, all samples were collected in brown bottles to prevent UV-activated degradation. Total yield was calculated as the ratio of the total mass of extract to the initial mass of raw material (dry basis), while lutein yield corresponds to µg of solute extracted per gram of raw material (dry basis).

Ultrasound assisted extraction (UAE) was performed using a multi-frequency ultrasonic bath (Scientz, Ningbo City, China). Conditions for optimal extraction were adjusted previously (Data not shown). Extraction was conducted at frequency 25 kHz, potency 300 W, temperature 40°C, time 60 min, ratio solute/solvent 1 % (w/v).

HPLC analysis of lutein

Separation was performed on an Agilent 1200 HPLC apparatus (Agilent Techniques, Santa Clara, CA) equipped with a reverse phase YMC J'Sphere ODS column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm particle size) (Waters Co., Milford, MA, USA) with acetone (A) and water (B) as eluents. 75% A was maintained during first 30 min; a linear gradient was utilized for going from 75% A until 90% A in 5 min, and was then held isocratically for 15 min. The solvent flow was set at 1.0 mL/min, with detection performed at 452 nm. Peak identification was achieved by comparing their retention time to that of injected standards and by taking their absorption spectra during elution from the column. Lutein was quantitated by comparing with standard of known concentration.

Antioxidant activity

Antioxidant activity was determined using the ORAC assay proposed by Ou [5] and slightly modified by us [6]. Extracts obtained from SFE-CO₂ and ultrasound extraction were diluted in ethanol and then adjusted at final dilution with 10 mM phosphate buffer at pH 7.4. Trolox (0–200 μM) was used as the standard. A mixture of the fluorescent probe fluorescein (150 μL of a 1 μM solution) and extract (25 μL) was preincubated for 30 min at 37 °C. Then, 25 μL of a 250 mM AAPH solution in phosphate buffer was added. Fluorescence intensity was measured every 2 min during 120 min with excitation and emission wavelengths set at 485 and 520 nm, respectively. The results were reported as micromoles of Trolox equivalents per gram of extract (mmol TE/100 g of extract).

Experimental design and statistical analysis

The influence of pressure and temperature in the recovery of lutein was measured using a response surface method (RSM). The experimental design was proposed to take into account quadratic responses and interactions. For this purpose a central composite design was proposed according to experimental plan shown in Table 1. A full second-order polynomial model of the design was used to evaluate the total yield and lutein yield (response variables, Y) as a function of independent variables (x) and their interactions (Eq. (1)).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_j x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{jj} x_j^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Where Y is the response, β_0 is the constant coefficient, β_i β_j are the linear coefficients, β_{ii} , β_{jj} are the quadratic coefficients, β_{ij} is the linear-by-linear interaction coefficient, and x_i , x_j are the coded values of independent variables. Experimental design, data analysis, and quadratic model building were conducted using the software Statgraphics Centurion (Stat Points Technology Inc., Minneapolis, MN, USA). Two replicates at the center of the design in each block were used to allow for the estimation of a pure error sum of squares. Differences between variables were tested for significance using the one-way ANOVA analysis procedure using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Significances were accepted at $P < 0.05$.

Table 1. Central composite experimental design for SC-CO₂ extraction of lutein from agroindustrial wastes and results obtained

Run	Block	Factor values		Response	
		Temperature (°C)	Pressure (bar)	Total yield (g/g)	Lutein (μg/g)
1	1	40	300	3,90	0,18
2	1	70	300	5,60	0,48
3	1	55	600	6,35	1,30
4	1	55	300	4,91	0,26
5	1	55	450	5,80	1,08
6	1	70	450	6,70	1,30
7	1	55	450	5,60	1,12
8	1	40	600	5,69	1,00
9	1	70	600	7,55	1,90
10	1	40	450	5,00	0,60
11	2	40	300	4,00	0,20
12	2	70	300	5,50	0,50
13	2	55	600	6,20	1,25
14	2	55	300	4,80	0,25
15	2	55	450	5,75	1,00
16	2	70	450	6,60	1,20
17	2	55	450	5,70	1,20
18	2	40	600	5,60	0,98
19	2	70	600	7,60	2,00
20	2	40	450	4,90	0,65

Results and Discussion

In the Figure 1 it can be seen the chemical profile of several agroindustrial wastes produced under tropical conditions. Presence of lutein was revealed in lettuce, cabbage and auyama. Other studies have reported that vegetables belonging to the *Brassicaceae* family, like cabbage, are an important dietary source of carotenoids, especially lutein [7]. Lettuce and other green leaves that are eaten raw can bring high content in dietary carotenoids, especially lutein and zeaxanthin [8]. Meanwhile, auyama, is a kind of pumpkin that contains different carotenoids depending to variety [9].

