

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tratamiento enzimático del pergamino de café para ser usado como fuente de fibra en la elaboración de galletas.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado de Magister Scientiae en Ciencia de Alimentos

Eva Luz García Velásquez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica
2015

Dedicatoria

A mis padres, Luz Evangelina Velásquez y Mario Alberto García, ya que sin su ayuda no podría haber realizado este logro profesional.

A mis hermanos, Aída Elena y Mario Alberto, con mucho cariño.

A mi abuela Rosa, mi segunda madre y quien ha sido ejemplo de fortaleza para mí.

A mi abuelo Pedro (Q.E.P.D), quien fue un ejemplo de lucha constante y hubiera querido ver este logro.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a las siguientes personas:

A mis asesoras de tesis, Ph.D Ana Ruth Bonilla, M.Sc. Jaqueline Aiello y Ph.D Elba Cubero, quienes aportaron valiosamente en consejos, revisiones y observaciones a lo largo del proyecto.

A Giovanni González y Luis Morales, quienes me apoyaron y guiaron en las pruebas de laboratorio.

A Isabel Carpio Malavassi, quien me brindó sus consejos y el Laboratorio de Recursos Forestales para las tomas microscópicas de parte de la investigación.

A Manuel Molina, quien gracias a él tuve las puertas abiertas para realizar las pruebas de explosión con vapor.

A Fernando Camacho y Alonso Contreras, quienes me ayudaron en la elaboración de las galletas.

A Luis Prado y Henry, los cuales me apoyaron en las pruebas microbiológicas.

A los propietarios del beneficio Helsar en Zarceró, pues fueron los proveedores del pergamino de café usado en esta investigación.

A todos los panelistas que participaron en las distintas pruebas sensoriales.

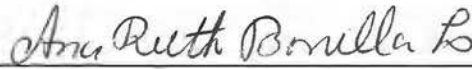
“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae en Ciencia de Alimentos”.

FIRMAS DE LA COMISION



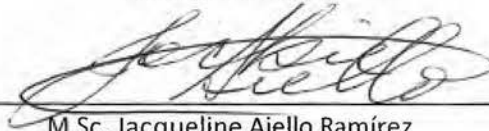
M.Sc. Gabriela Azofeifa Cordero

Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado



Dra. Ana Ruth Bonilla Leiva

Directora de Tesis



M.Sc. Jacqueline Aiello Ramírez

Asesora



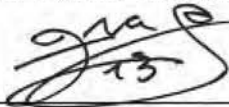
Dra. Elba Cubero Castillo

Asesora



M.Sc. María Lourdes Pineda

Directora del Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos



Eva Luz García Velásquez

Candidata

Tabla de contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Tabla de contenido.....	v
Resumen.....	ix
Lista de cuadros.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. Justificación.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. Marco Teórico.....	5
3.1 Alimentos funcionales.....	5
3.2 Fibra dietética.....	7
3.2.1 Generalidades.....	7
3.2.2 Efectos fisiológicos de la fibra dietética.....	9
3.2.3 Fibra dietética antioxidante.....	11
3.3 Subproductos obtenidos en el procesamiento del café.....	14
3.3.1 Pergamino de café.....	15
3.4 Efecto de la fibra sobre la textura de productos de panadería.....	17
3.4.1 Incorporación de fibra a fórmulas panaderas.....	17
3.4.2 Incorporación de fibra a formulaciones de galletas.....	19
3.5 Utilización de enzimas para mejorar las características sensoriales de los alimentos con alto contenido de fibra.....	22
3.5.1 Celulasas.....	24
3.5.2 Hemicelulasas.....	25
3.6 Tratamientos previos a la utilización de enzimas.....	26

3.6.1 Ultrasonido.....	27
4. Materiales y métodos generales.....	29
4.1 Determinación de lignina insoluble en ácido o ácido-insoluble	29
4.2 Determinación de la fracción soluble e insoluble	29
4.3 Determinación de la capacidad antioxidante	30
4.4 Determinación de polifenoles totales.....	30
4.5 Determinación de humedad, ceniza, grasa y proteína	31
4.6 Autoclavado	31
4.7 Ultrasonido.....	32
4.8 Tratamiento con preparado enzimático de celulasas del pergamino pretratado	32
4.9 Método enzimático colorimétrico para la determinación de glucosa.....	33
4.10 Diseño experimental	33
5. Efecto de diferentes pretratamientos físico-químicos e incubación enzimática sobre el endocarpio del grano del café	35
5.1 Resumen.....	35
5.2 Introducción.....	36
5.3 Materiales y métodos	37
5.3.1 Preparación de las muestras	37
5.3.2 Evaluación físico-química del pergamino sin tratamiento.....	38
5.3.2 Pretratamientos físico-químicos aplicados al pergamino de café molido	39
5.3.3 Tratamiento con preparado enzimático de celulasas del pergamino pretratado	41
5.3.4 Determinación de las fracciones solubles e insolubles del pergamino pre tratado y tratado enzimáticamente.....	41
5.3.5 Evaluación de la estructura microscópica del pergamino	42
5.3.6. Método enzimático colorimétrico para la determinación de glucosa	42
5.3.6 Diseño experimental	43
5.4 Resultados y discusión	43
5.4.1 Análisis físico químico del pergamino de café	43
5.4.2 Estructuras microscópicas del pergamino de café con pretratamientos	46
5.4.3 Estructura microscópica del pergamino pretratado e incubado con preparados celulíticos.....	52

5.4.4 Evaluación físico-química del pergamino de café sometido a varios tratamientos e incubado con un preparado celulítico	54
5.4.3 Conclusiones	57
5.5 Referencias.....	58
6 Evaluación del pergamino de café como fuente de fibra dietética en galletas.....	63
6.1 Resumen.....	63
6.2 Introducción	64
6.3 Materiales y métodos	66
6.3.1 Preparación del pergamino.....	66
6.3.2 Elaboración de las galletas con diferentes porcentajes de pergamino de café molido ..	67
6.3.3 Diseño experimental	68
6.3.4 Análisis sensorial	69
6.3.5 Determinación instrumental de la dureza	69
6.3.6 Análisis físico-químico a las galletas.....	70
6.3.7 Análisis microbiológico.....	71
6.3.8 Determinación de la actividad antioxidante	71
6.3.9 Determinación de polifenoles totales.....	72
6.4 Resultados y discusión	72
6.4.1 Prueba de aceptación de las galletas con varios porcentajes de pergamino molido	72
6.4.2 Determinación instrumental de la dureza	75
6.4.3 Comparación de la textura de las galletas con 2% de pergamino de café sin tratar y pergamino ultrasonicado.....	76
6.4.4 Análisis químico de la galleta con 2% de pergamino de café	77
6.4.5 Análisis microbiológico de la galleta con 2% de pergamino de café	81
6.4.6 Conclusiones	81
6.5 Referencias.....	82
7 Discusión General.....	88
8 Conclusiones y recomendaciones	91
9. Bibliografía	93
Apéndice.....	109
Pruebas preliminares	109

Definición de la concentración del porcentaje de pergamino de café en la galleta.....	109
Definición del tamaño de la malla de molienda del pergamino de café	110
Definición de la relación agua:pergamino utilizada en la ultrasonicación del pergamino de café.....	111

Resumen

En el presente estudio se evaluó el pergamino de café como un ingrediente para elaborar productos de panadería, aportando fibra dietética y actividad antioxidante al producto final. Se le determinó su composición físico-química y aplicaron diversos pretratamientos con el propósito de alterar las fibras que lo conforman y cambiar la textura de la galleta a la que fue añadido, con el fin de obtener un producto aceptado por el consumidor. Los pretratamientos aplicados fueron: autoclavado en agua, centrifugado, autoclavado con vapor y ultrasonificación con diferentes potencias y tiempos de exposición. El pergamino resultante de los pretratamientos se visualizó microscópicamente y se determinó el porcentaje de fracción insoluble y soluble presente, identificándose los pretratamientos que ejercieron un cambio en la estructura y composición de las fibras, los cuales posteriormente fueron incubados con enzimas celulasas a dos tiempos de incubación (2 h y 24 h). Se encontró que el proceso de autoclavado y posterior tratamiento enzimático no produjo cambios en la fracción insoluble del pergamino ($p > 0,05$), mientras que el ultrasonido a 44 W/cm^2 por 5 minutos disminuyó la fracción insoluble del pergamino (89,7%) con respecto al pergamino sin ningún tipo de tratamiento (96,5%) ($p < 0,05$). Además, se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de la fracción insoluble entre los tiempos de incubación enzimática (87,8% a las 5 h y 84,4% a las 24 h,) ($p < 0,05$). El pergamino molido sin tratamiento fue añadido a galletas dulces en porcentajes de 0%, 1% 2% y 5%, y con un análisis sensorial de aceptación y dureza instrumental se obtuvo el porcentaje con mayor aceptación en el producto, al cual se le realizaron análisis físico-químicos (fibra dietética, humedad, grasa, cenizas, antioxidantes y polifenoles totales) y se compararon con los presentados por el producto control. La galleta con mayor aceptación fue la que se formuló con 2% de pergamino de café, la cual fue a su vez comparada con una galleta con el mismo porcentaje de pergamino sometido a ultrasonificación (50 W/cm^2 por 5 minutos). La galleta con pergamino ultrasonificado presentó la menor dureza en comparación con la que contenía pergamino molido, pero no fue el producto preferido por los consumidores. Se concluyó que el pergamino de café puede utilizarse como un ingrediente potencial para enriquecer con fibra dietética productos de panadería, sin la necesidad de utilizar un pretratamiento para lograr aceptación sensorial por parte de los consumidores.

Palabras clave: alimento funcional, pergamino de café, autoclavado, ultrasonificación, celulasas.

Lista de cuadros

Cuadro 5.1. Caracterización físico-química del pergamino de café en base seca.	44
Cuadro 5.2. Porcentaje de las fracciones solubles e insolubles del pergamino de café sometido a diferentes pretratamientos e incubación enzimática.	55
Cuadro 6.1 Formulación de la galleta control.	67
Cuadro 6.2. Caracterización química del pergamino de café molido y la galleta elaborada con 2% de pergamino molido.	78

Lista de figuras

Figura 3.1 Estructura del grano de café.....	16
Figura 5.1. Microscopía anatómica del pergamino de café molido..	46
Figura 5.2. Fibra de pergamino de café molido sin autoclavar sometido a posterior centrifugación por 5 minutos.....	47
Figura 5.3. Microscopia de pergamino de café autoclavado en solución buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos.....	48
Figura 5.4. Fotografía microscópica del pergamino de café autoclavado con buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos y posteriormente centrifugado por 5 minutos.	48
Figura 5.5 Microscopia del pergamino de café después de haber sido sometido a un autoclavado con solución buffer citrato pH 4, 8 por 90 minutos.	49
Figura 5.6 Vista microscópica de pergamino de café luego de un autoclavado en ácido fosfórico al 1% por 45 minutos.	50
Figura 5.7 Estructura vista al microscopio del pergamino de café sometido a vapor de agua por 30 minutos..	50
Figura 5.8. Pergamino de café sometido a ultrasonificación.....	51
Figura 5.9 Parénquima liberado durante el tratamiento con ultrasonido	52
Figura 5. 10 Pergamino de café molido y autoclavado en solución buffer citrato 4,8 por 30 minutos, y posterior incubación enzimática con celulasas por 24 horas.	52
Figura 5. 11 Pergamino de café sometido a ultrasonificación a una potencia de de 44 W/cm ² por 5 minutos y posteriores incubaciones enzimáticas con celulasas.....	53
Figura 5. 12 Microscopia de las fibroesclereidas del pergamino de café.	54
Figura 6. 1 Flujograma para la elaboración de galletas con pergamino de café.	68
Figura 6.2 Gráfico característico del corte con cuchilla plana de una galleta con 2% de pergamino de café.	70
Figura 6.3 Promedio de aceptación para dos grupos de consumidores de las galletas con distintos porcentajes (0, 1, 2, 5 %) de pergamino de café.....	73
Figura 6.4. Preferencia por parte de 70 potenciales consumidores de las galletas elaboradas con 2% de pergamino molido, pergamino molido-ultrasonificado y ambos tipos de galletas	74
Figura 6.5. Dureza (N) de las galletas con diferentes porcentajes de pergamino de café añadido.	76

Figura 6.6 Dureza (N) de las galletas a las que se les adicionó 2% de pergamino molido y 2% de pergamino molido y ultrasonificado. 77

Lista de abreviaturas

LDL	Lipoproteínas de baja densidad
FAO	Organización de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ROS/RNS	Especies Reactivas de Oxígeno/Nitrógeno
AODF	Fibra Dietética Antioxidante
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
ORAC	Capacidad antioxidante oxígeno radical

1. Justificación

El incremento en la prevalencia de la obesidad en el mundo ha despertado el interés de los investigadores debido a la asociación del exceso de grasa corporal con ciertas enfermedades degenerativas, llegando incluso a ser considerada como la epidemia del siglo XX. Representa actualmente uno de los mayores problemas de salud pública por las consecuencias asociadas al aumento en la incidencia de diabetes *mellitus* tipo II, arterioesclerosis, trastornos óseo-articulares y cáncer (Esquivel-Solís & Alvarado, 2009). Una investigación realizada por Rosero-Bixby *et al.* (2008) indicó que la prevalencia de obesidad entre las personas adultas mayores de Costa Rica resultó en un 26%, la cual fue mucho mayor en las mujeres (33%) que en los hombres (19%), mientras que Esquivel-Solís & Alvarado (2009) afirman que a partir de los 20 años de edad se observa un aumento en la prevalencia de esta enfermedad. En el grupo de 45 a 59 años, esta cifra aumentó hasta alcanzar el 75% de las mujeres, constituyéndose la obesidad en las mujeres de 15-59 años en un problema de salud pública importante en el país. Por otra parte, la diabetes mellitus también se considera una pandemia que afecta tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo. Una investigación demostró que la incidencia estimada de esta enfermedad en Costa Rica fue de 1,62%; lo que indica que se pueden esperar 16 diabéticos por año por cada 1000 personas, sin presentar diferencias por sexo. La obesidad fue uno de los factores de riesgo más prevalentes (Laculé-Murray & Valero-Juan, 2008). Otra de las enfermedades que constituye un problema de salud pública en Costa Rica y está relacionada con la dieta es el cáncer de colon, del cual se diagnostican más de 7 500 casos nuevos de esta enfermedad cada año (Marchena-Rojas, 2012).

Debido a la aparición de enfermedades asociadas al exceso de grasa y azúcares, en la última década del siglo XX cambiaron los hábitos dietéticos por la búsqueda de alimentos que no solamente saciaran el hambre, sino que contribuyeran a tener una salud óptima y

constituyeran una línea de defensa en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer (Hasler, 2000) y la diabetes (Milner, 2010). Los alimentos que presentan estas características se conocen como alimentos funcionales (Hasler, 2000; Clark & Johnson, 2002; Siró *et al.*, 2008; Milner, 2010), dentro de los cuales se encuentran aquellos que contienen fibra dietética y compuestos antioxidantes (Jones, 2002; Monro, 2004; Escudero & González, 2006; Napolitano *et al.*, 2009). La primera previene el riesgo de diversos tipos de cáncer a nivel del tracto gastrointestinal, como por ejemplo de colon (Kamran *et al.*, 2008; Napolitano *et al.*, 2009), y los antioxidantes juegan un papel importante en la protección contra los efectos dañinos del oxígeno en los tejidos (Huang *et al.*, 2002), previniendo enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares e inflamatorias, como la enfermedad de Alzheimer (FAO, 2007).

Dentro de los productos alimenticios que se consideran funcionales se encuentran los granos de cereales, frutas, vegetales, té y chocolate (Hasler, 2000). Sin embargo, existe un incrementado interés por la búsqueda de nuevas fuentes de fibra dietética que ofrezcan nuevas propiedades saludables a los productos tradicionalmente comercializados (Larrauri *et al.*, 1997). Por ejemplo, se han propuesto recientemente subproductos vegetales procedentes de las industrias agroalimentarias para emplearse en productos de alimentación humana, debido a la presencia de fibra dietética y otros fitoquímicos (Gartzia *et al.*, 2007). Una de las actividades que genera gran cantidad de subproductos es el procesamiento de café, el cual produce pulpa, piel plateada y pergamino, entre otros (Bekalo & Reihard, 2010), y cuya recuperación puede ser económicamente rentable (Murthy & Naidu, 2010).

El pergamino de café presenta gran contenido de fibra dietética, la cual supera el 90% (Bekalo & Reinhardt, 2010), siendo la mayoría insoluble (Bekalo & Reihard, 2010), y se afirma que los subproductos del café podrían tener una mayor preferencia que otras fuentes de fibra dietética debido a la presencia de asociados bioactivos con propiedades antioxidantes (Murthy & Naidu, 2010). Al añadir el pergamino de café a una formulación

de algún producto de panadería, se estaría ofreciendo a los consumidores un alimento funcional. Adicionalmente, este tipo de productos permiten la incorporación de un alto contenido de fibra (Román & Valencia, 2006), presentan larga vida útil (Román & Valencia, 2006; Sharif *et al.*, 2009), son fáciles de comer (Gianni *et al.*, 2005) y económicos (Lezcano, 2001), entre otras características deseables en un producto alimenticio.

Sin embargo, el uso de fibra insoluble en productos alimenticios es limitado por su baja aceptación sensorial (Sriwattana *et al.*, 2008), y este tipo de fibra se encuentra mayoritariamente en el pergamino de café (Braham & Bressani, 1979). La digestión enzimática modifica la fibra dietaria, generando productos con mejores características sensoriales (Padrón-Pereira *et al.*, 2009; Torres-Castro & Vargas-Aguilar, 2010). Para lograr una efectiva digestión enzimática en las fibras se han aplicado con éxito pretratamientos como el autoclavado (Arrigoni, 2001; Kasai *et al.*, 2004; Kasai *et al.*, 2010) y el ultrasonido (Novak *et al.*, 2008; Pachecho-Reyes, 2009).

Para la determinación de la fibra dietética se pueden utilizar métodos de cuantificación de fibra soluble e insoluble, así como la observación microscópica de la estructura, y de esta forma determinar si los pretratamientos y tratamientos son o no eficaces. Adicionalmente, es conveniente adicionar la fibra del pergamino a un producto alimenticio para determinar cuán aceptable puede ser para los consumidores. Por otra parte, al utilizar pergamino de café como fuente de fibra dietética y antioxidantes, se estaría aprovechando un subproducto que actualmente es utilizado para alimentación animal o como combustible (Rodríguez-Valencia, 1999), para el desarrollo de productos alimenticios. Esto incrementaría su demanda y generaría mayores ingresos para los productores de café.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

2.1.1 Obtener a partir del pergamino de café un ingrediente funcional por su contenido de fibra y actividad antioxidante para ser añadido en galletas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Analizar los componentes físico-químicos del pergamino de café.

2.2.2 Aplicar diferentes pretratamientos sobre el pergamino de café, con el fin de establecer el más eficaz según su capacidad de modificar su estructura y facilitar un tratamiento enzimático posterior.

2.2.3 Observar por medio de microscopía los cambios en la estructura del pergamino de café pretratado y tratado enzimáticamente.

2.2.4 Evaluar el efecto de la adición de pergamino de café molido en galletas, sobre la aceptación por parte del consumidor y la dureza.

2.2.5 Comparar la preferencia y la dureza de galletas conteniendo pergamino de café molido sin y con un pretratamiento.

3. Marco Teórico

3.1 Alimentos funcionales

Las creencias de diferentes culturas alrededor del mundo sobre los poderes místicos de los alimentos han sido transmitidas de generación en generación. La habilidad de alimentos específicos para prevenir o reducir la gravedad de síntomas derivados de lo que actualmente se conoce como deficiencias nutricionales ha sido registrado en una variedad de documentos históricos (Milner, 2000). Actualmente, los consumidores creen cada vez más que los alimentos contribuyen directamente al mantenimiento de su salud. Por tal razón, en las últimas décadas las demandas de los consumidores en el campo de la producción de alimentos ha cambiado considerablemente (Siró *et al.*, 2008). Hoy en día, el objetivo de la elaboración de alimentos no es solamente satisfacer el hambre y proveer los componentes esenciales de la nutrición (agua, proteína, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales), que son utilizados para el mantenimiento y reparación de los tejidos del cuerpo (Hasler, 2000; Clark & Johnson, 2002; Siró *et al.*, 2008), sino también para prevenir enfermedades asociadas a la nutrición y mejorar la calidad de vida tanto físico como mental de los consumidores. Este cambio se debe a los altos costos en el cuidado de la salud, la aspiración de las personas para mejorar la calidad de vida (Siró *et al.*, 2008) y una mayor conciencia del papel positivo que la dieta puede desempeñar en el riesgo de las enfermedades. Adicionalmente, los gobiernos son cada vez más conscientes del potencial económico de productos alimenticios como parte de estrategias de prevención de salud pública (Jones, 2002) y las investigaciones científicas (Milner, 2000).

Debido a estos requerimientos, en la actualidad se desarrollan los alimentos funcionales, los cuales poseen en su formulación compuestos que ayudan a mantener una buena salud, aparte de la nutrición básica (Hasler, 2000; Clark & Johnson, 2002; Jones, 2002; Siró *et al.*, 2008; Milner, 2010). El término de alimento funcional fue inicialmente usado en Japón en 1980, para los productos fortificados con constituyentes especiales que poseían

efectos fisiológicos ventajosos (Stanton *et al.*, 2005). Los científicos japoneses estudiaron la relación entre nutrición, satisfacción sensorial, fortificación y la modulación de los sistemas fisiológicos. Estos alimentos pueden mejorar la condición general del cuerpo, disminuir el riesgo de enfermedades (Siró *et al.*, 2008), como cáncer de colon, mama y próstata, promover la salud gastrointestinal y neutralizar los radicales libres (Hasler, 2000). Entre los compuestos funcionales se encuentran los probióticos y prebióticos (Jones, 2002; Gibson, 2007), ácidos grasos, flavonoides (Raghuveer & Tandon, 2009), carotenoides, polifenoles, tocoferoles y la fibra dietética (Hasler, 2000; O'Shea *et al.*, 2012).

En cuanto a los alimentos que son considerados funcionales, se sabe que las nueces, los granos enteros, las frutas y los vegetales contienen una variedad de compuestos asociados a la reducción de enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes. Diversos componentes en los granos enteros, como la fibra dietética, proveen protección en el tracto gastrointestinal al influir en su medio (Wu *et al.*, 2003; Milner, 2010), evitando la acumulación de compuestos carcinogénicos (Raghuveer & Tandon, 2009). Asimismo, las frutas, vegetales y granos contienen compuestos antioxidantes (Hasler, 2000), los cuales juegan un papel importante en la protección contra los desórdenes que causan daño oxidativo, ya que pueden contrarrestar los efectos dañinos del oxígeno en los tejidos (Devasagayam *et al.*, 2004).

Debido a que las tendencias socio-demográficas están a favor de los alimentos funcionales, puede suponerse que este tipo de alimentos representan una categoría sustentable en el mercado de los productos alimenticios. Para apoyar esta tendencia, tanto los expertos como médicos y nutricionistas, así como los mismos consumidores, han reconocido la importancia de una relación estrecha de la nutrición y el estado de salud. El desarrollo y posterior comercialización requieren de esfuerzos de investigación significativos. Actualmente, las compañías de productos alimenticios han adoptado medidas para desarrollar productos que ofrezcan múltiples beneficios en un solo alimento

(Siró *et al.*, 2008). La aceptación de los consumidores en estos productos es un factor clave para tener éxito cuando se presenta una oportunidad de mercado (Soto-Mendivil & Vidal-Quintanar, 2001; Jones, 2002; Korzen-Bohr & O'doherty, 2006; Siró *et al.*, 2008).

3.2 Fibra dietética

3.2.1 Generalidades

La fibra dietética constituye un componente importante para mantener una dieta saludable (Kamran *et al.*, 2008). Actualmente no existe un concepto universal que la defina (Escudero & González, 2006). Sin embargo, puede decirse que la fibra dietética son los polisacáridos presentes en las paredes celulares de las plantas que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, y sufre una fermentación completa o parcial en el intestino grueso (Jones, 2002; Borrelli *et al.*, 2004; Monro, 2004; Bunzel & Ralph, 2006; Escudero & González, 2006; Napolitano *et al.*, 2009; Kamran *et al.*, 2008; Daou & Zhang, 2011). La mayoría de las sustancias que se encuentran en la fibra dietética son carbohidratos que, a pesar de ser químicamente diferentes, comparten la característica de ser resistentes a la digestión enzimática (Amador-Ramírez, 2001). Su fuente mayoritaria se encuentra en alimentos como frutas, vegetales, granos enteros y cereales (Wu *et al.*, 2003).