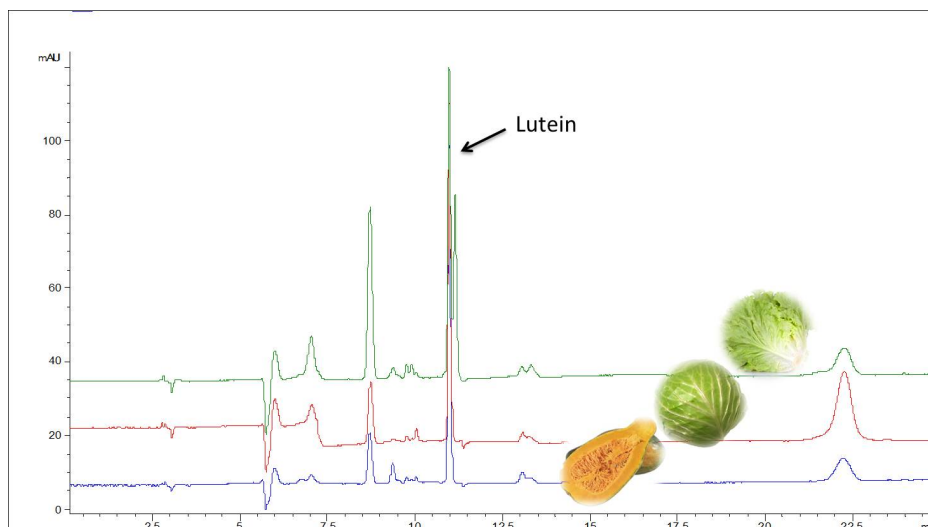


Figure 1. HPLC profile of carotenoids from agroindustrial wastes showing presence of lutein in lettuce (*Lactuca sativa* var. Batavia), cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) and auyama (*Cucurbita maxima*).

Table 1 summarizes the total yields and extraction yields of lutein in the mixture of selected agroindustrial wastes (cabbage, lettuce and auyama) under SFE-CO₂ extraction conditions. The total extraction yield increased with both temperature and pressure. The highest total yield was obtained from the highest pressure of 600 bar and a temperature of 70 °C; the lowest total yield, at 40 °C and 300 bar. The highest lutein yield (microgram lutein per gram of raw material) was obtained at 55°C and 600 bar.

In our study, the response surface methodology (RSM) statistical design and analysis procedure, which is able to provide information on the importance and the statistical significance of individual factors, was used to investigate the effects of temperature and pressure on both the total yield and lutein yield. Results are shown in Figure 2.

Eq. (2) expresses an empirical relationship between the total yield and the test variables in terms of the independent variables, temperature and pressure.

$$\text{Total yield} = 1,04762 - 0,00884921 * \text{Temperature} + 0,00896587 * \text{Pressure} + 0,00045873 * \text{Temperature}^2 + 0,0000366667 * \text{Temperature} * \text{Pressure} - 0,00000585714 * \text{Pressure}^2 \quad (2)$$

A second-order polynomial model was fitted to the experimental data for total yield. The statistics (R²) of the model was 0.9897, which indicates that the model adequately represented the observed relationships among the selected extraction parameters, accounting for 98,97% of the variation in the data.

For lutein yield, Eq. (3) expresses an empirical relationship between the total yield and the test variables in terms of the independent variables, temperature and pressure.

$$\text{Lutein} = -1,28341 - 0,017119 * \text{Temperature} + 0,00609683 * \text{Pressure} + 0,0000460317 * \text{Temperature}^2 + 0,0000733333 * \text{Temperature} * \text{Pressure} - 0,00000720635 * \text{Pressure}^2 \quad (3)$$

Also, a second-order polynomial model was fitted to the experimental data for the lutein extracted. The statistics (R²) of the model was 0.9721, which indicates that the model adequately represented the observed relationships among the selected extraction parameters, accounting for 97,21% of the variation in the data.

The significance of each coefficient determined by F-value and P-value showed that the temperature, pressure, and the quadratic term for pressure are significant model terms for total yield, while for lutein yield the linear interaction between temperature and pressure was also significant.

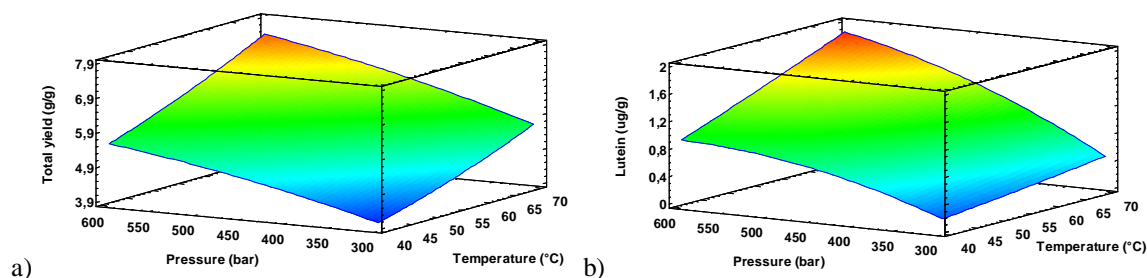


Figure 2. 3D response surface plots showing effects of temperature and pressure on a) total yield, b) lutein yield

Supercritical fluid extraction recovery and selectivity depend greatly on the equilibrium between fluid density and solute vapor pressure. Generally, an increase in pressure would increase the fluid density, consequently increasing the solubility. An increase in temperature would reduce the fluid density, which decreases the solubility. However, an increase in temperature would also increase the solute vapor pressure, which would increase the solubility. Commonly, temperatures under 40 °C are recommended for classical extraction of carotenoids due to the thermal degradation that often occurs, while the use of temperatures up to 70 °C has also been found to increase the yields of carotenoids in a previous study with SFE-CO₂ [10]. Therefore, the actual values of temperature and pressure finally chosen must take into consideration carotenoids' thermal degradation and the balance of density and vapor pressure for solute solubility.

The ranges of temperature and pressure in the present study were between 40 and 70 °C and 300–600 bar, respectively. Here, it was seen that pressure is the most significant term with a positive effect ($P < 0.0001$), while temperature was important, but at 600 bar, the effect of increasing temperature on the amount of carotenoids extracted was not significant. Results obtained in the present study are in accordance with others yet reported for carotenoids and lutein using SFE-CO₂ [11]. In fact, Shi et al, found a high yield in the extraction of lutein from pumpkin as were higher temperatures (70 °C), however, only evaluated pressures up to 350 bar [12].

Under optimal conditions for both SFE-CO₂ (600 bar and 70°C) and UAE (as described in 2.3), it was conducted an extraction experiment in order to compare the techniques and to confirm performance of the prediction model. Extracts obtained were characterized account total yield, lutein yield and antioxidant activity. Results are shown in Figure 3.