Los componentes de la fibra dietética se han clasificado de varias formas, pero para efectos de su análisis en el laboratorio se han dividido en fibra dietética soluble e insoluble, (Amador-Ramírez, 2001; Jones, 2002; Monro, 2004; Escudero & González, 2006; Napolitano *et al.*, 2006; Daou & Zhang, 2011), de acuerdo con su solubilidad en el agua (Borrelli *et al.*, 2004; Daou & Zhang, 2011), y ambas fracciones conforman la fibra dietética total, que están asociadas con efectos particulares metabólicos y fisiológicos en el ser humano (Daou & Zhang, 2011). Dentro de la fibra dietética insoluble se encuentra la celulosa, parte de la hemicelulosa y la lignina, mientras que algunos componentes de la

fibra soluble son las pectinas, gomas y mucílagos (Jones, 2002; Escudero & González, 2006; Napolitano *et al.*, 2006). Los componentes de la fibra insoluble son generalmente más resistentes a la fermentación colónica que los de la fibra dietética soluble (Jones, 2002; Napolitano *et al.*, 2006).

La celulosa es el biopolímero más abundante existente en el planeta (Cockburn *et al.*, 2010; Quirk *et al.*, 2009), y es el principal componente de la membrana celular de la mayor parte de las plantas (Garro, 2008; Omojasola *et al.*, 2008; Quirk *et al.*, 2009). Estructuralmente, es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces β -(1-4), los cuales, dependiendo de la fuente pueden extenderse a 15 000 residuos en longitud (Cockburn *et al.*, 2010). La configuración β le permite formar cadenas largas y lineales, las cuales se presentan unidas entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares, dando lugar a la formación de miofibrillas (Kilara & Desai, 2002; Wyman *et al.*, 2005; Garro, 2008; Cockburn *et al.*, 2010), que miden entre 2-20 nm de diámetro y 100-40 000 nm de longitud (Omojasola *et al.*, 2008). Estas zonas, conocidas como regiones cristalinas, son altamente ordenadas y le dan la característica de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático (Garro, 2008; Cockburn *et al.*, 2010). A pesar de que la celulosa está formada por unidades de glucosa, la mayoría de los animales no pueden utilizarla como fuente de energía, ya que no cuentan con las enzimas necesarias para romper los enlaces β -(1-4) glicosídicos. Sin embargo, en el intestino de los rumiantes, herbívoros y algunos insectos existen microorganismos que poseen estas enzimas y rompen estos enlaces. Al hidrolizarse la molécula de celulosa quedan disponibles las moléculas de glucosa, que puede emplearse como fuente de energía (Garro, 2008).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante. Es un componente esencial de las paredes celulares primarias y secundarias de las plantas (Wyman *et al.*, 2005; Hoch, 2007). Estas paredes celulares son fuertes, están compuestas de polisacáridos y proteínas, proveen el soporte y dan la forma a la planta. También son una barrera contra el medio ambiente y los microorganismos patógenos (Scheller & Ulvskov, 2010). Químicamente la

hemicelulosa es un grupo heterogéneo de polisacáridos, los cuales están caracterizados por presentar unidades de azúcares unidos por enlaces β (1-4) (Wyman *et al.*, 2005; Scheller & Ulvskov, 2010). La fracción hemicelulósica de estas paredes está formada por la unión glicosídica de distintos monosacáridos, sobre todo pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos urónicos (galacturónico y glucorónico) (Spiridon & Popa, 2005; Valdez-Martínez, 2006). La hemicelulosa se asocia con la celulosa y la lignina por medio de enlaces de hidrógeno y covalentes, respectivamente. Su contenido cambia durante la maduración de frutas y vegetales (Sun *et al.*, 2004; Valdez-Martínez, 2006).

3.2.2 Efectos fisiológicos de la fibra dietética

Desde la década de los sesenta se ha promovido la importancia de ingerir fibra dietética en la dieta, lo cual ha contribuido a la realización de estudios que han descubierto sus efectos benéficos sobre la salud (Escudero & González, 2006; Valdez-Martínez, 2006). Durante la década pasada, se publicaron numerosos estudios epidemiológicos que relacionan inversamente la ingesta de fibra dietética con enfermedades cardiovasculares (Soto-Mendivil & Vidal-Quintanar, 2001; Lairon *et al.*, 2005; Napolitano *et al.*, 2009), sobrepeso e hipertensión (Lairon *et al.*, 2005). Pruebas experimentales realizadas en humanos y animales sugieren una asociación entre el incremento en el consumo de este compuesto y la reducción de las concentraciones de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad). Estas observaciones indican una vía de regulación entre la fibra dietética, lípidos en el plasma y la arteriosclerosis (Wu *et al.*, 2003). Varios estudios indican que el consumo de fibra dietética está también inversamente asociada al riesgo de diabetes tipo II y cáncer a nivel del tracto gastrointestinal, (Napolitano *et al.*, 2009), como por ejemplo de colon (Soto-Mendivil & Vidal-Quintanar, 2001; Lairon *et al.*, 2005; Kamran *et al.*, 2008; Daou & Zhang, 2011) y diverticulosis (Soto-Mendivil & Vidal-Quintanar, 2001; Daou & Zhang, 2011).

A nivel del sistema digestivo, la fibra ejerce efecto desde la masticación hasta la evacuación de las heces. Las dietas con un contenido en fibra elevado requieren más tiempo de masticación por lo que retardan la velocidad de deglución y esto provoca una mayor salivación que repercute en la mejora de la higiene bucal. Mientras que al nivel del estómago, las fibras solubles disminuyen el vaciamiento gástrico y aumentan su distensión (Escudero & González, 2006) prolongando la sensación de saciedad (Wu *et al.*, 2003; Escudero & González, 2006; Kamran *et al.*, 2008). En el intestino delgado aumenta el espesor de la capa de agua que traspasan los solutos para alcanzar la membrana del enterocito, lo que provoca una disminución en la absorción de glucosa, lípidos y aminoácidos (Escudero & González, 2006). Las fibras solubles captan agua (Wu *et al.*, 2003) mientras que la fibra insoluble es capaz de retener agua dentro de su matriz estructural (Escudero & González, 2006) y, por lo tanto, aumenta el volumen de la materia fecal; esto provoca un incremento en los movimientos peristálticos del intestino y facilita el tránsito, la distensión intestinal y, consecuentemente, la defecación (Valdez-Martínez, 2006).

La acción primaria de la fibra se realiza principalmente en el colon del ser humano (Valdez-Martínez, 2006) ya que llega al intestino grueso de forma inalterada y aquí las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas de gran actividad metabólica, pueden digerirla en mayor o menor medida dependiendo de su estructura (Escudero & González, 2006). Esta etapa de la digestión se produce en condiciones anaerobias y se denomina fermentación (Monro, 2004; Escudero & González, 2006). Este proceso es fundamental, ya que produce el mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana y células epiteliales. En este contexto, el crecimiento de bacterias benéficas, como *Lactobacillus* spp. (Saura-Calixto, 2011) y *Bifidobacterium* spp. (Saura-Calixto, 2011; Pozuelo *et al.*, 2012) mejoran la digestión de la lactosa y el funcionamiento del sistema inmune a través de la estimulación de citoquinas (Pozuelo *et al.*, 2012). La fermentación produce hidrógeno, dióxido de carbono, gas metano (García-Peris *et al.*, 2002) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el acético, butírico y propiónico (García-Peris *et al.*, 2002; Escudero & González,

2006; Napolitano *et al.*, 2006), los cuales bajan lentamente el pH del colon y así controlan el peligro de crecimiento de microorganismos patógenos (Escudero & González, 2006; Napolitano *et al.*, 2006), inhibiendo a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Candida albicans* (Saura-Calixto, 2011).

3.2.3 Fibra dietética antioxidante

Los radicales libres son compuestos que poseen electrones impares (Huang *et al.*, 2012). Son altamente tóxicos para todos los tipos de moléculas biológicas, incluyendo ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos. Están involucrados en los procesos de peroxidación lipídica, arteriosclerosis, mutagénesis (Raghuveer & Tandon, 2009) y carcinogénesis (Huang *et al.*, 2002; Raghuveer & Tandon, 2009), por medio de una inducción de la mutación, inhibiendo la reparación del ADN e inactivando ciertos genes supresores de tumores, produciendo cáncer (Raghuveer & Tandon, 2009). También se relacionan con enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares e inflamatorias, como la enfermedad de Alzheimer (FAO, 2007). La relación entre los radicales libres y la aparición de enfermedades puede ser explicada con el concepto de estrés oxidativo. En el cuerpo humano saludable, la generación de compuestos pro oxidantes en la forma de especies reactivas de Oxígeno/Nitrógeno (ROS/RNS, por sus siglas en inglés) se mantiene bajo control por los distintos niveles de actividad antioxidante del organismo, tales como reacción directa para neutralizar los radicales libres secuestrando a las especies reactivas de oxígeno y quelantes de metales (Raghuveer & Tandon, 2009), reducción de peróxidos y estimulación de la actividad defensiva antioxidante de las enzimas (Bilgiçli *et al.*, 2007). Algunas enzimas que están involucradas en este mecanismo son: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Devasagayam *et al.*, 2004). Se conoce que las vitaminas C y E, compuestos fenólicos, glutatión (FAO, 2007), licopeno y los flavonoides (Devasagayam *et al.*, 2004) presentan actividad antioxidante, protegiendo contra el daño celular (FAO, 2007). Sin embargo, cuando hay exposición a agentes adversos

fisicoquímicos o patológicos, como contaminantes atmosféricos, humo de cigarrillo, rayos ultravioleta, radiación, químicos tóxicos y malnutrición. Este equilibrio se cambia a favor de los prooxidantes, que resulta en el estrés oxidativo (Devasagayam *et al.*, 2004).

La fibra dietética y los compuestos antioxidantes son compuestos no relacionados entre sí, debido a diferencias sustanciales en su estructura química y propiedades físico-químicas y biológicas así como en las vías metabólicas, ya que la primera resiste a la hidrólisis por las enzimas digestivas y sufre fermentación en el intestino grueso, mientras que los compuestos antioxidantes se liberan en el tracto gastrointestinal por solubilización directa con los fluidos intestinales y por la acción de las enzimas digestivas, y al ser biodisponibles se absorben por la mucosa del intestino delgado (Saura-Calixto, 2011). Sin embargo, Sun-Waterhouse *et al.* (2008) afirman que, cuando la fibra dietética y los antioxidantes naturales se consumen conjuntamente, ellos interactúan uno con el otro durante su paso por el tracto gastrointestinal. Saura-Calixto (2011) explica que la presencia de fibra dietética y una cantidad considerable de antioxidantes siguen un proceso fisiológico común y sinérgico en el tracto gastrointestinal. Muchos antioxidantes de la dieta (vitaminas C y E, carotenoides, polifenoles de bajo peso molecular) son total o parcialmente absorbidos en el intestino delgado, pero una cantidad apreciable, principalmente compuestos fenólicos y algunos carotenoides, atraviesan el intestino delgado intactos junto con la fibra dietética. Estos antioxidantes alcanzan el colon, donde se liberan de la matriz de fibra y producen metabolitos y un medio antioxidante por la acción de la microflora bacteriana. Por lo tanto, la Fibra Dietética Antioxidante (AODF, por sus siglas en inglés) puede definirse como una fibra que contiene cantidades significativas de antioxidantes naturales asociados a la matriz fibrosa con las siguientes características específicas: contenido de fibra dietética mayor a 50% en materia seca (Saura-Calixto, 2010), la capacidad antioxidante debe ser una propiedad intrínseca, derivada de constituyentes naturales del material (soluble en fluidos digestivos), no por antioxidantes añadidos (Saura-Calixto, 1998; Saura-Calixto, 2010).

Existe un interés por la búsqueda de nuevas fuentes de fibra dietética con constituyentes específicos bioactivos que ofrezcan nuevas propiedades saludables a los productos tradicionalmente comercializados. En la selección de una nueva fuente de fibra dietética, alguna propiedad adicional, como lo es la actividad antioxidante, debe tomarse en cuenta (Larrauri *et al.*, 1997). Este interés se basa en dos aspectos: el efecto protector contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares de los antioxidantes naturales, y un rechazo general de los antioxidantes sintéticos por los consumidores. Desde un punto de vista nutricional, es preferible no remover los compuestos bioactivos de los alimentos. Su extracción involucra una recuperación incompleta, así como pérdidas de la actividad biológica y efectos sinérgicos (Saura-Calixto, 1998). Productos alimenticios y concentrados de fibra dietética antioxidante son muy populares en el mercado pero la capacidad antioxidante es limitada (Jiménez-Escrig *et al.*, 2011).

Se han realizado varios estudios en alimentos que son altos en AODF. Larrauri *et al.* (1997) concluyeron que la cáscara de piña es una fuente prometedora de fibra dietética que contiene polifenoles asociados que exhiben actividad antioxidante. Esta propiedad la convierte en una fuente de fibra adecuada para un amplio rango de aplicaciones como ingrediente alimenticio. Jiménez-Escrig *et al.* (2001) evaluaron la guayaba como una fuente de fibra dietética antioxidante, y sus resultados indicaron que esta fruta puede ser una fuente disponible de antioxidantes naturales, además de que su cáscara y pulpa poseen fibra dietética con propiedades antioxidantes. En el caso de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), los polifenoles y la fibra dietética pueden ser liberados de la matriz alimentaria durante la preparación de la planta en forma de bebida (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007). Se ha reportado actividad antioxidante proveniente de los fragmentos de hemicelulosa del salvado de maíz (Saura-Calixto, 1998). Por lo tanto, fuentes que contienen fibra dietética con alta capacidad antioxidante podrían mejorar la ingesta de antioxidantes junto con las cantidades recomendadas de fibra (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001).

El Departamento de Metabolismo y Nutrición, en Madrid, España, ha realizado en los últimos años varios estudios de fibras dietéticas ricas en polifenoles, la composición del orujo de uva y sus propiedades fisiológicas, incluyendo la capacidad antioxidante. Este producto combina en un solo material los efectos fisiológicos conjuntos de la fibra dietética y antioxidantes.

3.3 Subproductos obtenidos en el procesamiento del café

La planta del café es originaria del norte de África y se cultiva con el objeto de producir su grano, que permite preparar la infusión que actualmente constituye una de las bebidas más populares y apreciadas alrededor del mundo (Dórea & da Costa, 2005; Díaz-Rubio & Saura-Calixto, 2007; Noriega-Salazar *et al.*, 2009), debido a su aroma y sabor (Dórea & da Costa, 2005; Higdon & Frei, 2006; Díaz-Rubio & Saura-Calixto, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Noriega-Salazar *et al.*, 2009). Su composición química es muy variada y compleja, presentando más de 100 sustancias entre las que se incluyen minerales, azúcares, aminoácidos, lípidos, alcaloides y compuestos fenólicos (Pereira *et al.*, 2007; Díaz-Rubio & Saura-Calixto, 2007). Diferentes estudios han demostrado que presenta actividad antibacteriana y produce efectos psicoactivos, neurológicos y ejerce efecto sobre el funcionamiento del cerebro humano (Pereira *et al.*, 2007).

La producción de café sobrepasa los 105 millones de toneladas por año, por lo que la eliminación de estos materiales representa un problema para el medio ambiente (Ferrer *et al.*, 1995; Murthy & Naidu, 2010). Durante el beneficiado del café se produce una serie de subproductos, dentro de los cuales se encuentra la pulpa, la cáscara del café cerezo, la piel plateada y el pergamino, entre otros (Bekalo & Reihard, 2010). Los nuevos aspectos concernientes al uso de estos subproductos para su aprovechamiento como aditivos alimentarios o suplementos con alto valor nutricional han generado cada vez un mayor interés, ya que se trata de productos de precio elevado y su recuperación puede ser

económicamente rentable (Murthy & Naidu, 2010), por lo que es comprensible que se realicen investigaciones enfocadas en analizar la composición de los subproductos que se obtienen del procesamiento del café.

En relación con la pulpa del café, ésta presenta 44% de carbohidratos, como glucosa, 12% de proteína, 21% de fibra (Pandey *et al.*, 2000) y 1-1,48% de compuestos fenólicos (Murthy & Naidu, 2010). Su contenido de humedad es muy alto (Braham & Bressani, 1979; Ferrer *et al.*, 1995). En relación con los componentes que conforman la fibra dietética, presenta 21,54% de lignina, 25,31% de celulosa y 3,23% de hemicelulosa (Molina *et al.*, 1990).

El pergamino de café es sometido a un procedimiento de tostado, en donde se obtiene la piel plateada (Borrelli *et al.*, 2004; Fogliano, 2006; Napolitano *et al.*, 2007) y recientemente se ha sugerido su uso como un potencial ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales ricos en fibra (Borrelli *et al.*, 2004). Algunos estudios sobre la composición química de la piel plateada han revelado que posee un significativo contenido de fibra dietética total (62,2%) con una cantidad de 8,7% de fibra dietética soluble (Borrelli *et al.*, 2004). Estos resultados indican que en la piel plateada, de la fibra dietética total, alrededor del 14% es fibra soluble, y un 86,0% es insoluble (Borrelli *et al.*, 2004; Fogliano, 2009; Napolitano *et al.*, 2007). El contenido de fibra dietética total presente es más alto que otros ingredientes provenientes de cereales, como el salvado de trigo y de avena; y la cantidad de fibra soluble es comparable a la que posee el salvado de avena, pero esta última únicamente presenta 21% de fibra dietética total (Borrelli *et al.*, 2004).

3.3.1 Pergamino de café

El pergamino de café es la parte anatómica que envuelve el grano, (Torres-Castro & Vargas Aguilar, 2010), tal como se muestra en la **Figura 3.1**, y constituye alrededor del

12% de peso del grano en base seca (Rodríguez-Valencia, 1999; Torres-Castro & Vargas Aguilar, 2010). Tradicionalmente se ha utilizado como combustible en ladrilleras, alimentación animal y en silos para el secado del café. Por cada Kg de café cerezo se producen 35 g de pergamino (Rodríguez-Valencia, 1999).

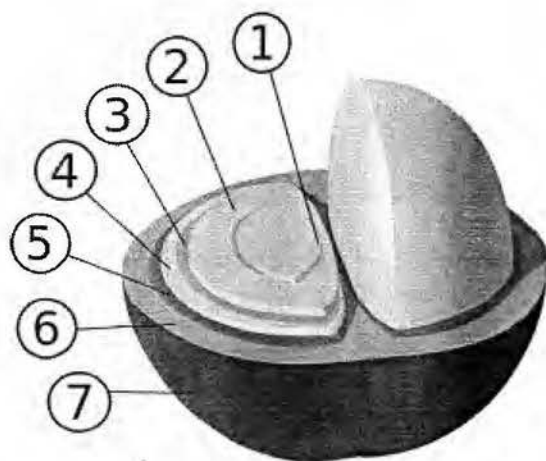


Figura 3.1 Estructura del grano de café. (1) Corte central. (2) Grano de café (endosperma). (3) Piel plateada (tegumento) (4) Pergamino (endocarpio). (5) Capa de pectina. (6) Pulpa (mesocarpio) (7) Piel exterior (epicarpio). (León, 2000)

La composición química del pergamino ha sido comparada con las cascarillas de la semilla del algodón y mazorcas de maíz, ya que la concentración de proteína es similar en los tres subproductos, pero la fibra cruda es significativamente alta en el pergamino, la cual supera el 90% (Braham & Bressani, 1979). Menéndez *et al.* (2007) afirman que es un compuesto rico en celulosa. Bekalo & Reinhardt (2010) analizaron la composición química del pergamino y se determinó que presentó un 40-49% de celulosa, 25-32% de hemicelulosa, 33-35% de lignina y 0,5-1% de cenizas. También presentó 7,6% de humedad, 92,8% de materia seca, 0,39% de nitrógeno y 0,5% de cenizas. Braham & Bressani (1979) afirman que presenta concentraciones altas de lignina, pentosas y hexosas. Las fibras individuales que conforman el pergamino de café tienen un promedio de 0,3 mm de longitud, típicamente clasificada como fibra corta. El diámetro es alrededor de 15 μm , por lo cual se clasifica como fina (Bekalo & Reihard, 2010).

Por otro lado, la información pertinente a la actividad antioxidante del pergamino del café es muy escasa. Sin embargo, se han realizado estudios basados en otros subproductos del café, los cuales anatómicamente están relacionados con el pergamino. En una investigación realizada por Murthy & Naidu (2010) se analizó el contenido de fibra dietética y antioxidantes de los principales subproductos obtenidos del café, tales como la pulpa, la piel plateada y la cáscara del café cerezo. Se encontró que todos los subproductos presentaban un contenido significativo de fibra dietética, en donde los valores obtenidos fueron comparables a los presentados por las hortalizas y cereales. Además, todos los subproductos eran ricos en compuestos fenólicos. Los autores llegaron a la conclusión que la fibra de los subproductos del café podría tener una mayor preferencia que otras fuentes de fibra dietética debido a la presencia de asociados bioactivos (compuestos fenólicos) con propiedades antioxidantes, que aportan beneficios adicionales para la salud. Asimismo, el fraccionamiento de estos subproductos puede representar una excelente oportunidad para el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales en una gran variedad de preparaciones alimenticias con alto valor nutricional.

3.4 Efecto de la fibra sobre la textura de productos de panadería

3.4.1 Incorporación de fibra a fórmulas panaderas

Debido a que los nutricionistas recomiendan elevar el consumo de fibra dietética para el mejoramiento de la salud (Clark & Johnson, 2002), existe un gran interés en desarrollar ingredientes con fibra dietética para la elaboración de alimentos funcionales, los cuales tienen un gran potencial en el mercado (Clark & Johnson, 2002; Wong & Cheung, 2005; Galdeano & Grossmann, 2006). Al mismo tiempo, hay una tendencia en la búsqueda de nuevas fuentes de fibra dietética (Wong & Cheung, 2005). Según dictamina el Decreto N° 30256-MEIC-S Etiquetado Nutricional de los Alimentos Preenvasados, en el descriptor

nutricional para fibra dietética, un alimento con no menos de 3 g por 100 g se reporta como fuente de fibra, mientras que si contiene dos veces los valores de la fuente, se cataloga como alto en fibra.

La incorporación de fibra en las fórmulas panaderas se ha utilizado con gran éxito (Cannet-Romero *et al.*, 2004). Algunas fuentes de fibra han sido utilizadas para elaborar productos de panadería de buena calidad como son: pasteles con celulosa, galletas de azúcar con salvado de trigo, barras de cereal con cáscaras de tomate, “muffins” con cáscara de semilla de girasol, entre otros (Grigelmo-Miguel *et al.*, 2001). Se ha reportado que las fibras de limón y manzana tienen una alta capacidad de ligar agua y se han utilizado en pasteles, panes y productos similares a base de cereales, para mejorar la suavidad, y generar un producto con un valor energético reducido (Bilgiçli *et al.*, 2007).

Sin embargo, el criterio más importante de la selección del nivel de incorporación de cualquier ingrediente es la contribución en la aceptación que éste tendrá en el producto final (Cannet-Romero *et al.*, 2004; Galdeano & Grossmann, 2006). La textura es particularmente el descriptor sensorial más importante a considerar, ya que es el principal atributo en la determinación de la aceptabilidad en todos los productos horneados, lo cual es influenciado por la combinación de ingredientes y factores de procesamiento (Maldonado & Pacheco de Delahaye, 2000). La textura se define como el atributo de un alimento que resulta de una combinación de propiedades físicas percibidas por los sentidos del tacto, vista y oído. Las propiedades físicas también incluyen la forma, tamaño, número, naturaleza y la conformación de los elementos estructurales. Este atributo juega un papel importante en la aceptación de un producto (Carpenter *et al.*, 2000).

Existen numerosas investigaciones que evalúan el efecto de la adición de fibra en las características de los productos de panadería, dentro de las cuales se destaca la aceptación por parte de los consumidores y los cambios en la textura. Clark & Johnson (2002) afirman que la adición de fibra modifica las propiedades de las masas, lo que puede influir en la textura del producto listo para consumir.

En la investigación realizada por Clark & Johnson (2002), se estudió la adición del tegumento de lupino, el cual es rico en fibra, a cinco productos alimenticios: pan blanco, "muffin", pasta, jugo de naranja y barras de desayuno. Hubo diferencias significativas en los "muffins", jugo de naranja y barras de desayuno adicionadas con fibra en comparación con el control en cuanto a la textura en la boca y aceptabilidad de los panelistas. El producto sin fibra obtuvo promedios más altos. Aún así, no hubo diferencias en cuanto a textura en el pan blanco y la pasta añadida con tegumento en comparación con el control. Los autores concluyeron que el procesamiento influye también en la textura final y la aceptabilidad.

También se reporta un estudio donde se agregó fibra de melocotón a "muffins", con niveles de sustitución del aceite de 2%, 3%, 4%, 5% y 10% (Grigelmo-Miguel *et al.*, 2001). Los resultados demostraron que la adición de la fibra oscureció los productos y, asimismo, afectó la dureza y masticabilidad por la sustitución de aceite por la fibra. Al incrementarse los niveles alrededor del 2% de fibra, también aumentó la dureza y la masticabilidad de los "muffins". A nivel sensorial, los "muffins" con 5% o más de fibra fueron menos aceptables que el control. Asimismo, Martínez *et al.* (2008) desarrollaron un postre lácteo que contenía en su formulación fibra de residuos resultantes de la separación de pulpa de naranja como fuente de fibra, el cual fue aceptado sensorialmente.

3.4.2 Incorporación de fibra a formulaciones de galletas

El término galleta se refiere al producto horneado que generalmente contiene como ingredientes principales harina, azúcar y grasa. Otros ingredientes que se incluyen dentro de su formulación son levadura, jarabes, sal y emulsificantes, pero generalmente se usan en pequeñas cantidades (Pareyt & Delcour, 2008). Las galletas y productos semejantes han sido elaborados y consumidos por el ser humano por siglos (Sharif *et al.*, 2009). Son muy populares (Giami *et al.*, 2005; Román & Valencia, 2006), ampliamente aceptados,

particularmente por los niños (Galdeano & Grossmann, 2006) y consumidos en muchos países (Giami *et al.*, 2005). A diferencia de otros productos horneados como el pan y los pasteles, poseen una larga vida útil (Román & Valencia, 2006; Sharif *et al.*, 2009), bajo contenido de humedad (Chacón-Martínez, 1983; Faridi *et al.*, 2000; Lee & Inglett, 2006; Pareyt & Delcour, 2008; Sharif *et al.*, 2009), que oscila entre 1-5% (Pareyt & Delcour, 2008), y debido a esto es menos probable su deterioro microbiano (Sharif *et al.*, 2009). Son ideales debido a su disponibilidad de nutrientes, palatabilidad, compactación y conveniencia (Sharif *et al.*, 2009). La mayoría de las veces son dulces y fáciles de comer (Giami *et al.*, 2005), su aroma es agradable (Romanchik-Cerpovicz, 2002) y presentan variedad de sabores (Román & Valencia, 2006). Tomando en consideración que las galletas se caracterizan por su larga duración, aún en climas calientes, estas ofrecen la posibilidad de producción centralizada en gran escala y distribución en un área extensa (Chacón-Martínez, 1983).

Actualmente, se consideran un producto de primera necesidad debido a la alta aceptabilidad y las investigaciones recientes no solo se enfocan en disminuir su contenido de grasa (Maldonado & Pacheco de Delahaye, 2000; Canett-Romero *et al.*, 2004), sino también en incrementar su contenido de fibra dietaria (Canett-Romero *et al.*, 2004). Se ha añadido fibra de diversas fuentes a galletas y se ha observado que esta adición puede alterar las propiedades de algunos alimentos tales como la apariencia, el sabor y textura (Maldonado & Pacheco de Delahaye, 2000; Clark & Johnson, 2002; Canett-Romero *et al.*, 2004).

Bilgiçli *et al.* (2007) prepararon galletas en cuya formulación se sustituyó la harina de trigo por fibras de manzana, limón y salvado de trigo (0%, 15%, 20% y 30%). Se investigó el efecto de incrementar los niveles de fibra de estas fuentes sobre las propiedades nutricionales de las galletas, las cuales fueron: digestibilidad de la proteína y compuestos fenólicos totales. Se encontró que la adición de las distintas fuentes de fibra no cambió las propiedades nutricionales con respecto al control. Sin embargo, el total de compuestos

fenólicos se incrementó conforme se aumentó el nivel de fibra del salvado de trigo, no ocurriendo esto con los otros tipos de fibra. Los autores atribuyeron esto a las propiedades antioxidantes que presenta el salvado de trigo.

La investigación realizada por Galdeano & Grossmann (2006) se basó en mejorar la aceptación sensorial de una galleta con 20% de fibra proveniente de cascarilla de avena, la cual se obtiene de la molienda de la avena y es descartada durante su procesamiento. Se estudió esta fuente ya que posee un significativo contenido de fibra (90%), el cual es más alto que el trigo y el salvado de maíz, pero produce una textura arenosa y degradación de las propiedades en la masa de los productos a los que es añadido. Para evitar esta textura no deseada, se aplicó un pretratamiento a la fibra antes de incorporarla a la formulación de la galleta, el cual consistió en un tratamiento con peróxido de hidrógeno y posterior extrusión. Al final de la investigación, no hubo diferencias significativas en las propiedades físicas de los tipos de galletas (diámetro, volumen, grosor) aunque sí se diferenciaron sensorialmente, ya que los panelistas percibieron una disminución de la sensación arenosa en las galletas preparadas con cascarillas tratadas, en comparación con las que contenían cascarillas no tratadas, lo que indicó que el tratamiento fue efectivo. La galleta preferida fue la que contenía cascarilla tratada.

Asimismo, Canett-Romero *et al.* (2004) agregaron diferentes niveles de cascarilla de orujo de uva (subproductos sólidos del proceso de vinificación) a galletas, debido a que este subproducto es rico en fibra dietética. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en relación con la aceptación sensorial de las galletas con los distintos niveles de orujo. Este subproducto posee 54,42% de fibra dietética total, en donde la fibra insoluble (49%) predomina sobre la soluble (5,42%).

Como puede observarse, existe gran variedad de productos de panadería enriquecidos con fibras de diversas fuentes (Grigelmo-Miguel *et al.*, 2001), los cuales se han agregado en diferentes porcentajes de sustitución con base en la cantidad de harina de trigo. De

estos estudios se puede deducir que el grado de aceptación de una galleta u otro producto de panadería al que se le adiciona fibra va a depender de la fuente de fibra y el método de elaboración.

3.5 Utilización de enzimas para mejorar las características sensoriales de los alimentos con alto contenido de fibra

Para cumplir con las recomendaciones de consumo de 20-35 g de fibra dietética por día, es necesario mejorar los hábitos dietéticos para incrementar la ingesta de frutas, vegetales y granos enteros. Otra posibilidad de ingerir la cantidad recomendada de fibra es elaborar productos enriquecidos con fibra dietética proveniente de diferentes fuentes como pulpas de frutas ó cáscaras, siendo estas últimas utilizadas principalmente como fertilizantes, alimentos para animales o combustibles. Sin embargo, debido a sus propiedades físico-químicas muchos de estos subproductos no pueden ser añadidos en cantidades relevantes, debido a su sabor desagradable y color y texturas no deseados (Arrigoni, 2001). Se afirma que el uso de fibra insoluble como ingrediente de productos alimenticios es limitado debido a su aceptación sensorial (Sriwattana *et al.*, 2008). Por esta razón, se han desarrollado métodos físicos y químicos para modificar las características de los materiales ligno-celulósicos de la fibra (Ferrer *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2010).

El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad. Sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar las fracciones presentes en la biomasa (Arrigoni, 2001), ya que presenta estructuras complejas resistentes al ataque microbiano, debido a la interacción entre sus componentes (Wilkins *et al.*, 2007). El objetivo de los pretratamientos es aumentar el área superficial y la digestibilidad, así como disociar el complejo celulosa-lignina (Yang & Wiman, 2006). Estas operaciones favorecen la exposición del sustrato a una segunda etapa, la hidrólisis, la cual puede ser ácida o enzimática (Tan *et al.*, 2010). Sin embargo, los pretratamientos químicos presentan la desventaja que dañan las

propiedades sensoriales del producto final (Napolitano *et al.*, 2006; Napolitano *et al.*, 2009) mientras que se obtiene una hidrólisis baja con los procedimientos físicos (Napolitano *et al.*, 2006).

Varios estudios (Padrón-Pereira *et al.*, 2009; Torres-Castro & Vargas-Aguilar, 2010) muestran que la digestión enzimática modifica la fibra produciendo productos con mejores características sensoriales. Los componentes de la fibra insoluble pueden ser hidrolizados usando enzimas como las celulasas y hemicelulasas (Wilkins *et al.*, 2007), lo cual resulta en cambios en las propiedades funcionales del material (Kim *et al.*, 2005). Los métodos enzimáticos para modificar la fibra solucionan los problemas tanto tecnológicos como sensoriales (Arrigoni, 2001) y nutricionales (Napolitano *et al.*, 2009). En general, estos tratamientos buscan reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina y aumentar el área superficial, entre otros. El uso de enzimas como las celulasas produce rendimientos satisfactorios (Yang & Wiman, 2006).

La aplicación de métodos enzimáticos para modificar la fracción de fibra dietética es una labor delicada, pues se desea una cierta despolimerización que permita una solubilización de los polisacáridos, pero al mismo tiempo deben evitarse pérdidas significativas de fibra debido a un ataque enzimático intenso (Arrigoni, 2001). Padrón Pereira *et al.* (2009) llevaron a cabo la hidrólisis de la harina del cactus *Epiphyllum hookeri*, debido a que experimentos que adicionaban este producto a formulaciones alimenticias alteraba sus propiedades funcionales, particularmente la textura. Con el fin de obtener un producto final aceptable sensorialmente, se emplearon enzimas fibrolíticas hemicelulasas, celulasas y pectinasas. Al final de la investigación, se observó una disminución del contenido de celulosa del 5,02%, de hemicelulosa del 5,89%, y de pectina en un 42,73%, equivalente a una degradación en azúcares simples del 2,49%.

3.5.1 Celulasas

Las celulasas son un tipo de enzimas utilizadas en la industria alimentaria y cuyo sustrato es la celulosa. Son un sistema complejo de enzimas, que se denominan carbohidrasas, las cuales hidrolizan los enlaces β -(1-4) de la celulosa (Amador-Ramírez, 2001; Quirrasco-Baruch & López Munguía, 2006) y está formado por tres enzimas: endo-1,4- β -glucanasa, exo-glucanasa y β -glucosidasa o celobiasa, las cuales actúan sinérgicamente para lograr la degradación completa de la celulosa (Amador-Ramírez, 2001; Kilara & Desai, 2002). La endoglucanasa hidroliza los enlaces glicosídicos β -1,4 de manera aleatoria (Kilara & Desai, 2002; Ogawa & Shimizu, 2004), produciendo múltiples cadenas de polímeros de diversas longitudes (O'Connell & Guilbault, 2003; Aehle, 2007). La exoglucanasa libera tetrasacáridos o disacáridos como la celobiosa de los extremos no reductores de los polímeros de celulosa. Finalmente, la tercera enzima, β -glucosidasa hidroliza la celobiosa y oligosacáridos formados en la etapa anterior para formar glucosa (Kilara & Desai, 2002).

A pesar de que las enzimas celulolíticas provenientes de bacterias, hongos, plantas e invertebrados han sido descritas y estudiadas, solamente las enzimas de origen microbiano poseen potencial industrial. Algunas bacterias como *Clostridium thermomonospora*, *Clostridium* spp., y hongos como *Trichoderma reesei*, *Penicillium fusicolsum* y *Aspergillus niger* son una buena fuente de este tipo de enzimas. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) clasificó a las celulasas provenientes de *A. niger* como sustancias GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro, por sus siglas en inglés) (Kilara & Desai, 2002), y las que se originan de *Trichoderma reesei* tienen la misma categoría (Attri *et al.*, 2013). En los tratamientos enzimáticos con celulasas, las condiciones de pH y temperatura a las cuales actúan estas enzimas son 4-6 y 40-50 °C respectivamente, variando en función del tipo de enzima comercial que se utilice. Por lo tanto, la efectividad y reproducibilidad del tratamiento dependerá enormemente del control de estas dos variables (O'Connell & Guilbault, 2003).

Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción o filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos y extracción de aceites comestibles, entre otros. Se ha reportado el uso de estas enzimas para degradar los polisacáridos que están presentes en el coco y así extraer la “leche de coco” que se encuentra retenida en el residuo del fruto extraído. Con este tratamiento se obtiene un jugo más dulce, al liberarse la glucosa como producto de la degradación de los polisacáridos. Asimismo se utilizan en la extracción de colorantes de las flores, ya que degradan los componentes de la pared celular, haciendo más fácil la extracción de los compuestos responsables del color. Igualmente, se utilizan para liberar los antioxidantes presentes en la cáscara de la uva (Garro, 2008). El efecto de estas enzimas en las propiedades físicas, químicas y sensoriales del pan ha sido estudiado extensivamente, y se conoce que su adición en galletas provoca un corte más suave y delgado (Bilgiçli *et al.*, 2007).

3.5.2 Hemicelulasas

Las hemicelulasas son una familia de enzimas que catalizan la degradación de las hemicelulosas (Valdez-Martínez, 2006; Aehle, 2007; Castelucci, 2009). El sistema enzimático que actúa sobre la hemicelulosa contiene hidrolasas que degradan las poliosas (heteropolisacáridos) de la cadena principal y hemicelulasas: β -D-galactosidasas, β -D-manosidasas y β -D-xilosidasas. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glicósidos de bajo peso molecular y cadenas cortas (Spiridon & Popa, 2005). Las hemicelulasas actúan, como en el caso de otras enzimas que degradan polisacáridos, tanto exohidrolíticamente como endohidrolíticamente (Aehle, 2007). La acción de las glicosidasas realiza la hidrólisis total de la hemicelulosa a monosacáridos. Una exoenzima degrada las poliosas a través de sucesivas separaciones de las unidades de mono u oligosacáridos, usualmente del extremo no reductor de la cadena de polisacáridos. Una endoenzima actúa al azar, induciendo múltiples hidrólisis, las cuales se acompañan con un pronunciado descenso del grado de polimerización del sustrato. Finalmente, el polímero es degradado a

monosacáridos y oligosacáridos que no pueden dividirse más (Spiridon & Popa, 2005). Los microorganismos que producen estas enzimas son *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* (Aehle, 2007; Parkin, 2008).

Existe una demanda creciente por estas enzimas, especialmente en la industrialización de productos agrícolas, como los jugos de frutas y las conservas (Mikán-Venegas & Castellanos-Suárez, 2004). Barzana *et al.* (2002) utilizaron diversos tipos de enzimas, entre ellos hemicelulasas y celulasas, para extraer carotenoides de la flor de *Tagetes erecta*, la cual es una fuente significativa de estos colorantes naturales. Se utilizaron este tipo de enzimas ya que se había comprobado que su uso mejoraba el rendimiento y la calidad de algunos productos aceitosos como la canola, el algodón, el girasol, etc. Se observó que el tratamiento enzimático previo al tratamiento mecánico resultó en una mejora de los rendimientos de todos estos productos. Al final de la investigación con la flor *Tagetes erecta*, se encontró que con el tratamiento control (sin enzimas) se obtuvo una recuperación de los carotenoides del 44%, mientras que el rendimiento se incrementó a 97% cuando se mezclaron enzimas marca Vizcozyme y Pectinex, de la casa productora Novo-Nordisk antes de la extracción. Se observó también que al añadir únicamente la enzima Viscozyme, la cual contiene principalmente, hemicelulasas, pectinasas y celulasas la recuperación fue más allá del 45% indicando que hubo modificaciones dentro del tejido celular y que se obtienen buenos rendimientos utilizando diversos tipos de enzimas.

3.6 Tratamientos previos a la utilización de enzimas

Los componentes de las paredes celulares de las plantas son difíciles de extraer o de solubilizar (Kasai *et al.*, 2006), ya que forman una estructura muy compleja (Kasai *et al.*, 2004). Se han aplicado pretratamientos para hacer más efectiva la digestión enzimática en los componentes de las paredes celulares de las plantas, entre los cuales se incluyen el desgrasado, centrifugación, aplicación de vapor, la molienda del material (Arrigoni, 2001),

el autoclavado con agua (Kasai *et al.*, 2004; Kasai *et al.*, 2006) y ácidos (Cuervo *et al.*, 2009).

Kasai *et al.* (2004) realizaron un autoclavado en agua de la harina de okara, el cual es un residuo obtenido del procesamiento de la soya y es una importante fuente de fibra. Posterior al autoclavado se agregaron celulasas. El tratamiento con autoclave por 121 °C por 20 minutos favoreció la digestión enzimática, removiendo las gomas que unen los componentes de la pared celular, pues las paredes celulares crudas del okara no podrían haber sido fácilmente digeridas por la celulasa en una digestión enzimática real (sin aplicación de autoclavado). Los resultados obtenidos por Kasai *et al.* (2006) presentan similitudes con el estudio anterior. Se aplicó un autoclavado en agua (121 °C por 10 min) a granos de café, se realizó un tratamiento enzimático con celulasas y se evaluó su efecto en las paredes celulares. Se comprobó por microscopía que los complejos que forman las paredes celulares fueron removidos y se apreciaron algunos residuos de éstas, los cuales eran muy frágiles. La celulasa no actuó sobre el producto crudo debido a que los adhesivos presentes en la lamela media detuvieron su digestión, pero las células individuales que se forman con autoclave en agua fueron fácilmente digeridas.

3.6.1 Ultrasonido

El uso de ultrasonido en la industria de los alimentos ha sido motivo de investigación y desarrollo desde hace muchos años. Se define como una forma de energía que viaja en ondas de sonido iguales o mayores a 20 000 vibraciones por segundo. Otra definición es cualquier sonido de frecuencia mas allá de lo que el oído humano puede escuchar, por ejemplo, arriba de 16 kHz (Pacheco-Reyes, 2009; Azuola & Vargas, 2007). Aplicando estas frecuencias en un medio líquido, se generan ciclos de expansión, que a su vez forman presiones negativas y burbujas que crecen y colapsan violentamente, dando lugar a un fenómeno de mecánica de fluidos conocido como cavitación (Pacheco-Reyes, 2009,

Londoño-Londoño, 2010). Se ha estimado que la temperatura y presión en estos puntos pueden alcanzar 5 000 °C y 1 000 atm, respectivamente. Sin embargo, las burbujas generadas son muy pequeñas y el calor se disipa al medio en poco tiempo (Özcan, 2006).

En un sistema sólido-líquido, la cavitación puede tener diferentes impactos en la superficie del sólido, causando erosión e incluso agrietamiento de partículas (Pacheco-Reyes, 2009). También se incrementa la penetración del solvente en la superficie del material vegetal y la liberación de los productos intracelulares por rotura de las paredes de la células (Londoño-Londoño, 2010). Bajo estas condiciones se puede desintegrar material fibroso y celulósico en partículas finas, lo cual libera materiales intracelulares tales como el almidón o azúcares. Debido a esto, el ultrasonido se utiliza para obtener material intracelular después de la molienda y para la extracción de algunos compuestos fenólicos de plantas (Novak *et al.*, 2008; Pacheco-Reyes 2009) como, por ejemplo, en cascarilla de cacao (Quiroz-Reyes *et al.*, 2012), bagazo de uva (Rubio & Usaquén-Castro, 2005) y frutos de vainilla (Pacheco-Reyes, 2009), obteniendo resultados satisfactorios.

4. Materiales y métodos generales.

4.1 Determinación de lignina insoluble en ácido o ácido-insoluble

La determinación de lignina ácido insoluble por el método de Klason corresponde al residuo que permanece después de una hidrólisis ácida. Se aplicó el método de lignina Klason propuesto por Gomide & Demuner (1986). A 300 mg de pergamino molido control se le agregaron 3 mL de ácido sulfúrico al 72% para hidrolizar los carbohidratos presentes, se colocó en un baño termostatzado a 20 °C durante 1 h y se agitó continuamente. Posteriormente se diluyó con 84 mL de agua para obtener la concentración de ácido de 4% y se colocó en una autoclave durante 1 h a 120 °C. La lignina Klason se retuvo por filtración en filtros de vidrio poroso previamente llevados a peso constante, se lavó con agua destilada y se secó en estufa hasta peso constante. El residuo obtenido es la lignina Klason Finalmente, los porcentajes de lignina Klason se calcularon por la diferencia de peso entre el filtro antes y después de la filtración.

4.2 Determinación de la fracción soluble e insoluble

Para determinar las fracciones solubles e insolubles presentes en el pergamino se utilizó el método de AOAC 991.43 de fibra total, soluble e insoluble en alimentos (AOAC, 2005a) modificado, el cual se compone de dos partes: digestión enzimática y filtración. La muestra molida y seca fue sometida a una digestión enzimática secuencial, con α -amilasa estable al calor, proteasa y amiloglucosidasa para remover la proteína y el almidón. Luego del tratamiento enzimático, la muestra fue filtrada y sus fracciones separadas. Se hicieron 2 blancos con las muestras para medir alguna contribución de los reactivos al residuo, así como sus respectivas correcciones de cenizas y proteína. La modificación consistió en no corregir la muestra para proteína y ceniza, ya que en esta evaluación lo que se analizó fue el efecto de las enzimas sobre la relación fracción insoluble:fracción soluble.

4.3 Determinación de la capacidad antioxidante

Se realizó el método de ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity, por sus siglas en inglés) para determinar la capacidad antioxidante del pergamino de café. Este método mide la capacidad o la actividad global que tienen todos los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar radicales peroxilo, los cuales son comparables a aquellas Especies Reactivas de Oxígeno que son generadas biológicamente en el organismo. Estos radicales son producidos a partir del compuesto AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro), y reaccionan con fluoresceína como sustrato. El ensayo se basa en medir la pérdida de la fluoresceína debido a su oxidación por acción de un radical peroxilo, e integrar el área bajo la curva de intensidad de fluorescencia a través del tiempo. La capacidad antioxidante del extracto se determina a partir del valor del área bajo la curva, ya que la presencia de antioxidantes retrasa el descenso de la fluorescencia, con lo cual es posible calcular esa capacidad (García *et al.*, 2011). El área bajo la curva generada es comparada con una curva patrón obtenida usando diferentes concentraciones de un análogo de la vitamina E (Trolox) (Huang *et al.*, 2002). Los resultados se expresan en μmol equivalentes de Trolox/100 g.

4.4 Determinación de polifenoles totales

Para la determinación de los polifenoles totales presentes en el pergamino de café y en la galleta de mayor aceptación se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, el cual se usa para medir el contenido de compuestos fenólicos totales en productos naturales (Almajano, 2009). La oxidación de los fenoles, provocada por reactivo de molibdeno y tungsteno, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría con base en una recta patrón de ácido gálico (Almajano, 2009; García *et al.*, 2011).

4.5 Determinación de humedad, ceniza, grasa y proteína

La humedad se determinó por el método AOAC 925.10 (AOAC, 1990a) de determinación de humedad en los alimentos, en el cual se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por evaporación del agua. El pergamino se secó a 70 °C por 3 horas, tiempo en el que se obtuvo peso constante.

La determinación de cenizas fue realizado de acuerdo con el método de la AOAC 923.03 (AOAC, 1990b), que se basa en el residuo seco que se obtiene después de que la muestra del alimento se expone a elevadas temperaturas de ignición y oxidación, siendo éste de naturaleza inorgánica, compuesto por sustancias minerales (Badui, 2005). El pergamino de café se sometió a una temperatura de 500 °C por 5 horas.

La extracción y análisis de grasa se realizó según el método de Soxhlet de AOAC 945.16 (AOAC, 2000). Este método utiliza un extractor Soxhlet, que extrae compuestos de naturaleza lípidica en una muestra través de una extracción cíclica de los componentes solubles en éter que están presentes en un alimento. Mediante ésta técnica se obtienen triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres y carotenoides (Badui, 2005).

Para determinar la proteína en las muestras se utilizó el método de Kjeldahl AOAC 979.09 (AOAC, 2005b), el cual se caracteriza por el uso de ebullición y ácido sulfúrico concentrado que efectúa la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco. El amonio es retenido como bisulfato de amonio y puede ser determinado por titulación (FAO, 1997).