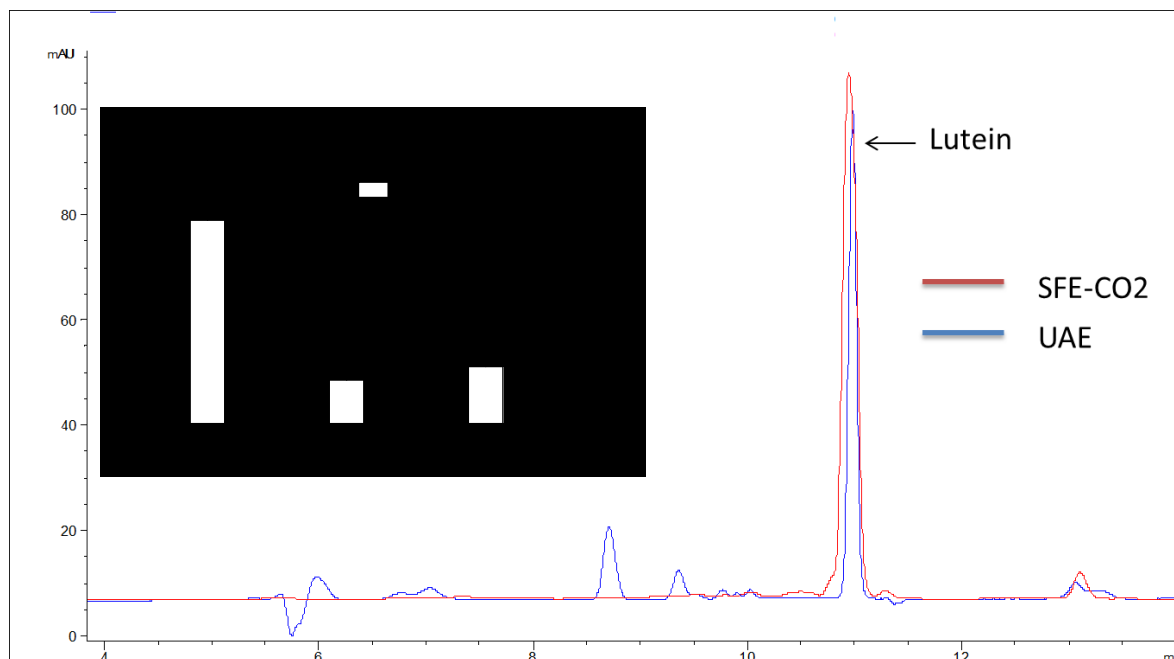


Figure 3. Comparison of extracts obtained by SFE-CO₂ and UAE. Main figure shows a typical chromatogram of extracts. Inset figure displays comparison between techniques according to total yield (g extracted/g material), lutein yield (μg extracted/ g material) and ORAC value (mmol TE/100 g extract).

In general, SFE-CO₂ can produce a purer extract compared to UAE due to selectivity of extraction as can be seen for chromatographic profile and lutein yield. On the other hand, UAE achieved higher total yield, probably as a result of simultaneous extraction of other components, which could also have antioxidant activity, since the ORAC value is maintained although less lutein extracted with UAE. The results presented here for the antioxidant activity of the extracts are related to those reported in the literature. Hayes et al [13] found a ORAC value of 3,715 mmol TE/100g of pure lutein, which is not far to the findings in the present study ($2,08 \pm 0,06$) with extracts from agroindustrial wastes.

Conclusions

In conclusion, this study demonstrates that SFE technique with CO₂ can be utilized for a value added scheme by recovering antioxidant-rich extracts from agroindustrial wastes. The exploitation of these by-products could increase the value for the agroindustry in tropical countries, which commonly manage with difficulties the disposal of its high-volume wastes. The added value of using a GRAS solvent as CO₂ demonstrates the potential value of the obtained extracts on different markets (food, pharma and cosmetics).

Acknowledgements

Authors gratefully thank to Central Mayorista de Antioquia for by-products supply. This work was supported by Administrative Department for Science, Technology and Innovation (COLCIENCIAS), Colombia (Project 127552128647).

References

- 1.
2. 1. Schieber, A., F.C. Stintzing, and R. Carle, By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 2001. 12(11): p. 401-413.
3. 2. Londoño-Londoño, J., et al., Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 2010. 119: p. 81-87.

4. 3. Wissgott, U. and K. Bortlik, Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology*, 1996. 7(9): p. 298-302.
5. 4. Alves-Rodrigues, A. and A. Shao, The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 2004. 150(1): p. 57-83.
6. 5. Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R.L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001. 49(10): p. 4619-4626.
7. 6. Álvarez, R., et al., Citrus Juice Extraction Systems: Effect on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Clementine Juice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60(3): p. 774-781.
8. 7. Singh, J., et al., Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007. 20(2): p. 106-112.
9. 8. Perry, A., H. Rasmussen, and E.J. Johnson, Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009. 22(1): p. 9-15.
10. 9. Murkovic, M., U. Malleder, and H. Neunteufl, Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2002. 15(6): p. 633-638.
11. 10. Sovová, H., R.P. Stateva, and A.A. Galushko, Solubility of b-carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2001. 21(3): p. 195-203.
12. 11. Mattea, F., Á. Martín, and M.J. Cocero, Carotenoid processing with supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 2009. 93(3): p. 255-265.
13. 12. Shi, J., et al., Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. *LWT - Food Science and Technology*, 2010. 43(1): p. 39-44.
14. 13. Hayes, J.E., et al., Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 2011. 126(3): p. 948-955.
- 15.