4.6 Autoclavado

El pergamino se autoclavó con una solución buffer citrato pH 4,8, ya que éste sería el medio de incubación de las enzimas celulasas. Se colocaron en un autoclave Tomin

modelo TM-328 frascos de vidrio que contenían una relación pergamino:buffer de 1:2 (15 g de pergamino/30 mL de solución). Los parámetros utilizados fueron: 121 °C de temperatura y presión de 1,5 mmHg a tiempos de 30, 45 y 90 min. También se utilizó ácido fosfórico al 1% (pH 2) por un tiempo de autoclavado de 45 min. El autoclave descompresionó rápidamente (1 min) luego de cada tratamiento. Las muestras pretratadas fueron deshidratadas en una estufa de convección a 70 °C por 5 horas para realizar análisis posteriores.

4.7 Ultrasonido

Con el objetivo de alterar la estructura anatómica del pergamino de café y hacer más accesible el material a las celulasas, se realizó la técnica de ultrasonido al pergamino de café, en una relación peso:volumen de 1:10 (30 g de pergamino/300 mL de agua), obtenido en pruebas preliminares, con diferentes parámetros de potencia y tiempo, los cuales fueron: 44 W/cm² por 5 min, 44 W/cm² por 10 min, 50 W/cm² por 5 min, 50 W/cm² por 10 min y 56 W/cm² por 5 min. El pergamino resultante de los diferentes tratamientos se observó al microscopio y aquel que presentó mayores modificaciones en su estructura anatómica fue incubado enzimáticamente con celulasas.

4.8 Tratamiento con preparado enzimático de celulasas del pergamino pretratado

En el presente estudio se utilizó un tratamiento enzimático con celulasas en el pergamino de café, con el objetivo de poder hidrolizar parcialmente a la celulosa y cambiar su textura, pero sin afectar las propiedades de la fibra dietética, es decir, sin degradarla totalmente.

Se utilizó una enzima comercial, ENZECO® CELLULASE CE-2, con una actividad enzimática reportada de aproximadamente 22 000 unidades de endocelulasa por gramo (ECU/g) por

la casa productora Enzyme Development Corporation. Se agregaron 300 μL de preparado enzimático a las muestras autoclavadas por 30 min y secadas a 70 °C y las que fueron ultrasonificadas a 44 W/cm^2 por 5 minutos. La incubación enzimática se llevó a cabo por 5 h y 24 h a una temperatura de 50 °C y se realizó por triplicado.

4.9 Método enzimático colorimétrico para la determinación de glucosa

Se utilizó el método enzimático colorimétrico para la determinación de glucosa en el líquido sobrenadante de los tratamientos de pergamino autoclavado con buffer citrato pH 4,8 a 30 minutos y el que fue ultrasonificado a 44 W/cm^2 por 5 minutos, sin y con la aplicación de enzimas celulasas por 5 h y 24 h, con el objetivo de identificar presencia de glucosa que indicaría una hidrólisis de la cadena de celulosa a glucosa libre (Quirrasco-Baruch & López Munguía, 2006).

Se colocó en un tubo de ensayo una gota del sobrenadante de ambos tratamientos y una gota de reactivo de glucosa de la casa productora Sigma, con la siguiente composición: Glucosa oxidasa kU/L , peroxidasa 1.2 kU/L , fenol 4.0 mM, estabilizadores y detergentes. Se incubó a 37 °C por 5 minutos para detectar un cambio de color, ya que en presencia de glucosa se forma una quinonaimina roja proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Barham & Trinder, 1972)

4.10 Diseño experimental

Para los análisis físico-químicos realizados en el pergamino de café, se utilizó un diseño de bloques completos al azar. El pergamino se homogenizó de tal forma que no quedaran partículas muy grandes o muy pequeñas en cada muestreo o repetición, que fueron los bloques. Los análisis se realizaron por triplicado. Se evaluó un factor con seis niveles, los cuales fueron los pretratamientos y tratamientos enzimáticos en el pergamino, y las

variables respuesta fueron los porcentajes de fracción soluble e insoluble. Se aplicó un ANDEVA para determinar diferencias significativas entre los niveles.

Para la evaluación del efecto de la adición de pergamino en las galletas sobre la dureza y aceptación en cada uno de los niveles de sustitución, se elaboraron 3 lotes de los 4 tipos de galletas, conteniendo diferentes porcentajes de pergamino. Se aplicó un diseño de bloques completos, donde los bloques fueron los 3 lotes, con 4 tratamientos (4 diferentes porcentajes de pergamino agregado). Cada lote correspondió a diferentes tiempos de muestreo. Para tomar la muestra se homogeneizó el pergamino de café, revolviendo su contenido de tal manera que no predominaran partículas muy grandes o muy pequeñas. De este modo, se tuvo como fuente de variabilidad el lote en cada análisis realizado. Se aplicó un ANDEVA para observar diferencias significativas entre los tipos de galletas y una comparación de medias de Tuckey para la dureza y la determinación de la diferencia mínima significativa (LSD) para la aceptación.

Para la comparación del efecto sobre la dureza y la preferencia de los consumidores en galletas que contenían pergamino molido y sometido a ultrasonido, se utilizó el porcentaje de pergamino mejor evaluado por los consumidores en la prueba de aceptación. Se compararon las dos muestras y se analizaron por medio de una prueba de chi cuadrado, ya que se analizaron 3 categorías. El otro diseño fue de bloques completos al azar, con un factor con dos niveles y 3 bloques (lotes).

5. Efecto de diferentes pretratamientos físico-químicos e incubación enzimática sobre el endocarpio del grano del café

5.1 Resumen

El objetivo de esta investigación fue aplicar diferentes tratamientos al pergamino de café con el fin de alterar la estructura lignocelulósica y poder mejorar el acceso de las enzimas celulasas. Al pergamino sin tratamiento se le realizaron análisis físico-químicos de humedad, ceniza, grasa, proteína, actividad antioxidante, polifenoles totales y fracciones solubles e insolubles. Las fracciones solubles e insolubles se compararon con el pergamino pretratado y tratado enzimáticamente. Los pretratamientos aplicados fueron autoclavado en agua, centrifugado, autoclavado con vapor y ultrasonificación. Posteriormente se aplicaron tratamientos enzimáticos con un preparado celulítico. Se evaluó la estructura microscópica del pergamino pretratado y tratado enzimáticamente. El proceso de autoclavado y posterior tratamiento enzimático no produjo cambios en la fracción insoluble del pergamino ($p > 0,05$). El proceso de ultrasonificación a 44 W/cm^2 por 5 minutos disminuyó la fracción insoluble del pergamino (89,7%) con respecto al pergamino sin ningún tipo de tratamiento (96,5%) ($p < 0,05$). El pergamino ultrasonificado a 44 W/cm^2 por 5 minutos e incubación enzimática por 5 h no produjo cambio en la fracción insoluble (87,8%) ($p > 0,05$) con respecto al mismo tratamiento sin incubación enzimática, pero sí se logró una diferencia significativa en el porcentaje de la fracción insoluble entre los tiempos de incubación enzimática (87,8% a las 5 h y 84,4% a las 24 h) ($p < 0,05$). La evaluación microscópica de la estructura anatómica del pergamino control y el que fue sometido a los pretratamientos y tratamientos con enzimas mostró que en el endocarpio del café la lignina, celulosa y hemicelulosa se encuentran unidos en forma entrelazada que dificulta realizar tratamientos enzimáticos celulíticos.

Palabras clave: Pergamino de café, ultrasonificación, enzimas celulolíticas, microscopía, fibra dietética.

5.2 Introducción

La fibra dietética constituye uno de los grupos de componentes de la dieta y su fuente mayoritaria se encuentra en alimentos como frutas, vegetales, granos enteros y cereales (Wu *et al.*, 2003; Cayo-Álvarez & Matos-Chamorro, 2009). Los componentes de la fibra se han clasificado de varias formas, pero para efectos de su análisis en el laboratorio se han dividido en fibra dietética soluble e insoluble. Dentro de la fibra dietética insoluble se encuentra la celulosa, parte de la hemicelulosa y la lignina, mientras que algunos componentes de la fibra soluble son las pectinas, gomas y mucílagos (Jones, 2002; Escudero & González, 2006; Napolitano *et al.*, 2006). El constituyente mayoritario de la fibra dietética se encuentra en las paredes celulares primarias y secundarias de las plantas y frutos (Cayo-Álvarez & Matos-Chamorro, 2009). Desde la década de los sesenta se ha promovido la importancia de ingerir fibra dietética en la dieta, lo cual ha contribuido a la realización de estudios que han demostrado sus efectos benéficos sobre la salud (Escudero & González, 2006; Valdez-Martínez, 2006). Existe un gran interés en desarrollar ingredientes con fibra dietética para la elaboración de alimentos, los cuales tienen un gran potencial en el mercado (Clark & Johnson, 2002; Wong & Cheung, 2005; Galdeano & Grossmann, 2006). Algunas fuentes de fibra que han sido utilizadas para elaborar productos de panadería de buena calidad son: salvado de trigo, cáscaras de tomate, cáscara de semilla de girasol (Grigelmo-Miguel *et al.*, 2001), pulpa de naranja (Martínez *et al.* 2008), orujo de uva (Canett-Romero *et al.*, 2004) y la cascarilla de avena (Galdeano & Grossmann, 2006). El endocarpio del grano del café, o pergamino de café (Avallone *et al.*, 2001), que es un subproducto del beneficiado del café, posee gran cantidad de fibra dietética, principalmente insoluble, con contenidos de celulosa entre 40-49%, de hemicelulosa entre 25-32% y de lignina entre 33-35% (Bekalo & Reinhardt, 2010), por lo que podría utilizarse como fuente de fibra. Sin embargo, el uso de fibra insoluble como ingrediente de productos alimenticios es limitado debido a su baja aceptación sensorial (Sriwattana *et al.*, 2008). Los componentes de la fibra insoluble y, por consiguiente, los

que aportan la rigidez a las paredes celulares como la celulosa y hemicelulosa, pueden ser hidrolizados por enzimas como las celulasas y hemicelulasas, que provocan una despolimerización, en mayor o menor grado, que resulta en cambios en las propiedades del material (Kim *et al.*, 2005). Los componentes de las paredes celulares de las plantas son difíciles de extraer o de solubilizar (Kasai *et al.*, 2006), debido a su estructura compleja (Kasai *et al.*, 2004). La lignina se encuentra envolviendo a la celulosa y hemicelulosa (Segura *et al.*, 2007; Ortiz 2009) y forman una matriz (Ortiz, 2009) que impide la hidrólisis enzimática microbiana de estas últimas (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006). Se han aplicado pretratamientos para hacer más efectiva la digestión enzimática de los componentes de las paredes celulares de las plantas, entre los cuales se incluyen la centrifugación, aplicación de vapor, la molienda del material (Arrigoni, 2001) y el autoclavado con agua (Kasai *et al.*, 2004). El uso de ultrasonido se ha utilizado para modificar y el desintegrar material lignocelulósico (Londoño-Londoño, 2010). Con estos pretratamientos, los complejos celulares se dispersan y degradan; además, hay un adelgazamiento y descomposición de la estructura de la pared celular, provocando una liberación de compuestos como glucosa, almidón, galactosa, entre otros (Kasai *et al.*, 2006). Por lo que la composición del pergamino de café es principalmente fibra dietética insoluble, en esta investigación se aplicaron diferentes pretratamientos con el fin de establecer el más eficaz según su capacidad de modificar su estructura anatómica y facilitar un tratamiento enzimático posterior.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Preparación de las muestras

El endocarpio o la cubierta de la semilla del café (pergamino), se obtuvo de un beneficio ubicado en Zarcero, en la provincia de Alajuela en Costa Rica, y se almacenó en recipientes de plástico limpios y desinfectados a una temperatura de congelación de -18 °C.

Posteriormente se molió utilizando un molino de martillos con una malla de 0,33 mm de diámetro, y se almacenó en recipientes de vidrio, a temperaturas de refrigeración, entre 4 y 7 °C.

5.3.2 Evaluación físico-química del pergamino sin tratamiento

Se realizó una evaluación físico-química del pergamino de café molido sin ser sometido a ningún tipo de tratamiento, con el objetivo de conocer sus componentes, y las cantidades de cada uno de éstos.

5.3.2.1 Determinación de lignina insoluble en ácido, ácido-insoluble o lignina Klason

Se aplicó el método de lignina Klason propuesto por Gomide & Demuner (1986), y que corresponde al residuo que permanece después de una hidrólisis ácida.

5.3.2.2 Determinación de la fracción soluble e insoluble

Para determinar las fracciones solubles e insolubles presentes en el pergamino se utilizó el método modificado de AOAC 991.43 de fibra total, soluble e insoluble, en alimentos (AOAC, 2005a). La modificación consistió en no corregir la muestra para análisis de proteína y ceniza, ya que en esta evaluación lo que se analizó fue el efecto de las enzimas sobre la relación fracción insoluble:fracción soluble

5.3.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del pergamino de café se determinó por el método de la capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). Este método se basa en medir la pérdida de fluorescencia debido a la oxidación por acción de un radical peróxido, e integrar el área bajo la curva de intensidad de fluorescencia a través del tiempo (García *et al.*, 2011).

5.3.2.4 Determinación de humedad, ceniza, grasa y proteína

La humedad se determinó por el método de AOAC 925.10 (AOAC, 1990a). El pergamino se secó a 70 °C por 3 horas, tiempo en el que se obtuvo peso constante. La extracción y análisis de grasa se realizó según el método de Soxhlet de AOAC 945.16 (AOAC, 2000). La evaluación de cenizas fue realizada con el método de la AOAC 923.03 (AOAC, 1990b), para lo cual el pergamino de café se sometió a una temperatura de 500 °C por 5 horas. Para cuantificar la proteína presente en la muestra se utilizó el método de Kjeldahl AOAC 979.09 (AOAC, 2005b).

5.3.2 Pretratamientos físico-químicos aplicados al pergamino de café molido

Con el fin de tratar de alterar la disposición de la matriz del pergamino y lograr el mayor acceso de las enzimas a la estructura lignocelulítica, se le realizaron diferentes pretratamientos físico químicos.

5.3.2.1 Autoclavado

El pergamino molido y una solución buffer citrato pH 4,8 se colocaron en frascos de vidrio en una relación de pergamino:líquido de 1:2 (15 g de pergamino/30 mL de solución). Posteriormente las muestras se introdujeron en una autoclave Tomin modelo TM-328. El equipo fue programado a una temperatura de 121 °C y presión de 1,5 mmHg a tiempos de 30, 45 y 90 min. También se utilizó ácido fosfórico al 1% (pH 2) por un tiempo de autoclavado de 45 min. El autoclave utilizado descompresionaba en 1 minuto luego de finalizado los tratamientos. Las muestras obtenidas fueron deshidratadas en una estufa de convección a 70 °C por 5 horas para realizar análisis posteriores.

5.3.2.2 Centrifugado

Se tomaron 3 g de la muestra de pergamino molido y 3 g de muestra que fue autoclavada por 30 minutos y se colocaron en un tubo de centrifuga con capacidad para 20 mL. Posteriormente se agregaron 5 mL de agua en cada tubo, los cuales se centrifugaron en una centrifuga Adams Dynac Número AJ 6717, a 4000 g por 5 minutos.

5.3.2.3 Autoclavado en vapor

Se colocaron 15 g de pergamino molido en bolsas elaboradas con tela de algodón para el tratamiento de autoclavado con vapor, de manera que las partículas de pergamino no se dispersaran y se perdieran durante la descompresión. Las condiciones del autoclavado fueron: temperatura de 121 °C, presión de 1,5 mmHg, tiempo de 45 min y tiempo de descompresión en 1 min.

5.3.2.4 Ultrasonido

El pergamino de café molido se colocó en beakers de vidrio y se agregó agua. Se utilizó una relación peso:volumen de 1:10 (30 g de pergamino/300 mL de agua). La suspensión se agitó y se colocó dentro de un equipo ultrasónico Misonix Ultrasonic Liquid Processor modelo S4000, y se aplicaron los siguientes tratamientos 44 W/cm² por 5 min, 44 W/cm² por 10 min, 50 W/cm² por 5 min, 50 W/cm² por 10 min y 56 W/cm² por 5 min.

5.3.3 Tratamiento con preparado enzimático de celulasas del pergamino pretratado

El preparado enzimático utilizado fue ENZECO® CELLULASE CE-2, con una actividad enzimática reportada por la casa productora Enzyme Development Corporation de aproximadamente 22 000 unidades de endo celulasa por gramo (ECU/g). A las muestras autoclavadas por 30 min (15 g pergamino/30 mL de solución buffer citrato pH 4,8) se les agregó 300 µL de preparado enzimático.

El pergamino resultante del ultrasonido a 44 W/cm² por 5 minutos se secó a 70 °C. Posteriormente se pesó 15 g, se añadió 30 mL de disolución buffer citrato pH 4,8 y 300 µL de preparado enzimático. La incubación enzimática se llevó a cabo por 5 y 24 h a una temperatura de 50 °C y se realizó por triplicado.

5.3.4 Determinación de las fracciones solubles e insolubles del pergamino pretratado y tratado enzimáticamente

Las fracciones solubles e insolubles se determinaron al pergamino autoclavado en disolución buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos, y posterior tratamiento enzimático por 5 y 24 horas y a las muestras ultrasonificadas a 44 W/cm² por 5 minutos, y sus posteriores

incubaciones enzimáticas a las 5 h y 24 h. Las muestras fueron sometidas a una digestión enzimática con α -amilasa estable al calor, proteasa y amiloglucosidasa para remover la proteína y el almidón. Luego del tratamiento enzimático, las muestras se filtraron y se separaron sus fracciones. Se hicieron 2 blancos con las muestras para medir alguna contribución de los reactivos al residuo. La modificación consistió en no corregir la muestra para proteína y ceniza, ya que lo que se analizó fue el efecto de las enzimas sobre la relación fracción insoluble:fracción soluble.

5.3.5 Evaluación de la estructura microscópica del pergamino

Con el objetivo de apreciar y describir los cambios en las fibras que conforman la estructura del pergamino de café con los pretratamientos y tratamientos con enzimas, se utilizó un microscopio óptico trinocular Eclipse E 400, de la casa fabricante Nikon, con objetivos de 4X y 10X. Se observaron todos los pretratamientos y tratamientos enzimáticos mencionados en la sección 3. En el caso del pergamino tratado con ultrasonido, únicamente se visualizaron los sometidos a una potencia de 50 W/cm² por 10 min, 44 W/cm² por 5 min, y este último además con 5 h y 24 h de incubación enzimática. Se colocaron las muestras y el líquido sobrenadante de los pretratamientos y tratamientos en una lámina portaobjetos, de forma que no quedaran partículas una sobre la otra, y se cubrieron con un cubreobjetos. Para la muestra de pergamino únicamente molido y el autoclavado en vapor, se agregó agua con un gotero en el portaobjetos para humedecer las muestras. Las tomas microscópicas fueron descargadas a una computadora con el software Nikon NIS.

5.3.6 Método enzimático colorimétrico para la determinación de glucosa

Se utilizó el método enzimático colorimétrico para la determinación de glucosa en el líquido sobrenadante de los tratamientos de pergamino autoclavado con buffer citrato pH

4,8 a 30 minutos y el que fue ultrasonificado a 44 W/cm^2 por 5 minutos, sin y con la aplicación de enzimas celulasas por 5 y 24 h, con el objetivo de identificar presencia de glucosa, que indicaría una hidrólisis de la cadena de celulosa a glucosa libre (Quirrasco-Baruch & López Munguía, 2006). Se mezclaron e incubaron a una temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ una gota de ambos tratamientos con una gota de reactivo de glucosa de la casa productora Sigma, para detectar un cambio de color, ya que en presencia de glucosa se forma una quinonaimina roja proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Barham & Trinder, 1972).

5.3.6 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, que corresponden a los bloques. Se evaluó un factor con seis niveles (véase **Cuadro 5.2**), y las variables respuesta fueron los porcentajes de fracción soluble e insoluble. Se aplicó un ANDEVA para determinar diferencias significativas entre los niveles.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Análisis físico químico del pergamino de café

Los resultados de los análisis físico-químicos del pergamino de café se muestran en el **cuadro 5.1**. El porcentaje de lignina ácido insoluble presente en el pergamino de café fue de 25,30%. El contenido de lignina fue similar a los obtenidos por Braham y Bresani (1979), quienes reportan 24,40%, y diferente al registrado por Bekalo y Reinhardt (2010) que afirman que el contenido es de 33-35%. Negesse *et al.* (2009) y Ramírez-Martínez (2012) aseveran que este subproducto se compone principalmente de lignina.

La determinación de las fracciones solubles e insolubles del pergamino por medio de la modificación del método enzimático gravimétrico de la fibra dietaria mostró que el pergamino presentó 96,5% de fracción insoluble y 3,7% de fracción soluble. En otros estudios se reporta que el pergamino contiene grandes cantidades de celulosa y hemicelulosa (Murty & Naidu, 2012), constituyendo un 98% del pergamino (Bekalo & Reinhardt, 2010). La mayoría de literatura referente al pergamino expone información sobre sus compuestos insolubles, no así los solubles, por lo que esta información resulta muy útil para otras investigaciones sobre el pergamino de café.

Cuadro 5.1. Caracterización físico-química del pergamino de café en base seca.

Determinación	Cantidad
Lignina ácido insoluble (g/100 g)	25,30±0,04
Fracción soluble (g/100 g)*	3,7±0,3
Fracción insoluble (g/100 g)*	96,5±0,5
Actividad antioxidante (μmol TE/100 g)	1 239±2
Polifenoles totales (mg ácido gálico/100 g)	No detectados (<3,02 mg/g)
Humedad (g/100 g)	7,6±0,1
Cenizas (g/100 g)	0,710±0,002
Grasa (g/100 g)	No detectada
Proteína (N x 6,25) (g/100 g)	2%±0

Los valores son el promedio ±desviación estándar de triplicados *Fracciones resultantes después de la digestión enzimática de método de fibra dietaria.

A pesar de que no se detectó la presencia de polifenoles en el pergamino, este presentó una actividad antioxidante de 1 239 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$, por lo que esta propiedad puede ser atribuida a compuestos no fenólicos presentes en el café, como la cafeína, ya que estudios recientes demuestran que posee actividad antioxidante (Pérez-Hernández *et al.*, 2012). Adicionalmente, se afirma que el pergamino posee pequeñas cantidades de polifenoles Milkjovick *et al.* (2010), y presumiblemente no fueron detectados por el método utilizado para su determinación, en caso que estuvieran presentes. Negesse *et al.* (2009) refieren que el pergamino de café presenta altas concentraciones de compuestos fenólicos en el procesamiento en seco. El pergamino evaluado en este estudio fue sometido al procesamiento en húmedo, que es el que se utiliza en Costa Rica para obtener el café en grano comercializable (Adams & Ghaly, 2007). Lo anterior puede explicarse por el hecho de que el agua utilizada para lavar el grano de café arrastre compuestos fenólicos, ya que algunos de ellos exhiben hidrosolubilidad (Quiñones *et al.*, 2012), por lo que el tipo de procesamiento podría haber influido en el contenido de polifenoles totales en el pergamino.

La humedad del pergamino del café encontrado en el presente estudio fue de 7,6%. Valores similares fueron encontrados por Braham y Bressani (1979). El contenido de ceniza en el presente estudio fue de 0,71%, mientras que otros autores reportan un rango entre 0,5-1% (Braham & Bressani, 1979; Bekalo & Reinhardt, 2010). En cuanto a la grasa, no fue detectada en el pergamino de café en esta investigación y otros autores (Braham & Bressani, 1979) reportan que el porcentaje en este subproducto es de 0,6%, lo que indica que presenta muy poca materia grasa. Se encontró un 2% de proteína en el pergamino. Braham y Bressani (1979) refieren que el pergamino posee 0,29% de nitrógeno, lo que equivaldría a 1,80% de proteína.

5.4.2 Estructuras microscópicas del pergamino de café con pretratamientos

El análisis microscópico del pergamino sometido únicamente a molienda, se aprecia en la **Figura 5.1**. Las fibras que conforman el pergamino son muy complejas, presentando formas de redes, ya que se pudo visualizar estructuras entrelazadas una sobre otra. Resultados similares fueron reportados por Ramírez-Martínez (2012). Esta disposición de fibras entrelazadas implica que hay que separar dos barreras de fibra para hacer más accesible la estructura al ataque enzimático. Se apreciaron algunas fibras liberadas de la matriz lignocelulósica, lo que pudo deberse al efecto de la molienda, ya que esta produce reducción y ruptura del tamaño de las partículas (Delgenes *et al.*, 2003). Sin embargo, la matriz fibrosa no se vio afectada considerablemente por esta técnica.

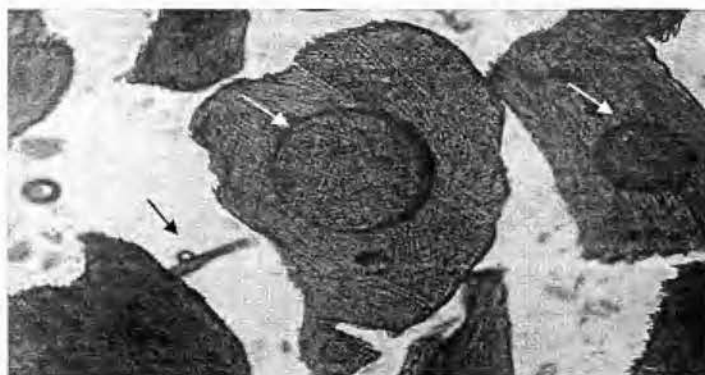


Figura 5.1. Microscopía anatómica del pergamino de café molido. Flechas blancas señalan burbujas de aire infiltradas en las muestras. Flecha azul indica una fibra liberada. 10X.

La **Figura 5.2** muestra la visualización microscópica del pergamino de café molido sometido a centrifugación por 5 minutos, en la cual se observaron fibras liberadas y con forma alargada, que indicó que el centrifugado separó las fibras individuales de la estructura fibrosa del pergamino (que probablemente se liberaron con la molienda). Sin embargo, se conservaron muchas estructuras que forman redes de fibras, como en el pergamino sometido solo a molienda.



Figura 5.2. Fibra de pergamino de café molido sin autoclavar sometido a posterior centrifugación por 5 minutos. 20X.

La observación microscópica del pergamino de café autoclavado en la solución buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos y sin ningún tratamiento posterior mostró fibras alargadas separadas de la estructura fibrosa del pergamino (**Figuras 5.3 A, B, C**). Se aprecian también restos de parénquima entre las fibras individuales (flechas), lo que indicó que este tejido celular se desintegró con el tratamiento. El parénquima es el tejido simple y el tipo básico de la célula diferenciada (Flores-Vindas, 1999). Las células del parénquima tienen una pared celular primaria delgada y poseen poca celulosa. El parénquima sufrió lisis celular con el autoclavado, ya que carece de la rigidez que aporta la celulosa (Izco *et al.*, 2004). Aunque hubo liberación de fibras, la estructura en forma de red se mantuvo (**Figura 5.3D**), por lo que el tiempo de autoclavado a los 30 minutos tampoco produjo una liberación total de las fibras.

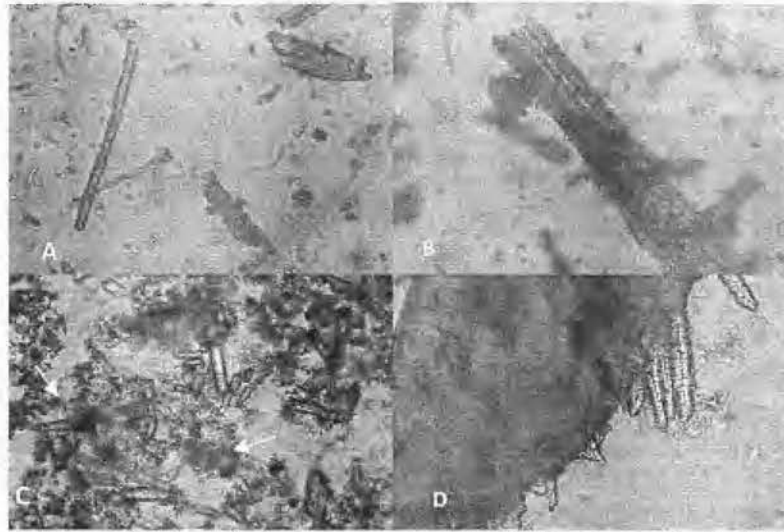


Figura 5.3. Microscopia de pergamino de café autoclavado en solución buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos. (A) Fibras de pergamino liberadas. 20X. (B). Aproximación de fibra de pergamino. 20X. (C). Fibras de pergamino y restos de parénquima, indicados por las flechas 10X. (D) Estructura fibrosa con fibras individuales parcialmente liberadas. 10X.

En el pergamino autoclavado con solución buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos y posteriormente centrifugado por 5 minutos se pudo apreciar fibras libres (**Figura 5.4A**).

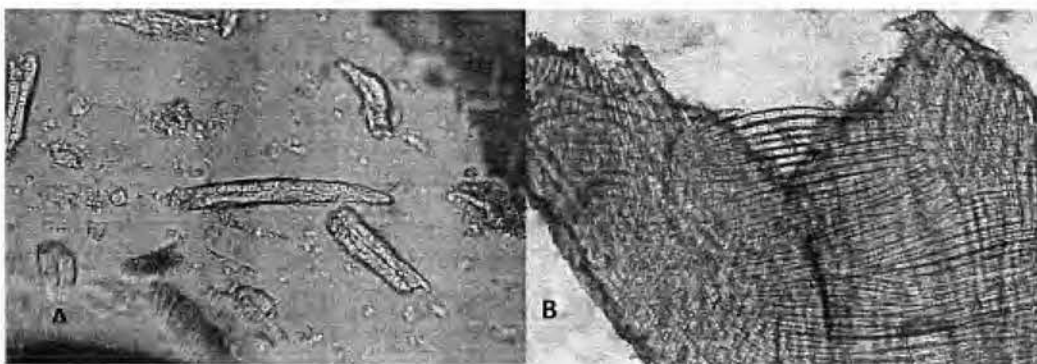


Figura 5.4. Fotografía microscópica del pergamino de café autoclavado con buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos y posteriormente centrifugado por 5 minutos. (A) fibras libres. Vista 10X. (B) Fibras que no fueron liberadas en su totalidad. 4X.

Lo anterior podría indicar que el autoclavado y posteriormente la centrifugación liberaron parcialmente las fibras de la matriz. En la **Figura 5.4B** se observan fibras que no se liberaron completamente de la matriz.

En el pergamino de café sometido a un autoclavado con solución buffer fosfato 4, 8 por 90 minutos también se observaron restos de parénquima (**Figura 5.5**) y fue similar al tratamiento por 30 minutos, pues las fibras en forma de red permanecieron.



Figura 5.5 Microscopia del pergamino de café después de haber sido sometido a un autoclavado con solución buffer citrato pH 4, 8 por 90 minutos. Flecha indica fibras sueltas y restos de parénquima. 10X.

Al autoclavar el pergamino de café con ácido fosfórico al 1% por 45 minutos, no se observaron fibras liberadas de la estructura de pergamino y se mantuvieron las fibras en forma de red (**Figura 5.6**). Se utilizó el ácido fosfórico al 1% ya que es usual que se utilicen ácidos para mejorar el acceso de las enzimas a la celulosa (Cuervo *et al.*, 2009, Cardona-Alzate y Orrego-Alzate, 2009), lo cual no fue efectivo en el pergamino. Adicionalmente, el porcentaje de ácido fue bajo ya que el pergamino se utilizaría en la elaboración de un producto alimenticio.



Figura 5.6 Vista microscópica de pergamino de café luego de un autoclavado en ácido fosfórico al 1% por 45 minutos. 4X.

La **Figura 5.7** presenta el pergamino de café cuando se sometió al contacto con vapor de agua por 30 minutos. Se pretendió con este método simular la técnica de “puff explosion” o explosión con vapor, que rompe las estructuras por la rápida descompresión interna que se genera por diferencias de presión; sin embargo, el equipo disponible no permitió cumplir con esta expectativa.



Figura 5.7 Estructura vista al microscopio del pergamino de café sometido a vapor de agua por 30 minutos. 4X.

Se observa que el autoclavado con vapor no produjo ningún cambio en la estructura de las fibras que conformaban el pergamino de café, ya que éstas no se liberaron de la matriz y presentó una apariencia similar a la del pergamino molido sin ningún tratamiento posterior. Por lo tanto, se descartó este método como una alternativa de pretratamiento a la incubación enzimática.

En cuanto a los tratamientos utilizando ultrasonido, se apreció una liberación parcial de fibras, aunque las estructuras grandes que contenían la red fibrosa permanecieron (**Figura 8**), independientemente de la potencia aplicada y el tiempo de ultrasonido. En la **Figura 5.8A** se muestra el tratamiento a 44 W/cm^2 por 5 min y la **Figura 5.8B** representa el tratamiento a 50 W/cm^2 por 10 min, no apreciándose diferencias en cuanto a la liberación de sus fibras.

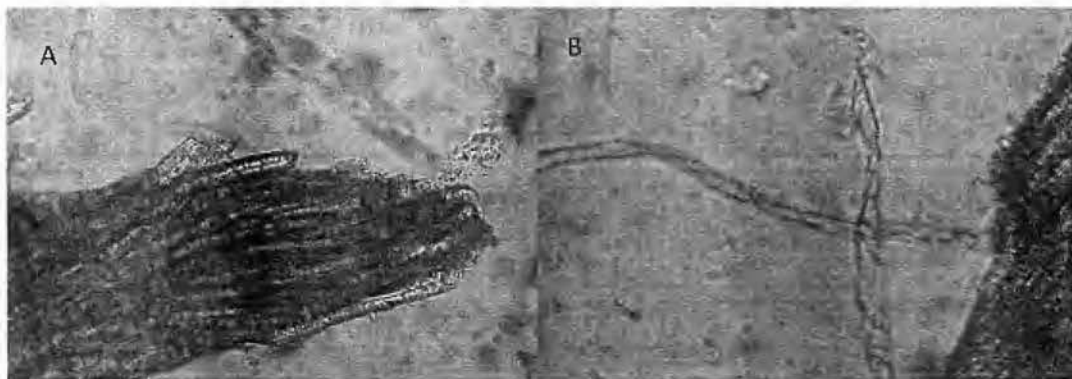


Figura 5.8. Pergamino de café sometido a ultrasonificación. (A). Aplicación de una potencia de 44 W/cm^2 por 5 minutos. (B). Tratamiento de 50 W/cm^2 de potencia por 10min. 4X.

Se apreció tejido parenquimatoso liberado en los tratamientos con ultrasonido (**Figura 5.9**). En los frascos de almacenamiento se observó una capa turbia que flotaba por encima del pergamino, lo que no ocurrió en los tratamientos donde no se aplicó ultrasonido. Posiblemente hubo lisis celular debida al ultrasonido, ya que este tejido posee una pared celular delgada (Izco *et al.*, 2004)



Figura 5.9 Parénquima liberado durante el tratamiento con ultrasonido, indicado por el círculo. Potencia 44 W por 5 minutos. 4X.

5.4.3 Estructura microscópica del pergamino pretratado e incubado con preparados celulíticos

En los tratamientos del pergamino de café autoclavado en solución buffer citrato 4,8 por 30 minutos, y sometido luego por 5 y 24 horas a incubación enzimática con celulasas, se observó un desprendimiento parcial de una capa celular de fibras del pergamino.

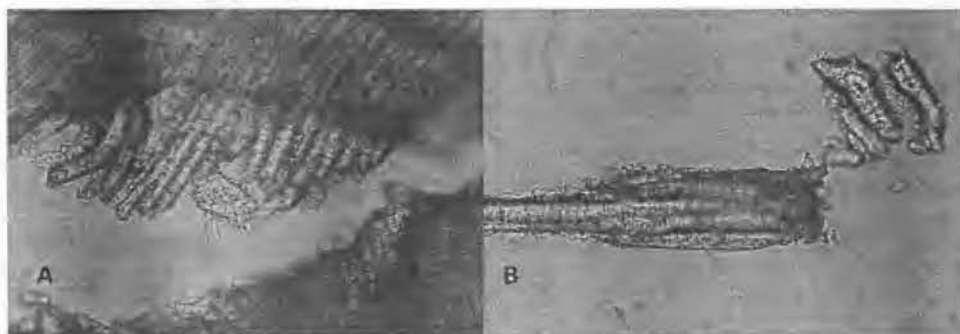


Figura 5. 10 Pergamino de café molido y autoclavado en solución buffer citrato 4,8 por 30 minutos, y posterior incubación enzimática con celulasas por 24 horas (A) Fibra de pergamino con capas celulares en forma de red (20X). (B) Fibra de pergamino liberada (20X).

Por lo tanto, se presenta únicamente la estructura anatómica del pergamino autoclavado e incubado por 24 horas (**Figura 5.10A**), en donde se apreciaron fibras libres (**Figura 5.10B**), aunque la mayoría del material conservó su estructura original.

En los pretratamientos del pergamino de café sometido a una potencia de 44 W/cm^2 por 5 min y posterior incubación enzimática con celulasas a las 5 h (**Figura 5.11A**) y 24 h (**Figura 5.11B**) se apreciaron fibras sueltas liberadas de la matriz.

Por medio de la observación de las fibras liberadas, se pudo apreciar que el tipo de fibras que presentó el pergamino eran fibroescleroides, que se aprecian en las **Figuras 5.12A y 5.12B**, y que pertenecen al tejido esclerénquima, formado por células de paredes gruesas, secundarias, duras, elásticas y lignificadas (Flores-Vindas, 1999; Izco *et al.*, 2004) que proporcionan resistencia a los órganos de las plantas (Flores-Vindas, 1999). La observación microscópica permitió determinar que la estructura en forma de red fue casi inalterable.



Figura 5. 11 Pergamino de café sometido a ultrasonificación a una potencia de 44 W/cm^2 por 5 minutos y posteriores incubaciones enzimáticas con celulasas. (A) Incubación por 5 horas, (B) Incubación por 24 horas. 10X

Con la información anterior se concluye que el pergamino posee una estructura compleja y difícil de alterar debido a la presencia de las fibroescleroides, las cuales son células de

gran rigidez, que no permitieron la modificación de las fibras con los tratamientos aplicados en este estudio, pero que fueron liberadas en cierto grado con la aplicación de algunos pretratamientos y tratamientos enzimáticos.

Además de la presencia de esclereidas, la naturaleza de los componentes de la lamela media también influyó en la ineficacia de los tratamientos para liberar una mayor cantidad de fibras. La laminilla media es una capa que une las paredes primarias de dos células contiguas (Bohórquez-Santana, 2011). Se ha evidenciado que el calcio se une en la lamela media al ácido poligalaturónico, formando pectatos que permiten una elevada cohesión entre las células (Gómez-Calabrano & Mora-Chesta, 2004). Es de naturaleza principalmente péctica, pero a menudo en las células más viejas se lignifica (Bohórquez-Santana, 2011).

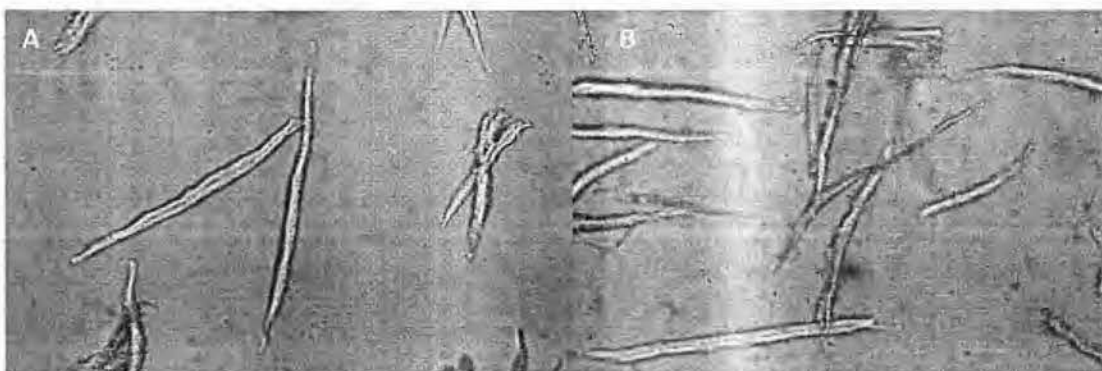


Figura 5. 12 Microscopía de las fibroesclereidas del pergamino de café. (A). Fibras obtenidas del tratamiento autoclavado en solución buffer fosfato pH 4,8 por 90 minutos (B). Fibras liberadas con el tratamiento ultrasónico a 50 W/cm² por 10 minutos. 10X

5.4.4 Evaluación físico-química del pergamino de café sometido a varios tratamientos e incubado con un preparado celulítico

La fracción insoluble del pergamino molido y sin ningún tratamiento posterior fue de 96,5±0,5 y la fracción soluble fue de 3,7±0,3.

La fracción soluble en los tratamientos con autoclavado no fue detectada (**Cuadro 2**), lo que pudo deberse a la exposición de estos compuestos a altas temperaturas y tiempos largos que los degradaron. Según Dávila *et al.* (2012), las pectinas, que forman parte de la fibra soluble, pueden degradarse a temperaturas sobre 100 °C y a tiempos prolongados.

Cuadro 5.2. Porcentaje de las fracciones solubles e insolubles del pergamino de café sometido a diferentes pretratamientos e incubación enzimática.

Tratamiento	Fracción insoluble ¹ (%)	Fracción soluble ¹ (%)
Molido	96,5±0,5a*	3,7±0.3
Autoclavado pH 4,8 por 30 minutos	95,8±0,3ab	No detectada
Autoclavado pH 4,8 30 minutos y posterior incubación por 5 horas con preparado celulítico	94,1±1ab	No detectada
Autoclavado pH 4,8 30 minutos y posterior incubación por 24 horas con celulasas	94,6±0,5b	No detectada
Ultrasonificación a 44 W/cm ² por 5 minutos	89,7±0,9c	No detectada
Ultrasonificación a 44 W/cm ² por 5 minutos y posterior incubación con celulasas por 5 horas	87,8±2,2c	No detectada
Ultrasonificación a 44 W/cm ² por 5 minutos y posterior incubación con celulasas por 24 horas	84,4±1,0d	No detectada

Los valores son el promedio ± desviación estándar de triplicados *Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). ¹Fracciones resultantes de la digestión enzimática para fibra dietaria.

Como se puede observar en el **Cuadro 5.2**, la fracción insoluble no varió ($p>0,05$) para el tratamiento con autoclavado con buffer citrato pH 4,8 por 30 minutos (95,8%) y posterior incubación por 5 horas con celulasas (94,1%) con respecto al pergamino sin ningún tipo de tratamiento (96,5%). La incubación enzimática por 24 h no produjo cambios en la fracción insoluble 94,6% con respecto a la incubación por 5h ($p>0,05$), aunque sí hubo una diferencia con respecto al pergamino sin autoclavar (96,5%) ($p<0,05$).

El efecto de la temperatura sobre la fracción insoluble es muy diferente a lo que ocurre con la soluble. Soto *et al.* (2010) encontraron que la temperatura a la cual se descompuso la celulosa y la hemicelulosa en madera de pino fue de 347 °C y 315 °C, respectivamente. Esto explica porque no hubo cambio de la fracción insoluble (dentro de la que se encuentra la celulosa, hemicelulosa y lignina) aún con tratamientos de autoclavado a 121 °C y presión de 1,5 mmHg. Esto podría deberse a la forma en que los componentes de la fibra insoluble se encuentran estructurados dentro de las vegetales, en donde la lignina, que es indigerible por completo, se encuentra envolviendo a la celulosa y hemicelulosa (Segura *et al.*, 2007; Ortiz, 2009) formando una matriz (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006; Ortiz, 2009) que restringe al acceso a los dos últimos componentes (Segura *et al.*, 2007), protegiéndolos de la hidrólisis enzimática microbiana (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006).

El proceso de ultrasonicación a 44 W/cm² por 5 minutos produjo un efecto sobre la fracción insoluble del pergamino (89,7%) con respecto al pergamino molido sin ningún tratamiento (96,5%, $p<0,05$). Sin embargo, el tratamiento enzimático por 5 horas (87,8%) no logró disminuir el porcentaje de la fracción insoluble ($p>0,05$), con respecto a solamente la aplicación de ultrasonido.

La aplicación de ultrasonido a 44 W/cm² por 5 minutos y posterior incubación enzimática durante 24 horas logró disminuir la fracción insoluble (84,4%) con respecto al mismo tratamiento ultrasónico con 5 horas de incubación enzimática (87,8%) ($p<0,05$). Como

puede observarse en la **Figura 5.8**, el tratamiento de sonicación produjo una liberación parcial de fibras, lo que podría haber permitido que durante el tratamiento enzimático por 24 horas se lograra alguna accesibilidad de las celulasas a la celulosa, produciendo a su vez una liberación parcial de fibras (**Figura 5.11B**).

La prueba enzimática colorimétrica de glucosa fue positiva en el líquido sobrenadante de los tratamientos con ultrasonido a 44 W/cm^2 por 5 minutos y posteriores incubaciones enzimáticas a las 5 h y 24 h, ya que hubo cambio de color café a rosa intenso, lo que indicó que el tratamiento previo con ultrasonido ejerció un efecto parcial sobre la liberación de la lignina que rodea la celulosa, permitiendo el acceso de las celulasas a la cadena de celulosa del pergamino, hidrolizándola y produciendo moléculas individuales de glucosa (Quirrasco-Baruch & López Munguía, 2006; Kilara & Desai, 2002), la cual fue oxidada por la glucosa oxidasa presente en el reactivo del kit enzimático. La oxidación produce peróxido de hidrógeno, el cual a la vez se mide por la oxidación de un cromógeno (Barham & Trinder, 1972).

5.4.3 Conclusiones

El análisis de fracciones solubles e insolubles mostró que el uso de ultrasonido y posterior incubación enzimática logró la mayor reducción en cantidad de fracción insoluble. Sin embargo, ninguno de los tratamientos realizados en la presente investigación fue efectivo para liberar en su totalidad las fibras individuales de la estructura del pergamino del café, lo que pudo estar influenciado por su estructura anatómica, la presencia de fibras esclerotizadas, altamente rígidas y resistentes. Se concluye que el pergamino de café es un material con contenido alto en fibra dietética insoluble, con fibras ordenadas en forma de red y un 25% de lignina, que imposibilita la digestión enzimática. Además, sus fibras esclerotizadas, altamente resistentes y rígidas le proporcionan protección contra los tratamientos físicos o químicos estudiados.

5.5 Referencias.

- Adams, M. & Ghaly, A.E.. 2007. Maximizing sustainability of the Costa Rican coffee industry. *Journal of Cleaner Production* 15: 1716-1729.
- AOAC. 1990a. Official Methods of Analysis. 925.10. Moisture in flour-air oven methods. AOAC International.
- AOAC. 1990b. Official Methods of Analysis. AOAC 923.03. Determination of ash in foods. methods. AOAC International.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 945.16. Crude fat. AOAC International.
- AOAC. 2005a. Official Method 991.43 Total, soluble, and insoluble dietary fiber in Foods. AOAC International.
- AOAC. 2005b. Official Methods of Analysis. 979.09. Protein in grain: Kjeldahl Method. International.
- Arrigoni, E. 2001. Enzymatic modification of dietary fiber sources. En: Cho, S.S (editor) *Handbook of Dietary Fiber*. Marcel Dekker, Inc.
- Avallone, S., Guiraud, J.P., Guyot, B., Olguin, E. & Brillouej, M. 2001. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5556-5559.
- Barham, D. & Trinder, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97:142.
- Bekalo, S.A. & Reinhard, H.W. 2010. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. *Materials and structures* 43(8): 1049-1060.
- Bohórquez-Santana, W. 2011. Papel de la interacción de calcio y boro en el ennegrecimiento de los pétalos en rosa (*Rosa sp.*). Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar el título de Magister en Ciencias Agraria-Fisiología de cultivos. Universidad Nacional de Colombia.

- Braham, J.E. & Bressani, R. 1979. Coffee Pulp:Composition, technology, and utilization. Institute of Nutrition of Central America and Panama. Canada.
- Canett-Romero, R., Ledesma-Osuna, A. I.; Robles-Sánchez, R.M., Morales-Castro, R., León-Martínez, L. & León-Gálvez, R. 2004. Caracterización de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 54(1): 93-99.
- Cardona-Alzate, .C.A. & Orrego-Alzate, C.E. 2009. Avances investigativos en la producción de biocombustibles. Universidad Nacional de Colombia. ISBN: 978-958-44-5261-0.
- Cayo-Álvarez, E. & Matos-Chamorro, A. 2009. Obtención de fibra insoluble a partir de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*). Revista de Investigación Universitaria 1(1): 25-30.
- Clark, R. & Jhonson, S. 2002. Sensory acceptability of foods with added Lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel fiber using pre-set criteria. Journal of Food Science 67(1): 356-362.
- Cuervo, L., Folch, J.L. & Quiroz, R.S. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. BioTecnología 13(3): 11-25.
- Dávila, G. & Vázquez-Duhalt, R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico 30: 29-55.
- Dávila, I.C.A., Rivera, M.A.C., Díaz, M.A.H., Nava, A.E.L. & Radomile, A.C.M 2012. Extracción de pectina de alto metoxilo a partir de cascaras de parchita para la producción de mermelada. Universidad de los Andes. Escuela de Ingeniería química.
- Delgenes, J.P., Penaud, V. & Moletta, R. 2003. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. Applied Chemistry Solid Wastes 201-228.
- Escudero, E. & González, P. 2006. La fibra dietética. Nutrición Hospitalaria 21(2):61-72.
- Flores-Vindas, E. 1999. La planta. 3ª edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Costa Rica.
- Galdeano, M.C. & Grossmann, M.V.E. 2006. Oat hulls treated with alkaline hydrogen peroxide associated with extrusion as fiber source in cookies. Ciência e Tecnologia de Alimentos 26(1): 123-126.

- García, J.R., de La Rosa, L.A., Duenez, B.H., González, A.G., López-Díaz, J.A., González-Aguilar, G.A., Ruiz-Cruz, S. & Álvarez-Parrilla, E. 2011. Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua* 5(2): 67-75.
- Gómez-Calabrano, C.A. & Mora-Chesta, J.C. 2004. Evaluación del efecto de dos extractos vegetales (*Equisetum bogotense* y *Urtica dioica*) sobre el calibre y partidura de frutos de cerezo (*Prunus avium*) cv. bing, como alternativa al uso de productos comerciales, en angol IX región. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales como parte de los requisitos para optar al título de: Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Temuco.
- Gomide, J.L. & Demuner, B.J. 1986. Determinação do teor demlignina em material lenhoso: método Klason modificado. *O Papel* 47(8): 36-38.
- Grigelmo-Miguel, N., Carreras-Boladeras, E. & Martín-Belloso, O. 2001. Influence of the addition of dietary fiber peach in composition, physical properties and acceptability of reduced-fat muffins. *Food Science and Technology* 7(5): 425-431.
- Izco, J.S., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J.A., Fernández, F., Gallardo, T., Llimosa, X., Prada, C., Talavera, S. & Valdéz, B. 2004. Introducción a la botánica. 2ª Edición. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España.
- Jones, P.J. 2002. Functional foods-more than just nutrition. *Canadian Medical Association*. 116(12): 1555-1563.
- Kasai, N., Konishi, A., Iwai, K. & Maeda, G. 2006. Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6336-6342.
- Kasai, N., Murata, A., Hiroshi, I., Sakamoto, T. & Kahn, R.I. 2004. Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5709-5716.
- Kim, Y.J., Kim, D.O., Chun, O.Y., Shin, D.H., Jung, H., Lee, C.Y. & Wilson, D.B. 2005. Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5: 9560-9565.

- Martínez, O.L.A., Román, M.O.M., Gutiérrez, E.L.E., Medina, G.B.M., Cadavid, M.C. & Flórez, O.A.A. 2008. Desarrollo y evaluación de un postre lácteo con fibra de naranja. *Vitae* 15(2):219-225.
- Milkjovick, D., Duell, B. & Milkjovick, V. 2010. Methods for coffee cherry products. United States Patent. US 7,754,263 B2.
- Murthy, P.S. & Naidu, M.M. 2010. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-010-0363-z
- Napolitano, A., Lanzuise, S., Ruocco, M., Arlotti, G., Ranieri, R., Halvor, R.S., Lorito, M. & Fogliano, V. 2006. Treatment of cereal products with a tailored preparation of *Trichoderma* Enzymes increases the amount of soluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7863-7869.
- Negesse, T., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2009. Nutritive value of some non-conventional feed resources of Ethiopia determined by chemical analyses and an in vitro gas method. *Animal Feed Science and Technology* 154: 204-217.
- Ortiz, M.L. 2009. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquía* 13(2):137-144.
- Pérez-Hernández, L.M., Chávez-Quiros, K., Medina-Suárez, L.A. & Gámez-Mesa, N. 2012. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.
- Quiñones, M, Miguel, M. & y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria* 27(1):76-89.
- Ramírez-Martínez, A. 2012. Internal structure and water transport in endosperm and parchment of coffee bean. Tesis para obtener el grado de Doctor en Mecánica de Ingeniería Civil. Universidad de Montpellier, Francia.
- Segura, F.S., Echeverri, R.F., Patiño, A.C.L. & Mejía, A.I.G. 2007. Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *VITAE* 14(1): 72-81.

- Soto, N.A., Ruíz-Machado, W. & López-López, D. 2010. Determinación de los parámetros cinéticos en la pirólisis del pino ciprés. *Química Nova* 33(7): 1500-1505.
- Sriwattana, S., Laokuldilok, N. & Prinyawiwatkul, W. 2008. Sensory optimization of broken-rice based snacks fortified with protein and fiber. *Journal of Food Science* (73): 6-S333-S338.
- Valdez-Martínez, S.E. 2006. Polisacáridos. Pearson Education En: Badui, S. *Química de los Alimentos*. Capítulo 2.
- Wong, K.H. & Cheung, P.C.K. 2005. Dietary Fibers from Mushroom *Sclerotia*: 1. Preparation and physicochemical and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9395-9400.
- Wu, H., Dwyer, K.M., Fan, Z., Shircore, A., Fan, J. & Dwyer, J.H. 2003. Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles. Atherosclerosis Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 78:1085-91.

6 Evaluación del pergamino de café como fuente de fibra dietética en galletas

6.1 Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el pergamino de café como un ingrediente rico en fibra y con actividad antioxidante en la elaboración de productos de panadería. Se elaboraron formulaciones de galletas con pergamino de café molido añadido en diferentes porcentajes (0%, 1% 2% y 5%). Por medio de un análisis sensorial de aceptación (prueba de consumidores) y textura (medición de la dureza instrumental) se estableció el porcentaje de pergamino de café de la galleta mejor aceptada, a la cual se le realizaron análisis físico-químicos (fibra dietética, humedad, grasa, cenizas, antioxidantes y polifenoles totales) y se compararon con los presentados por el producto sin adición de pergamino. El pergamino molido se sometió a ultrasonificación, y se utilizó para ser añadido en galletas utilizando el mismo porcentaje de la galleta con pergamino molido que obtuvo la mayor aceptación sensorial. Se comparó la dureza y preferencia entre ambos productos. La galleta con mayor aceptación fue la que se formuló con 2% de pergamino de café, que presentó 5,4% de fibra dietética total, 1,68% de humedad, 24% de grasa, 0,89% de cenizas, 1 116 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ de actividad antioxidante y no fueron detectados polifenoles totales. La galleta con pergamino ultrasonificado presentó la menor dureza (52,0 N) en comparación con la galleta con pergamino molido (168,2 N) pero no fue el producto preferido por los consumidores. Se concluyó que el pergamino de café es una potencial fuente de fibra dietética, que puede usarse para enriquecer productos de panadería, sin necesidad de realizar pretratamientos para alterar su textura.

Palabras clave: fibra dietética, galletas, ultrasonido, análisis sensorial.

6.2 Introducción

En las últimas décadas se ha observado que las demandas en el campo de la producción de alimentos son más exigentes que en el pasado, ya que los consumidores no se conforman con el sabor y textura que poseen los productos alimenticios, sino que también consideran de importancia los beneficios que puedan ejercer sobre su salud. Debido a estos requerimientos se desarrollaron los alimentos funcionales, los cuales poseen en su formulación compuestos que ayudan a mantener una buena salud, aparte de la nutrición básica (Hasler, 2000; Clark & Johnson, 2002; Siró *et al.*, 2008; Milner, 2010).

Dentro de los alimentos funcionales se encuentran aquellos que contienen fibra dietética y compuestos antioxidantes. La fibra dietética se define como los polisacáridos presentes en las paredes celulares de las plantas que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, y sufre una fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Sus componentes se dividen en fibra dietética soluble e insoluble (Jones, 2002; Monro, 2004; Escudero & González, 2006; Napolitano *et al.*, 2009). Su ingestión produce efectos benéficos sobre la salud (Escudero & González, 2006; Valdez-Martínez, 2006), ya que previene el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Soto-Mendivil & Vidal-Quintanar, 2001; Lairon *et al.*, 2005), arteriosclerosis (Wu *et al.*, 2003), y diversos tipos de cáncer a nivel del tracto gastrointestinal, como por ejemplo de colon (Kamran *et al.*, 2008; Napolitano *et al.*, 2009). Por otro lado, los antioxidantes juegan un papel importante en la protección contra los efectos dañinos del oxígeno en los tejidos (Huang *et al.*, 2002), previniendo enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares e inflamatorias (FAO, 2007).

Durante el beneficiado del café se produce una serie de subproductos (Adams & Ghaly 2007, Nabais *et al.*, 2008), dentro de los cuales se encuentran la pulpa, la cáscara y el

mucílago del café fresco, la piel plateada y el pergamino de café seco (Bekalo & Reihard, 2010). Actualmente el grano del café presenta un interés comercial y representa aproximadamente el 18% del total de la biomasa del café cerezo cosechado y el 82% restante se consideran residuos (Adams & Ghaly, 2007). Ha sido una práctica común utilizar el pergamino de café, el cual constituye alrededor del 12% del grano en base seca, como material de combustión y para alimentación animal (Rodríguez-Valencia, 1999). Anatómicamente es el endocarpio del grano del café, siendo rico en celulosa, con contenidos de 40-49% y, en cuanto al contenido de celulosa y hemicelulosa juntas, contiene un 74% en promedio (Bekalo & Reinhardt, 2010). Investigaciones realizadas en pulpa de café (Arellano-González, 2009) y piel plateada, han demostrado que estos subproductos poseen compuestos funcionales como fibra dietética y antioxidantes, dentro de los cuales se encuentra el ácido clorogénico (Borreli *et al.*, 2004). Este complejo sinérgico es conocido como fibras dietéticas antioxidantes (AODF, por sus siglas en inglés), por lo que puede ser posible que el pergamino del café esté constituido por este complejo, lo cual es muy ventajoso para la elaboración de alimentos funcionales, añadiendo más efectos beneficiosos que solamente la fracción de fibra (Murthy & Naidu, 2010).

Debido a las demandas por alimentos funcionales, la incorporación de fibra en las fórmulas panaderas se ha utilizado con gran éxito (Canett-Romero *et al.*, 2004). En esta línea de productos, uno de los más versátiles, populares y de consumo masivo son las galletas (Maldonado & Pacheco de Delahaye, 2000). Sin embargo, el criterio más importante de la selección del nivel de incorporación de cualquier ingrediente es la contribución en la aceptación que éste tendrá en el producto final. Se ha demostrado que la adición de fibra en la formulación de un producto afecta las características sensoriales como el sabor y la textura (Clark & Johnson, 2002; Canett-Romero *et al.*, 2004). Por tal motivo, se han desarrollado métodos físicos y químicos para modificar las características de los materiales ligno-celulósicos de la fibra (Pernaete *et al.*, 2008), entre los cuales se encuentra el ultrasonido, ya que es un medio eficaz para romper las estructuras de las

células (Londoño-Londoño, 2010), y se ha utilizado para la extracción de algunos compuestos fenólicos de plantas (Novak *et al.*, 2008; Pacheco-Reyes 2009), como por ejemplo en cascarilla de cacao (Quiroz-Reyes *et al.*, 2012), bagazo de uva (Rubio & Usaquén-Castro, 2005), y frutos de vainilla (Pacheco-Reyes, 2009), obteniendo resultados satisfactorios.

En trabajo de investigación se determinó el efecto de la adición de pergamino de café molido sin ningún tratamiento y pergamino molido sometido a ultrasonido en la elaboración de galletas dulces, sobre la aceptación por parte del consumidor y la dureza determinada instrumentalmente.

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Preparación del pergamino

El pergamino de café se recolectó en el beneficio Helsar, ubicado en Zarcero, provincia de Alajuela, en recipientes limpios y desinfectados y se trasladó a la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, en donde se almacenó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. El pergamino fue molido en un molino de martillos limpio y desinfectado, con una malla de 0,33 mm y luego se le realizaron análisis físico-químicos.

Adicionalmente, una parte del pergamino fue sometido a ultrasonicación. El pergamino se colocó en beakers de vidrio y se agregó agua. Se utilizó una relación peso: volumen: 1:10 (30 g de pergamino/300 mL de agua). La suspensión se agitó y se colocó dentro de un equipo ultrasónico Misonix Ultrasonic Liquid Processor modelo S4000 con una potencia de 44 W/cm^2 por 5 min.

6.3.2 Elaboración de las galletas con diferentes porcentajes de pergamino de café molido

Las galletas utilizadas en este estudio se elaboraron a partir de la formulación patrón que aparece en el **Cuadro 6.1** y que contiene 50% de harina de trigo con 1,5% de fibra dietética. Se elaboraron galletas con diferentes porcentajes de pergamino de café con respecto a la harina de trigo (0%, 1%, 2% y 5%) y se analizó su efecto sobre la aceptación de los consumidores y la dureza instrumental. Por otra parte, se elaboraron galletas utilizando pergamino molido y sometido a ultrasonificación con el mismo porcentaje de adición. Se agregó el porcentaje de pergamino utilizado en la galletas con pergamino molido que fueron mejor evaluadas por los consumidores.

Cuadro 6.1 Formulación de la galleta control.

Ingrediente	Porcentaje
Harina de trigo	50,4%
Mantequilla	24,15%
Azúcar	15,45%
Huevo	8,05%
Vainilla	2%

Para la elaboración de las galletas, se pesaron los ingredientes y se mezclaron. Posteriormente se moldearon y se hornearon a una temperatura de 180 °C por 10 minutos, y luego se empacaron en bolsas de polipropileno en paquetes de 30 galletas cada una con un peso aproximado de 6,2 g. Cada paquete se almacenó en una bolsa de polietileno de alta densidad a temperatura ambiente, hasta su posterior análisis. En la **Figura 6.1** se esquematiza el flujograma del proceso.

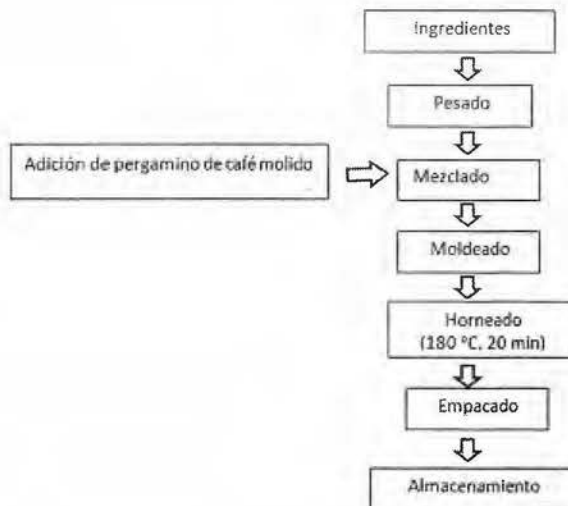


Figura 6. 1 Flujograma para la elaboración de galletas con pergamino de café.

6.3.3 Diseño experimental

Se evaluó el efecto de la adición de pergamino en las galletas sobre la dureza y aceptación en cada uno de los niveles de sustitución. Se elaboraron 3 lotes de los 4 tipos de galletas. Cada lote correspondió a diferentes tiempos de muestreo. Para tomar la muestra se homogeneizó el pergamino de café, revolviendo su contenido de tal manera que no predominaran partículas muy grandes o muy pequeñas. De este modo, se tuvo como fuente de variabilidad el lote en cada análisis realizado. Se aplicó un diseño de bloques completos, donde los bloques fueron los 3 lotes, con 4 tratamientos (4 diferentes porcentajes de pergamino agregado). Se aplicó un ANDEVA para observar diferencias significativas entre los tipos de galletas y una comparación de medias de Túckey para la dureza y la determinación de la diferencia mínima significativa (LSD) para la aceptación.

El otro diseño fue de bloques completos al azar, con un factor con dos niveles y 3 bloques (lotes). Se comparó el efecto sobre la dureza y la preferencia de los consumidores en galletas que contenían pergamino molido y sometido a ultrasonido, utilizando el porcentaje de pergamino mejor evaluado por los consumidores en la prueba de

aceptación. Se compararon las dos muestras y se analizaron por medio de una prueba de chi cuadrado, ya que se analizaron 3 categorías.

6.3.4 Análisis sensorial

Para determinar el efecto de la adición del pergamino sobre la aceptación de los productos, las galletas con los diferentes porcentajes de pergamino molido fueron evaluadas por medio de una prueba de agrado (consumidores), con una escala hedónica híbrida (Villanueva *et al.*, 2005). Las muestras se codificaron con números de 3 dígitos y se presentaron a 99 panelistas en un orden de presentación balanceado y aleatorizado, y se les indicó que expectoraran la muestra y se enjuagaran con agua entre las galletas con diferentes porcentajes de pergamino. Se aplicó un análisis de "cluster" o conglomerados a los datos generados por los consumidores para definir segmentos en cuanto al agrado. Al obtener los segmentos se realizó un análisis de varianza para determinar cuál era el producto más aceptado en cada grupo.

Se utilizó una prueba de preferencia para comparar la galleta con el porcentaje de fibra de mayor aceptación y la galleta con el mismo porcentaje de pergamino sometido a ultrasonido a 44 W/cm^2 . Participaron 70 consumidores, a los que se les presentaron las 2 muestras de galletas (codificadas con números de 3 dígitos, balanceadas y aleatorizadas en el orden de presentación). Se les preguntó por la galleta que preferían, o si no tenían ninguna preferencia, por lo que se les dio a escoger tres categorías.

6.3.5 Determinación instrumental de la dureza

Se utilizó el texturómetro TA-XT Plus y el software Texture Exponent, de Stable Microsystems para evaluar el efecto del porcentaje del pergamino sobre la dureza en las

galletas con pergamino molido en diferentes porcentajes y a la galleta con pergamino ultrasonificado a 44 W/cm^2 por 5 min. Se realizaron 5 repeticiones de cada lote para promediar los resultados y obtener un valor por lote y por tratamiento. Las condiciones con la que operó el programa fueron las siguientes: modo de compresión, velocidad pre-prueba: 1 mm/s, velocidad de prueba: 3 mm/s, velocidad post-prueba: 10 mm/s, distancia o penetración: 5 mm y el aditamento utilizado fue una cuchilla de borde romo (sin filo). El análisis se realizó colocando las galletas de tal manera que la cuchilla compresionara a la mitad. La dureza se calculó como la altura de la fuerza máxima en el gráfico de fuerza de corte con cuchilla vs tiempo (Ver **Figura 6.2**)

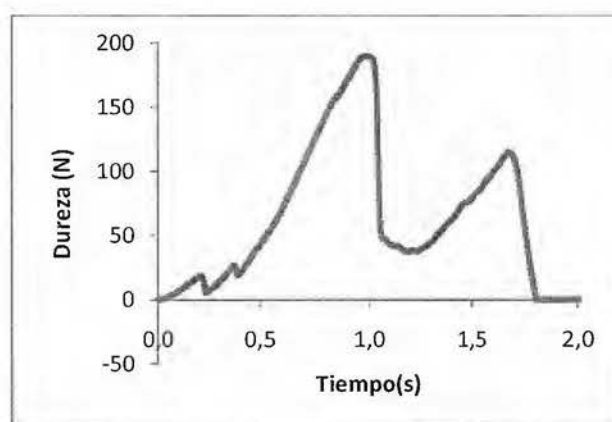


Figura 6.2 Gráfico característico del corte con cuchilla plana de una galleta con 2% de pergamino de café.

6.3.6 Análisis físico-químico a las galletas

A la galleta con pergamino molido con la mayor aceptación por parte de los consumidores se le determinó humedad, grasa, fibra dietética y antioxidantes.

La humedad se determinó por el método de AOAC 925.10 (AOAC, 1990a). La galleta se secó a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 horas, tiempo en el que se obtuvo peso constante.

La extracción y análisis de grasa se realizó según el método de soxhlet de AOAC 945.16 (AOAC, 2000).

La determinación de cenizas fue realizada de acuerdo con el método de la AOAC 923.03 (AOAC, 1990b), para lo cual 5 g de galleta se sometieron a una temperatura de 500 °C por 5 horas.

La fibra dietética total se determinó por el método de AOAC 991.43 de fibra total, soluble e insoluble en alimentos (AOAC, 2005a).

Todos los análisis mencionados anteriormente se realizaron por triplicado, en 3 lotes diferentes o tiempos de muestreo.

6.3.7 Análisis microbiológico

Se realizó el recuento de microorganismos aerobios mesófilos en la galleta con el porcentaje de pergamino de mayor aceptación, siguiendo el método oficial de la AOAC 966.23.C (AOAC, 1998), el cual es un indicador de las poblaciones bacterianas en una muestra. En este análisis, 25 g de la muestra se mezclaron con 225 mL agua peptonada, se homogenizaron y se realizaron diluciones hasta 10^{-5} ; luego se trasladó 1 mL de cada dilución a placas con agar estándar, y se mantuvieron 48 h a una temperatura de incubación de $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Pasado el tiempo de incubación se procedió con el conteo de las colonias formadas en las placas, expresándose los resultados como Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g). El análisis se realizó por triplicado para cada dilución utilizada.

6.3.8 Determinación de la actividad antioxidante

Se realizó el método de ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity, por sus siglas en inglés) para determinar la capacidad antioxidante del pergamino de café. Este método se

basa en medir la pérdida de fluorescencia debido a su oxidación por acción de un radical peróxido, e integra el área bajo la curva de intensidad de fluorescencia a través del tiempo. La capacidad antioxidante del extracto se determina a partir del valor del área bajo la curva, ya que la presencia de antioxidantes retrasa el descenso de la fluorescencia, con lo cual es posible calcular esa capacidad (García *et al.*, 2011).

6.3.9 Determinación de polifenoles totales

Para la determinación de los polifenoles totales presentes en el pergamino de café y la galleta de mayor aceptación totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, en el cual se produce una oxidación de los fenoles presentes en la muestra, que causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (García *et al.*, 2011).

6.4 Resultados y discusión

6.4.1 Prueba de aceptación de las galletas con varios porcentajes de pergamino molido

El análisis de conglomerados obtenido de los datos del panel de consumidores (n=99,) demostró que hubo 2 grupos de personas que compartían diferencias en cuanto al agrado de los tipos de galletas, como se aprecia en la **Figura 6.3**. El primer grupo estuvo conformado por 70 personas, correspondiendo al 70,7% de los panelistas. Este grupo manifestó mayor agrado por las galletas con 1% y 2% de pergamino de café, seguida por la galleta con 5%, mientras que la galleta control obtuvo la aceptación más baja. El segundo grupo lo conformaron 29 personas, los cuales mostraron mayor agrado por la galleta control y la galleta con 1% de pergamino. Los puntajes más bajos fueron para las galletas

con 2% y 5%. Este grupo fue el que mostró diferencias más marcadas por las galletas con diferentes concentraciones de fibra, mientras que el grupo 1 presentó valores de aceptación menos variables.

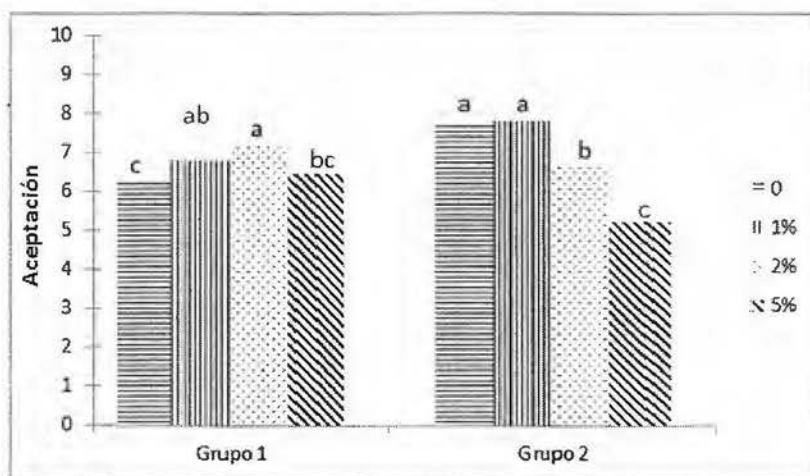


Figura 6.3 Promedio de aceptación para dos grupos de consumidores de las galletas con distintos porcentajes (0, 1, 2, 5 %) de pergamino de café. Letras diferentes en un mismo grupo evidencian diferencias significativas a un 95% de confianza.

El grupo 1 mostró inclinación hacia las galletas con fibra, particularmente hacia la contenía 2% de pergamino añadido, seguida por la galleta con 1% de pergamino, mientras el grupo 2 prefirió aquellas que contenían poca fibra (ya sea proveniente de la harina de trigo o adicionada). Estos resultados indican que existe un mercado para la adición de pergamino como fuente de fibra dietética en alimentos. Es importante destacar que ninguna de las galletas con los diferentes porcentajes de pergamino de café utilizados fue inaceptable sensorialmente para ninguno de los grupos. Se considera que un 2% de pergamino molido sería bien aceptado en la población al agregarlo en galletas.

Estudios en los que se evalúa la aceptación de productos con fibra agregada muestran resultados contradictorios. En algunos la aceptación disminuye y en otros se reporta

aceptación por productos hasta con un 20%. En muffins con diferentes porcentajes de fibra de melocotón (0, 2, 3, 4, 5 y 10%) se encontró que los de menor aceptación fueron aquellos que contenían 5% o más que el producto control (Grigelmo-Miguel *et al.*, 2011). Cuando se utilizó salvado de maíz en pasteles, se demostró que puede usarse hasta en niveles de 20% sin causar deterioro en la calidad del alimento, procesabilidad y aceptabilidad. Por lo que se deduce que las características de cada tipo de fibra influyen en la aceptación de los consumidores.

Por medio de los resultados de la prueba de preferencia entre la galleta con 2% de pergamino molido y molido-ultrasonificado (n=70) se apreció que 36 personas prefirieron la galleta de pergamino molido, mientras que 16 individuos prefirieron ambos productos, y 18 personas se inclinaron por la galleta con pergamino ultrasonificado ($p < 0,05$) obteniéndose que el 74% de los panelistas aceptaron sensorialmente la galleta con pergamino que no tuvo ningún tipo de tratamiento aparte de la molienda (Ver **Figura 6.4**).

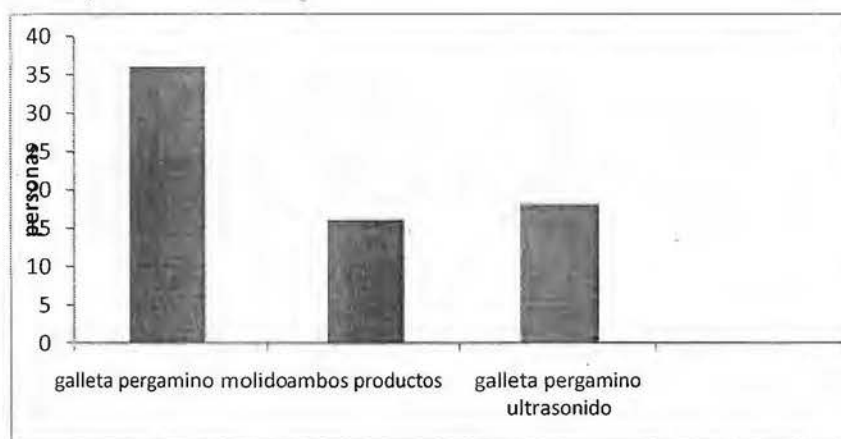


Figura 6.4. Preferencia por parte de 70 potenciales consumidores de las galletas elaboradas con 2% de pergamino molido, pergamino molido-ultrasonificado y ambos tipos de galletas

Estos resultados indican que no es necesario realizar tratamientos posteriores a la molienda en el pergamino de café que será utilizado para agregarlo a productos de

panadería como las galletas, para obtener una aceptación sensorial por parte de los consumidores. Lo anterior tiene ventaja desde el punto de vista económico, ya que un tratamiento con ultrasonido implica una inversión adicional en el proceso de elaboración del producto.

6.4.2 Determinación instrumental de la dureza

Este análisis señaló que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto a la dureza de las galletas debido al porcentaje de pergamino de café agregado, aunque se apreció una tendencia a aumentar la dureza conforme lo hizo la cantidad de pergamino añadido **(Figura 6.5)**.

Existen muchas investigaciones enfocadas a evaluar el efecto de la adición de fibra sobre la dureza de productos de panadería, y los resultados difieren dependiendo de la composición de la fuente de fibra. En una investigación, conforme se aumentó la cantidad de fibra añadida a galletas con 15, 22 y 30% de cascarilla de maíz nixtamalizada (CMN) como sustituto parcial de harina, la textura fue incrementándose en comparación con la galleta control (Soto-Mendivil *et al.*, 2001). De igual forma, a medida que un aislado proteico de soya se incrementó desde 5% hasta un 15%, la dureza se incrementó (Lee & Brennan, 2005). Grigelmo-Miguel *et al.* (2001) evaluaron la dureza en muffins conteniendo fibra proveniente de cáscara de melocotón y este parámetro aumentó. En la mayoría de los estudios, se agregó porcentajes muy altos del ingrediente que contenía fibra, mientras que en el presente caso se usaron porcentajes bajos, lo que afectó poco la dureza.

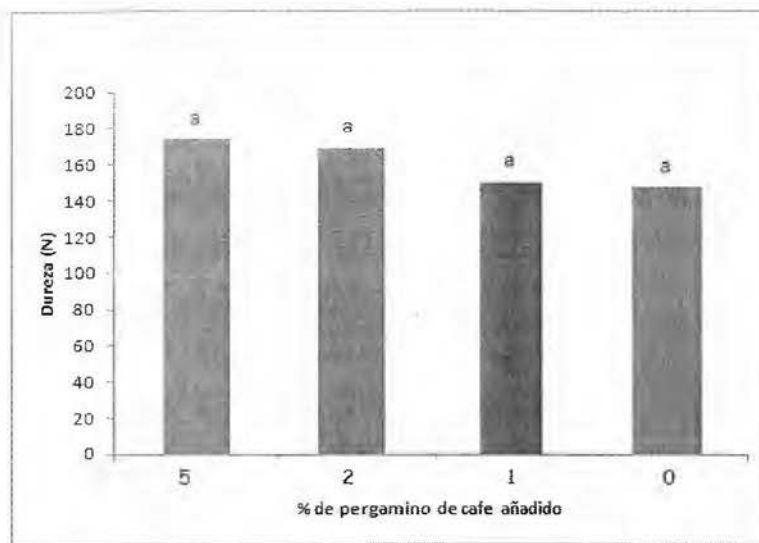


Figura 6.5. Dureza (N) de las galletas con diferentes porcentajes de pergamino de café añadido. Letras diferentes evidencian diferencias significativas a un 95% de confianza.

6.4.3 Comparación de la textura de las galletas con 2% de pergamino de café sin tratar y pergamino ultrasonificado

A las galletas preparadas con 2% de pergamino sometido a ultrasonificación a 50 W/cm^2 por 5 min, se les determinó la fuerza máxima necesaria para romper la estructura de los productos, que fue de 52,06 N en promedio. Este valor es tres veces menor que los valores de dureza presentados por las galletas preparadas con 2% de pergamino molido únicamente (168,8 N) (**Figura 6.6**).

Durante el tratamiento con ultrasonido, se produce una lisis de la pared celular del material, liberando compuestos intracelulares como almidón o azúcares (Novak *et al.*, 2008). Se observó en los frascos de almacenamiento del pergamino ultrasonificado, la presencia de una capa de naturaleza turbia que flotaba por encima del material. Esto podría indicar que hubo una liberación de compuestos que estarían involucrados en el

cambio de textura de las galletas cuando la fibra ultrasonificada fue añadida a los productos. El ultrasonido suavizó la textura del pergamino y, por lo tanto, disminuyó la dureza de las galletas en comparación con el pergamino sin tratar. Este efecto pudo influenciar la aceptación del producto por los consumidores, como se pudo observar en la prueba de preferencia (Figura 6.4).

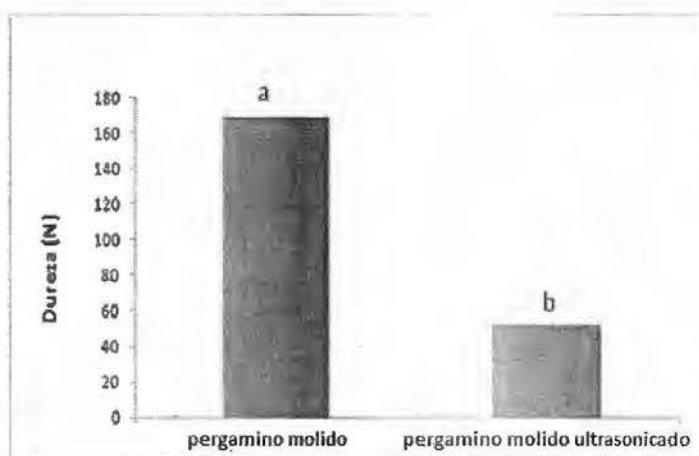


Figura 6.6 Dureza (N) de las galletas a las que se les adicionó 2% de pergamino molido y 2% de pergamino molido y ultrasonificado. Letras diferentes evidencian diferencias significativas a un 95% de confianza.

6.4.4 Análisis químico de la galleta con 2% de pergamino de café

La caracterización físico química se llevó a cabo a la galleta con la adición de 2% de pergamino, que fue la que tuvo mayor aceptación sensorial. Los resultados aparecen en el Cuadro 6.2.

El pergamino de café molido presentó un contenido de humedad de (7,6%). La humedad presente en la galleta fue de 1,68%, lo cual cumple con el límite máximo permitido de este parámetro en galletas simples (sin relleno). La Norma Mexicana para Galletas (NMX-F-006-1983) establece un máximo de 6% de humedad en este tipo de productos. El

procedimiento de horneado a alta temperatura influyó en el bajo contenido de humedad del producto, mientras que el valor de las cenizas presentes en la galleta también cumple con la norma mencionada anteriormente, que establece un nivel máximo de 1,5%.

Cuadro 6.2. Caracterización química del pergamino de café molido y la galleta elaborada con 2% de pergamino molido (3 lotes)

Determinación	Pergamino de café	Galleta 2% pergamino
Humedad (%)	7,6±0,1	1,68±0,04
Grasa (%)	no detectada	24,±1
Cenizas (%)	0,710±0.002	0,89±0,05
Fibra dietética Total (%)	88,7± 0,1	5,4±0,4
Actividad antioxidante (µm TE/100g)	1 239 ± 2	1 116 ±27
Polifenoles totales (mg ácido gálico/100 g muestra)	No detectados (<3,02 mg/g)	No detectados (<3,02 mg/g)

Los valores son el promedio y desviación estándar de triplicados

La grasa no fue detectada en el pergamino de café por el método que se utilizó para determinarla, mientras que en la galleta, el porcentaje de grasa fue de 24,06% (**Cuadro 6.2**). Por lo tanto, el pergamino de café no aportó materia grasa a la galleta. En el mercado nacional predominan las galletas con un porcentaje de grasa superior al 20% (Boobier, 2006).

La fibra dietética total del pergamino de café molido fue de 88,7%. Otros subproductos obtenidos de los procesos agroindustriales presentan valores más bajos de fibra dietética total. La pulpa de la uva roja presenta 77,2%. La cáscara de mango es una buena fuente de fibra dietética, con 51,2% y se ha utilizado en galletas (Ajila *et al.*, 2008). Estas propiedades presentan ventajas y pueden ser utilizadas en diversos campos de la industria alimenticia, como por ejemplo, productos de panadería (O'Shea *et al.*, 2012).

Las galletas con 2% de pergamino de café se consideraron fuente de fibra, ya que teóricamente, el pergamino de café presenta alrededor de 98% de fibra dietética (Bekalo

& Reinhardt, 2010) y, añadiendo el porcentaje de fibra presente en la harina de trigo (1,5%), tendrían al menos 3% de fibra dietética, mientras que las que contenían 5% serían altos en fibra. Según el Decreto N° 30256-MEIC-S Etiquetado Nutricional de los Alimentos Preenvasados (2002) de Costa Rica, un alimento es considerado fuente de fibra al presentar 3 g por cada 100 g de ésta y alto en fibra al presenta dos veces estos valores. El contenido de fibra dietética total de las galletas fue de 5,42%.

El aumento en la cantidad de fibra dietética de las galletas con respecto al contenido teórico pudo deberse a la formación de almidón resistente tipo III. Este es el almidón que resiste la degradación por enzimas amilolíticas *in vitro* e *in vivo*. Debido a lo expuesto anteriormente, el almidón resistente queda incluido dentro de la fibra dietética (Agustiniano-Osorno, 2004). El almidón resistente tipo III (AR3) se forma después de ciertos tratamientos con calor, enfriamiento o humedad. Este tipo de almidón se puede encontrar en pan, papas cocidas y productos vegetales enlatados (Agustiniano-Osorno, 2004; Perez-Váladez, 2010). El almidón resistente, aun siendo un constituyente mayoritariamente insoluble por su fermentabilidad potencial, se podría englobar dentro de los compuestos que constituyen la fibra dietética soluble. Sin embargo, las fracciones indigeribles debidas a retrogradación del almidón son cuantificadas como fibra dietética insoluble por los métodos enzimáticos-gravimétricos (Agustiniano-Osorno, 2004). En esta investigación se utilizó este tipo de método para cuantificar la fibra dietética de todas las muestras sometidas a estudio, por lo que se podría decir que el almidón presente en la harina de trigo de las galletas sufrió el fenómeno descrito anteriormente, ya sea en la etapa de horneado o de enfriamiento de los productos y fue detectado por el método para determinar fibra, por lo que el valor de este nutriente aumentó. El valor obtenido (5,42%) se aproxima a los 6 g por 100 g, que se considera un alimento alto en fibra dietética.

Durante la elaboración de la masa de las galletas, se observó que aquellas que contenían 5% y 2% de pergamino de café (con y sin ultrasonido) mostraron maleabilidad y al cortar

las galletas cambiaban su forma redonda a ovaladas, pues la textura era suave y blanda. En cambio, en las galletas control y con 1% de pergamino, la masa era firme, más dura y mantenían su forma al cortarlas. La presencia de fibra insoluble como la lignina y celulosa afecta las características de la masa de los productos de panadería, ya que pueden causar una alteración en el gluten, una baja tendencia a la hidratación y, consecuentemente, baja capacidad de hinchamiento. Estas partículas rígidas y parcialmente hidratadas debilitan la masa cortando las fibras de gluten. Esto también es un indicativo de una cantidad de fibra insoluble importante en los productos (Pourfarzad *et al.*, 2012). El pergamino de café posee en promedio 46,1% de celulosa, 27,8% de hemicelulosa y 34,2% de lignina (Bekalo & Reinhardt, 2010).

La galleta con 2% de pergamino presentó 1 116 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ según el método de ORAC, como lo indica el **Cuadro 6.2**. En la investigación de Bilgiçli *et al.* (2007), la capacidad antioxidante de galletas con 30% de fibras añadidas de manzana, limón y cascarilla de trigo fueron de 2 116, 2 263 y 2 036 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$, respectivamente. El porcentaje de pergamino utilizado en este estudio fue menor, lo que indica que esta capacidad podría aumentar al añadir mayor cantidad de pergamino, y podría ser comparable a otras galletas con fibras de cítricos. Se presume que el horneado no afectó la capacidad antioxidante presente en el pergamino de café, ya que productos horneados la han presentado (Bilgiçli *et al.*, 2007; Sakac *et al.*, 2011). Adicionalmente, los productos que se forman en la reacción de Maillard durante el horneado pudieron aumentar la capacidad antioxidante total presente en la galleta, ya que en muchos sistemas alimentarios, los compuestos de Maillard dan lugar a una serie de aspectos favorables, como la formación de productos con actividad antioxidante. Estos compuestos se forman por reacciones entre aminoácidos, especialmente arginina e histidina con xilosa, y aportan un efecto antioxidante elevado en algunos productos horneados, como las galletas (Gil, 2010).

Los polifenoles totales en el pergamino y la galleta no fueron detectados por el método utilizado para determinarlos. Según Negesse *et al.* (2009), en el procesamiento en seco el pergamino de café presenta altas concentraciones de compuestos fenólicos, como los ácidos clorogénicos, dentro de los que se encuentran los ácidos cumárico, ferúlico y cafeico, y en Costa Rica se utiliza el proceso húmedo para obtener el grano de café. Esto probablemente se deba a que el agua de lavado arrastre compuestos fenólicos, ya que algunos exhiben hidrosolubilidad (Quiñones *et al.*, 2012), por lo que el tipo de procesamiento para obtener el grano de café podría haber influido en el contenido de polifenoles totales en el pergamino.

6.4.5 Análisis microbiológico de la galleta con 2% de pergamino de café

En los 3 lotes de la galleta con 2% de pergamino no se presentó una cantidad significativa de colonias en las placas con agar, pues se toman en cuenta en recuento aquellas que tienen un número entre 25-300 colonias (Swanson *et al.*, 2001), y solo las placas con la menor dilución presentaron colonias. Sin embargo, se reporta un estimado de las unidades formadoras de colonias, el cual fue de 4×10^1 . Según Moragas & De Pablo (2004) el límite máximo permitido de aerobios mesófilos es de 10^3 UFC/g, valor que las galletas con pergamino de café no sobrepasaron. Esto indica que el proceso de elaboración de los productos se realizó con buenas prácticas de manufactura, como fueron limpieza y desinfección de equipos, utensilios, e ingredientes de buena calidad, que generaron bajos recuentos microbianos y además que el pergamino molido no representó una fuente de contaminación microbiana.

6.4.6 Conclusiones

La galleta con 2% de pergamino de café añadido fue el producto con mayor aceptación sensorial, por lo que se considera al pergamino de café como una fuente importante de

fibra dietética para ser añadido en productos de panadería, lo cual presenta ventajas en comparación con otros productos disponibles en el mercado, debido a su alto contenido de fibra y actividad antioxidante. La galleta con 5% de pergamino fue la que presentó el menor agrado sensorial; sin embargo, esta no obtuvo calificaciones bajas, por lo que se podría decir que las galletas con pergamino de café tienen un potencial para ser comercializadas. Al realizar un tratamiento como el ultrasonido, enfocado a provocar una lisis celular de las paredes del pergamino, se logró obtener un ingrediente que disminuyó la dureza de los productos terminados en los que se añadió. Sin embargo, esto produjo un efecto negativo en la aceptación por parte de los consumidores. Lo planteado anteriormente es de gran ayuda para los productores cafetaleros, que le darían un valor agregado a un subproducto que podría valorizarse considerablemente. Se recomienda añadir 2% de pergamino en galletas elaboradas con harina de trigo.

6.5 Referencias

- Adams, M. & A. E. Ghaly. 2007. Maximizing sustainability of the Costa Rican coffee industry. *Journal of Cleaner Production*. 15: 1716-1729.
- Agustiniano-Osorno, J. C. 2004. Obtención de almidón resistente mediante extrusión a partir de almidón de mango *Mangifera indica* L. (Var. Tommy Atkins). Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Ajila, C.M., Leelavathi, K. & Rao, U.J.S.P. 2008. Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science* 48: 319-326.
- AOAC. 1990a. Official Methods of Analysis. 925.10. Moisture in flour-air oven methods. AOAC International.
- AOAC. 1990b. Official Methods of Analysis. AOAC 923.03. Determination of ash in foods. methods. AOAC International.

- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis. Aerobic plate count. AOAC International.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 945.16. Crude fat. AOAC International.
- AOAC. 2005a. Official Method 991.43 Total, soluble, and insoluble dietary fiber in Foods. AOAC International.
- AOAC. 2005b. Official Methods of Analysis. 979.09. Protein in grain: Kjeldahl Method. International.
- Arellano-González, M.A. 2009. Estimación de la capacidad antioxidante de ácidos hidroxicinámicos obtenidos de la pulpa de café. Tesis de especialización en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Avallone, S., Guiraud, J.P., Guyot, B., Olguin, E. & Brillouej, M. 2001. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5556-5559.
- Barham, D. & Trinder, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97:142.
- Bekalo, S.A. & Reinhard, H.W. 2010. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. *Materials and structures* 43(8): 1049-1060.
- Borrelli, R.C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A. & Fogliano, V. 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1338-1343.
- Boobier, W.J. 2006. Desarrollo de una galleta saludable: un enfoque alternativo a la fabricación de galletas. *Nutrition Journal* 5: 7-7
- Canett-Romero, R., Ledesma-Osuna, A. I.; Robles-Sánchez, R.M., Morales-Castro, R., León-Martínez, L. & León-Gálvez, R. 2004. Caracterización de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(1): 93-99.
- Clark, R. & Jhonson, S. 2002. Sensory acceptability of foods with added Lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel fiber using pre-set criteria. *Journal of Food Science* 67(1): 356-362.
- Decreto N° 30256-MEIC-S RTCR 135:2002. Etiquetado Nutricional de los Alimentos Preenvasados. Costa Rica.

- Delgenes, J.P., Penaud, V. & Moletta, R. 2003. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. *Applied Chemistry Solid Wastes* 201-228.
- Escudero, E. & González, P. 2006. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria* 21(2):61-72.
- FAO. 2007. Report On Functional Foods. Rome, Italy.
- García, J.R., de La Rosa, L.A., Duenez, B.H., González, A.G., López-Díaz, J.A., González-Aguilar, G.A., Ruiz-Cruz, S. & Álvarez-Parrilla, E. 2011. Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua* 5(2): 67-75.
- Gil, A.H. 2010. Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Editorial Médica Panamericana. Madrid: España.
- Grigelmo-Miguel, N., Carreras-Boladeras, E. & Martín-Belloso, O. 2001. Influence of the addition of dietary fiber peach in composition, physical properties and acceptability of reduced-fat muffins. *Food Science and Technology* 7(5): 425-431.
- Hasler, C. M. 2000. The changing face of functional foods. *Journal of the American College of Nutrition*. 19(5): 499S-506S.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. & Prior, R.L. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-Well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4437-4444.
- Jones, P.J. 2002. Functional foods-more than just nutrition. *Canadian Medical Association*. 116(12): 1555-1563.
- Kamran, M., Saleem, N. & Umer, Z.N. 2008. Ready-To-Eat (RTE) wheat bran breakfast cereal as a high-fiber diet. *Journal of Food Processing and Preservation* 32:853-867.
- Lairon, D., Arnault, N., Bertrais, S., Planells, R., Clero, E., Hercberg, S. & Boutron-Ruault, M.C. 2005. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 82:1185-94.
- Lee, K.A. & Brennand, C.P. 2005. Physico-chemical, textural and sensory properties of a fried cookie system containing soy protein isolate. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 501-508.

- Londoño-Londoño, J.A. 2010. Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos: extracción y caracterización de flavonoides. *Disertaciones Administrativas y Agropecuarias: gestión y competitividad*.
- Maldonado, R. & Pacheco de Delahaye, E. 2000. Elaboración de galletas con una mezcla de harina de trigo y de plátano verde. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(4): 387-393.
- Milner, J.A. 2010. Functional foods: the US perspective. *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1654S-9S.
- Monro, J. A. 2004. Dietary Fiber. En: Nollet, L.M (Editor). *Handbook of Food Analysis*. 2ª Edición. Capítulo 22.
- Moragas, M., de Pablo, M.B. 2004. Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco.
- Murthy, P.S. & Naidu, M.M. 2010. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-010-0363-z
- Nabais, J.M.V., Nunes, P., Carrott, J.M., Carrott, M.L.R., García, A.M. & Díaz-Díez, M.A. 2008. Production of activated carbons from coffee endocarp by CO₂ and steam activation. *Full processing technology* 89: 262-268.
- Napolitano, A., Costabile, A., Martin-Pelaez, S., Vitaglione, P., Klinder, A., Gibson, G. R. & Fogliano, V. 2009. Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 19: 283-290.
- Negesse, T., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2009. Nutritive value of some non-conventional feed resources of Ethiopia determined by chemical analyses and an in vitro gas method. *Animal Feed Science and Technology* 154: 204-217.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M. & Oliveira-Brett, A.M. 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by

- reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta* 630: 107-115.
- O'Shea, N., Arendt, E.K. & Gallagher, E. 2012. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 16:1-10.
- Pacheco-Reyes, I. 2009. Evaluación del efecto de sonicación-microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Instituto politécnico nacional. Oaxaca, México.
- Pérez-Hernández, L.M., Chávez-Quiros, K., Medina-Suárez, L.A. & Gámez-Mesa, N. 2012. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de café verde y procesamiento de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.
- Perez-Váladez, E. 2010. Estudio *in vitro* e *in vivo* del proceso digestivo de fibra dietética y almidón resistente. Protocolo de investigación para obtener el grado de maestro en ciencias biológicas. Universidad michoacana. Facultad de químico farmacobiología. México.
- Pernalete, Z., Piña, F., Suárez, M., Ferrer, A. & Aiello, M.C. 2008. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: Efecto de la humedad del bagazo y la carga del amoníaco. *Bioagro* 20(1): 3-10.
- Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H. & Sedaghat, N. 2012. Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *Food Science and Technology* 50(2): 599-606.
- Quiroz-Reyes, C.N., Aguilar-Méndez, M.A., Ramírez-Ortíz, M.E. & Ronquillo de Jesús, E. 2012. Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12(1): 11-18.
- Rodríguez-Valencia, N. 1999. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional gestión de residuos sólidos y peligrosos, siglo XXI. Cenicafé. Colombia.

- Rubio, M.M. & Usaquén-Castro, X.P. 2005. Evaluación del efecto de pre-tratamientos con ultrasonido sobre el nivel de extracción y la actividad de sustancias antioxidantes contenidas en el bagazo de uva (*Vitis vinifera*). Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero en Producción Agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana, Colombia.
- Sakac, M., Gyura, J., Misan, A., Seres, Z. & Pajin, B. 2011. Antioxidant properties of cookies supplemented with sugar beet dietary fibre. *Technology* 151-156.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite* 51: 456-467.
- Soto-Mendivil, E.A. & Vidal-Quintanar, R.L. 2001. Evaluation of nixtamalized corn hull as fiber source in baking products. *Food Science and Technology International* 7(4): 355-361.
- Swanson, M.J.K., Petran, R.L. & Hanlin, J.H. 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms. En: Pouch-Downes, F; Ito, K. (Eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4. ed. American Public Health Association: Washington DC.
- Valdez-Martínez, S.E. 2006. Polisacáridos. Pearson Education En: Badui, S. *Química de los Alimentos*. Capítulo 2.
- Villanueva, N.D.M., Petenate, A.J. & Da silva, M.A.A.P. 2005. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. *Food Quality and Preference* 16:691-703.
- Wu, H., Dwyer, K.M., Fan, Z., Shircore, A., Fan, J. & Dwyer, J.H. 2003. Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 78:1085-91.

7 Discusión General

El presente estudio evidenció que el pergamino de café es un material resistente a los diversos pretratamientos e incubaciones enzimáticas utilizados debido al tipo, composición y disposición de la fibra dietética. La naturaleza de las esclereidas influyó en la resistencia del pergamino ante los pretratamientos con los métodos físicos y químicos, así como a las incubaciones con enzimas celulolíticas. Algunos de los pretratamientos e incubaciones con enzimas lograron una liberación parcial de las fibras, aunque con la determinación de las fracciones insolubles se evidenció que, si bien se logró disminuir, esta se mantuvo en porcentajes elevados.

Los tratamientos con ultrasonido y posteriores incubaciones enzimáticas con enzimas celulíticas evidenciaron ser los más efectivos para disminuir la fracción insoluble presente en el pergamino de café, lo que indicó que se necesita de varias acciones para poder obtener una liberación de fibras individuales, aunque para obtener una mayor reducción de la fracción insoluble probablemente se necesiten de tratamientos más severos, como temperaturas superiores a las del autoclavado, según los resultados obtenidos por Soto *et al.* (2010).

Un tratamiento enzimático con ligninasas sería un método para degradar la lignina presente en el pergamino de café, y de esta forma se obtendría un mayor acceso a la celulosa por las enzimas celulasas, sin tener que realizar pretratamientos con temperaturas elevadas, tal como lo exponen Dávila & Vásquez-Duhalt (2006).

Al no haber un efecto importante sobre la fracción insoluble de los pretratamientos y tratamientos enzimáticos, se consideró utilizar el pergamino únicamente molido para aplicarlo en galletas.

En el análisis de conglomerados realizado a partir de los resultados del panel de consumidores con las galletas que contenían 4 niveles de pergamino de café molido (0%, 1%, 2%, 5%), se obtuvieron 2 grupos de personas que evaluaron de manera distinta su

agrado por los tipos de galletas. El grupo con mayor número de personas se inclinó hacia las galletas con fibra, y la galleta con 0% de pergamino obtuvo la aceptación más baja. Estos resultados evidencian que el pergamino de café es un ingrediente potencial para enriquecer productos alimenticios como las galletas, y que la textura que aportó la fibra es deseable en las personas interesadas en consumir productos alimenticios que la contengan, ya que en el panel se comunicó que las galletas a evaluar contenían fibra.

El segundo y más pequeño grupo del análisis de conglomerados mostró un mayor agrado hacia las galletas con bajos niveles de fibra (0% y 1%) mientras que los productos con 2% y 5% tuvieron bajas puntuaciones. Esto indica que estos consumidores percibieron la textura fibrosa como una característica indeseable en los productos alimenticios, y, por lo tanto, no serían consumidores potenciales de galletas que contengan pergamino de café molido y probablemente ningún tipo de fibra.

La galleta con 2% fue la que obtuvo la mayor aceptación sensorial en el grupo que mostró agrado hacia las galletas con fibra. Este contenido de fibra es inferior al utilizado en otras investigaciones que utilizan fibras de melocotón, limón, manzana, cascarilla de trigo y maíz (Grigelmo-Miguel *et al.*, 2001; Soto-Mendivil *et al.*, 2001; Bilgiçli *et al.*, 2007).

El pergamino de café ultrasonicado disminuyó la dureza de la galleta a la que fue añadida. Sin embargo, la mayoría de los panelistas prefirió el producto sin este tratamiento, lo cual posiblemente se encuentre relacionada con la textura fibrosa que agradó al grupo 1 obtenido en el análisis de conglomerados.

La capacidad antioxidante del pergamino de café se mantuvo aún con las temperaturas del horneado. Probablemente la fibra dietética insoluble contribuyó a mantener los antioxidantes luego del proceso térmico. Debido a que el pergamino posee 88,7% de fibra dietética total y una estructura anatómica compleja con fibras en forma de red y 25% de lignina, la cual protege a la celulosa de actividades enzimáticas de los microorganismos, es posible que, de igual forma, los antioxidantes del pergamino fueran protegidos de la alta temperatura. Adicionalmente, se puede sugerir que el corto tiempo

de horneado (10 min) no afectó a los antioxidantes presentes. Esto supone otra ventaja de enriquecer con fibra de pergamino productos de panadería.

El pergamino se compone de fibroesclereidas, las cuales son células de paredes gruesas, duras y lignificadas (Flores-Vindas, 1999; Izco *et al.*, 2004), que fueron las responsables de la resistencia ante los pretratamientos y tratamientos enzimáticos utilizados.

8 Conclusiones y recomendaciones

La naturaleza y disposición de los componentes de la fibra dietética en el pergamino de café implica que, para poder separar las fibras individuales se realicen tratamientos severos sobre su estructura, como el uso de temperaturas elevadas (arriba de 300 °C).

El panel sensorial realizado a las galletas con pergamino de café tratado y sin tratar reveló que no es necesario realizarle un pretratamiento o tratamientos con enzimas para obtener un producto alimenticio con aceptación sensorial.

Se necesita de pequeñas cantidades de pergamino de café para poder enriquecer con fibra un producto alimenticio, debido a que presenta una elevada cantidad de fibra insoluble.

Las personas que prefieren los productos fibrosos serían los potenciales consumidores de una galleta que contenga pergamino de café sin tratamiento dentro de su composición y representan el 70% de la población evaluada.

La dureza de la galleta con pergamino de café disminuyó cuando el ingrediente fue sometido al tratamiento con ultrasonido, lo cual no fue aceptable sensorialmente por los panelistas.

Los consumidores de galletas prefieren aquellas que exhiban características de crujencia y dureza.

Se necesitan tiempos de incubación con enzimas celulasas mayores a 24 horas sobre el pergamino de café para obtener una depolimerización de la celulosa mayor al 20% cuando se ha aplicado ultrasonido previamente.

La ultrasonicación es un método eficaz para lograr lisis celular de las paredes del pergamino de café y lograr una liberación de sus estructuras internas.

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación, se realizan las siguientes recomendaciones:

Elaborar distintos productos de panadería utilizando pergamino de café, como pan o pasteles, y por medio de un panel sensorial determinar el porcentaje de pergamino idóneo para lograr una buena aceptación por parte de los consumidores en cada uno de los productos.

Realizar un estudio de los consumidores con la galleta de pergamino de café al 2% sin tratamiento, ahondando en la percepción de estos respecto a su opinión del producto, empaque y precio ideal para ellos si este se distribuyera en el mercado.

9. Bibliografía

- Adams, M. & Ghaly, A. E. 2007. Maximizing sustainability of the Costa Rican coffee industry. *Journal of Cleaner Production* 15: 1716-1729.
- Aehle, W. 2007. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Tercera Edición. Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. Capítulo 1.
- Agustiniano-Osorno, J. C. 2004. Obtención de almidón resistente mediante extrusión a partir de almidón de mango *Mangifera indica* L. (Var. Tommy Atkins). Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Ajila, C.M., Leelavathi, K. & Rao, U.J.S.P. 2008. Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science* 48: 319-326.
- Almajano, M.P. 2009. Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de goji. Consorci Escola Industrial de Barcelona.
- Amador-Ramírez, E. 2001. Efecto de tratamiento enzimático con celulasa y pectinasa sobre la fibra dietética y la digestibilidad in vitro de la proteína y del almidón del frijol negro *Phaseolus vulgaris* variedad brunca. Trabajo final de graduación. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica.
- AOAC. 1990a. Official Methods of Analysis. 925.10. Moisture in flour-air oven methods. AOAC International.
- AOAC. 1990b. Official Methods of Analysis. AOAC 923.03. Determination of ash in foods. methods. AOAC International.
- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis. Aerobic plate count. AOAC International.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 945.16. Crude fat. AOAC International.
- AOAC. 2005a. Official Method 991.43 Total, soluble, and insoluble dietary fiber in Foods. AOAC International.

- AOAC. 2005b. Official Methods of Analysis. 979.09. Protein in grain: Kjeldahl Method. International.
- Arellano-González, M.A. 2009. Estimación de la capacidad antioxidante de ácidos hidroxicinámicos obtenidos de la pulpa de café. Tesis de especialización en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Arrigoni, E. 2001. Enzymatic modification of dietary fiber sources. En: Cho, S.S (editor) Handbook of Dietary Fiber. Marcel Dekker, Inc.
- Attri, M., Maninder, A. & Kaur, L.S. 2013. Production and partial purification of microbial enzymes cellulase and laccase using a laboratory designed solid state fermenter. International Journal of Applied Research and Studies 2(8): 1-8.
- Avallone, S., Guiraud, J.P., Guyot, B., Olguin, E. & Brillouej, M. 2001. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 5556-5559.
- Azuola, R. & Vargas, P. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Tecnología en Marcha 20(4): 30-40.
- Badui, S. 2005. Química de los alimentos. Pearson Education. México.
- Barzana, E., Rubio, D., Santamaría, R.I., García-Correa, O., García, F., Ridaura-Sanz, E. & López-Munguía, A. 2002. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold lower (*Tagetes erecta*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 4491-4496.
- Bekalo, S.A. & Reinhard, H.W. 2010. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. Materials and structures 43(8): 1049-1060.
- Bilgiçli, N., İbanoglu, S. & Nur, H.E. 2007. Effect of dietary fibre addition on the selected nutritional properties of cookies. Journal of Food Engineering 78(1): 86-89.
- Bohórquez-Santana, W. 2011. Papel de la interacción de calcio y boro en el ennegrecimiento de los pétalos en rosa (*Rosa sp.*). Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar el título de Magister en Ciencias Agraria-Fisiología de cultivos. Universidad Nacional de Colombia.

- Boobier, W.J. 2006. Desarrollo de una galleta saludable: un enfoque alternativo a la fabricación de galletas. *Nutrition Journal* 5: 7-7
- Borrelli, R.C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A. & Fogliano, V. 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1338-1343.
- Braham, J.E. & Bressani, R. 1979. Coffee Pulp:Composition, technology, and utilization. Institute of Nutrition of Central America and Panama. Canada.
- Bunzel, M. & Ralph, J. 2006. Characterization of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8352-8361.
- Canett-Romero, R., Ledesma-Osuna, A. I.; Robles-Sánchez, R.M., Morales-Castro, R., León-Martínez, L. & León-Gálvez, R. 2004. Caracterización de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(1): 93-99.
- Cardona-Alzate, .C.A. & Orrego-Alzate, C.E. 2009. Avances investigativos en la producción de biocombustibles. Universidad Nacional de Colombia. ISBN: 978-958-44-5261-0.
- Carpenter, R.P., Lyon, D.H. & Hasdell, T.A. 2000. Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos'. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Ed. Acribia: España.
- Castelucci, F. 2009. RESOLUCIÓN OIV/OENO 313/2009. CODEX. Hemicelulasas.
- Cayo-Álvarez, E. & Matos-Chamorro, A. 2009. Obtención de fibra insoluble a partir de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*). *Revista de Investigación Universitaria* 1(1): 25-30.
- Chacón-Martínez, M. 1983. Sustitución parcial de harina de trigo utilizando harina de arroz, banano, soya y yuca. Caracterización de sus propiedades y posible utilización en galletería comercial. Tesis de grado presentada a la Carrera interdisciplinaria en Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.

- Clark, R. & Jhonson, S. 2002. Sensory acceptability of foods with added Lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel fiber using pre-set criteria. *Journal of Food Science* 67(1): 356-362.
- Cockburn, D.W., Vandenende, C. & Clarke, A.J. 2010. Modulating the pH-activity profile of cellulase by substitution: Replacing the general base catalyst Aspartate with Cysteinesulfinate in cellulase A from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry* 49(9):2042-50.
- Cuervo, L., Folch, J.L. & Quiroz, R.S. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología* 13(3): 11-25.
- Daou, C. & Zhang, H. 2011. Physico-chemical properties and antioxidant activities of dietary fiber derived from defatted rice bran. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3(5): 339-347.
- Dávila, G. & Vázquez-Duhalt, R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico* 30: 29-55.
- Dávila, I.C.A., Rivera, M.A.C., Díaz, M.A.H., Nava, A.E.L. & Radomile, A.C.M. 2012. Extracción de pectina de alto metoxilo a partir de cascaras de parchita para la producción de mermelada. Universidad de los Andes. Escuela de Ingeniería química.
- Decreto N° 30256-MEIC-S RTCR 135:2002. Etiquetado Nutricional de los Alimentos Preenvasados. Costa Rica.
- Delgenes, J.P., Penaud, V. & Moletta, R. 2003. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. *Applied Chemistry Solid Wastes* 201-228.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S. & Lele, R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current Status and Future Prospects 52: 794-804.
- Díaz-Rubio, M. E. & Saura-Calixto, F. 2007. Dietary fiber in brewed coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1999-2003.
- Dórea, J.G. & da Costa, T.H; 2005. Is coffee a functional food? *British Journal of Nutrition* 93: 773-782.

- Escudero, E. & González, P. 2006. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria* 21(2):61-72.
- Esquivel-Solís, V. & Alvarado, M.V. 2009. Estado nutricional de mujeres con sobrepeso y obesidad del área de cobertura del Programa de Atención Integral en Salud (PAIS) 2006. *Acta Médica Costarricense* 51(4): 222-228.
- FAO. 1997. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Dirección de Alimentación y Nutrición Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Chile.
- FAO. 2007. Report On Functional Foods. Rome, Italy.
- Faridi, H., Gaines, S.C. & Strouts, B.L. 2000. Handbook of cereal science and technology. 2a Edición. Marcel Dekker, Inc.
- Ferrer, J., Páez, G., Chirino, M. & Mármol, Z. 1995. Ensilaje de la pulpa de café. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ* 12: 417-428.
- Ferrer, J., Páez, G., Arenas de Moreno, L., Chandler, C., Mármol, Z. & Sandoval, L. 2002. Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía* 19(1): 23-33.
- Flores-Vindas, E. 1999. La planta. 3ª edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Costa Rica.
- Fogliano, V. 2006. Melanoidins and dietary fiber: closer than expected. *Research Commentaries for Members of The International Maillard Reaction Society*. 1(3): Julio.
- Fogliano, V. 2009. Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 19: 283-290.
- Galdeano, M.C. & Grossmann, M.V.E. 2006. Oat hulls treated with alkaline hydrogen peroxide associated with extrusion as fiber source in cookies. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26(1): 123-126.
- García, J.R., de La Rosa, L.A., Duenez, B.H., González, A.G., López-Díaz, J.A., González-Aguilar, G.A., Ruiz-Cruz, S. & Álvarez-Parrilla, E. 2011. Cuantificación de polifenoles

- y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México. *Tecnociencia Chihuahua* 5(2): 67-75.
- García-Peris, P., Bretón-Lesmes, I., de la Cuerda, C. & Cambor-Álvarez, M. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición hospitalaria* 17(2): 11-16.
- Garro, G. 2008. Biotecnología de enzimas: celulasas. *Alimentaria* 96: 38-42.
- Gartzia, I., Sánchez Alonso, I., Ricondo, Z. & Ayo, J. 2007. Agrofibra: desarrollo de ingredientes alimentarios a base de fibra dietética procedentes de residuos agroalimentarios. Convenio AZTI/DAPA. Informe Anual 2007 para la Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico-Viceconsejería de Política e Industria Alimentaria, Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación, Eusko Jaurlaritza. Gobierno Vasco.
- Giami, S. Y., Achinewhu, S.C. & Ibaakee, C. 2005. The quality and sensory attributes of cookies supplemented with fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook) seed flour. *International Journal of Food Science & Technology* 40(6): 613-620.
- Gibson, G.R. 2007. Functional foods: probiotics and prebiotics. *Culture* 28(2): 1-8.
- Gil, A.H. 2010. Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Editorial Médica Panamericana. Madrid: España.
- Gómez-Calabrano, C.A. & Mora-Chesta, J.C. 2004. Evaluación del efecto de dos extractos vegetales (*Equisetum bogotense* y *Urtica dioica*) sobre el calibre y partidura de frutos de cerezo (*Prunus avium*) cv. bing, como alternativa al uso de productos comerciales, en angol IX región. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales como parte de los requisitos para optar al título de: Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Temuco.
- Gomide, J.L. & Demuner, B.J. 1986. Determinação do teor demlignina em material lenhoso: método Klason modificado. *O Papel* 47(8): 36-38.
- Grigelmo-Miguel, N., Carreras-Boladeras, E. & Martín-Belloso, O. 2001. Influence of the addition of dietary fiber peach in composition, physical properties and acceptability of reduced-fat muffins. *Food Science and Technology* 7(5): 425-431.

- Hasler, C.M. 2000. The changing face of functional foods. *Journal of the American College of Nutrition*. 19(5): 499S–506S.
- Higdon, J.V. & Frei, B. 2006. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46:101-123.
- Hoch, G 2007: Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Functional Ecology* 21:823-834.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. & Prior, R.L. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-Well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4437-4444.
- Izco, J.S., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J.A., Fernández, F., Gallardo, T., Llimosa, X., Prada, C., Talavera, S. & Valdéz, B. 2004. *Introducción a la botánica*. 2ª Edición. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España.
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R. & Saura-Calixto, F. 2011. Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5489-5493.
- Jones, P.J. 2002. Functional foods-more than just nutrition. *Canadian Medical Association*. 116(12): 1555-1563.
- Kamran, M., Saleem, N. & Umer, Z.N. 2008. Ready-To-Eat (RTE) wheat bran breakfast cereal as a high-fiber diet. *Journal of Food Processing and Preservation* 32:853-867.
- Kasai, N., Konishi, A., Iwai, K. & Maeda, G. 2006. Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6336-6342.
- Kasai, N., Murata, A., Hiroshi, I., Sakamoto, T. & Kahn, R.I. 2004. Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5709-5716.
- Kilara, A. & Desai, M. 2002. Enzymes. En: *Food additives*. Branen A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., & Thorngate, J. (Eds). CRC Press: New York.

- Kim, Y.J., Kim, D.O., Chun, O.Y., Shin, D.H., Jung, H., Lee, C.Y. & Wilson, D.B. 2005. Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5: 9560-9565.
- Korzen-Bohr, S. & O'doherty J. K. 2006. Heart disease among post-menopausal women: Acceptability of functional foods as a preventive measure. *Appetite* 46:152-163.
- Laclé-Murray, A. & Valero-Juan, L. F. 2008. Incidencia de diabetes tipo 2 en un área urbano marginal de Costa Rica. *AMC*. 50(1): 29-34.
- Lairon, D., Arnault, N., Bertrais, S., Planells, R., Clero, E., Hercberg, S. & Boutron-Ruault, M.C. 2005. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 82:1185-94.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P. & Saura-Calixto, F. 1997. Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4028-4031.
- Lee, K.A. & Brennan, C.P. 2005. Physico-chemical, textural and sensory properties of a fried cookie system containing soy protein isolate. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 501-508.
- León, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. Editorial Agroamérica, IICA, San José, Costa Rica.
- Lezcano, E. 2011. Informe de producto: Galletitas y bizcochos. Alimentos Argentinos.
- Londoño-Londoño, J.A. 2010. Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos: extracción y caracterización de flavonoides. *Disertaciones Administrativas y Agropecuarias: gestión y competitividad*.
- Maldonado, R. & Pacheco de Delahaye, E. 2000. Elaboración de galletas con una mezcla de harina de trigo y de plátano verde. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(4): 387-393.
- Marchena-Rojas, G. 2012. Proceso diagnóstico para la detección de Cáncer de colon y recto. *Revista Enfermería Actual en Costa Rica* 23:1-14.

- Martínez, O.L.A., Román, M.O.M., Gutiérrez, E.L.E., Medina, G.B.M., Cadavid, M.C. & Flórez, O.A.A. 2008. Desarrollo y evaluación de un postre lácteo con fibra de naranja. *Vitae* 15(2):219-225.
- Menéndez, J.A., Domínguez, A., Fernández, Y. & Pis, J.J. 2007. Evidence of self-gasification during the microwave-induced pyrolysis of coffee hulls. *Energy and Fuels* 21:373-378.
- Mikán-Venegas, J.F. & Castellanos-Suárez, D.E; 2004. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4(1): 58-71.
- Milkjovick, D., Duell, B. & Milkjovick, V. 2010. Methods for coffee cherry products. United States Patent. US 7,754,263 B2.
- Milner, J.A. 2010. Functional foods: the US perspective. *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1654S-9S.
- Molina, M., Lechuga, O.R. & Bressani, R. 1990. Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. *Agronomía Mesoamericana* 1: 79-82.
- Monro, J. A. 2004. Dietary Fiber. En: Nollet, L.M (Editor). *Handbook of Food Analysis*. 2ª Edición. Capítulo 22.
- Moragas, M., de Pablo, M.B. 2004. Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco.
- Murthy, P.S. & Naidu, M.M. 2010. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*. DOI 10.1007/s11947-010-0363-z
- Nabais, J.M.V., Nunes, P., Carrott, J.M., Carrott, M.L.R., García, A.M. & Díaz-Díez, M.A. 2008. Production of activated carbons from coffee endocarp by CO₂ and steam activation. *Full processing technology* 89: 262-268.

- Napolitano, A., Lanzuise, S., Ruocco, M., Arlotti, G., Ranieri, R., Halvor, R.S., Lorito, M. & Fogliano, V. 2006. Treatment of cereal products with a tailored preparation of *Trichoderma* Enzymes increases the amount of soluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7863-7869.
- Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A. & Ritieni, A. 2007. Natural Occurrence of ochratoxin A and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10499-10504.
- Napolitano, A., Costabile, A., Martin-Pelaez, S., Vitaglione, P., Klinder, A., Gibson, G. R. & Fogliano, V. 2009. Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 19: 283-290.
- Negesse, T., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2009. Nutritive value of some non-conventional feed resources of Ethiopia determined by chemical analyses and an in vitro gas method. *Animal Feed Science and Technology* 154: 204-217.
- Noriega-Salazar, A., Silva-Acuña, R. & García de Salcedo, M. 2009. Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal. *Zootecnia Tropical* 135-141.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M. & Oliveira-Brett, A.M. 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phasehigh-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta* 630: 107-115.
- O'Connell P. & Guilbault G.G. 2003. Enzymes and Food Analysis. En: Whitaker J.R., Voragen A. G. J. & Wong D.W.S. (Editores). *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA. Capítulo 25.
- Ogawa, J. & Shimizu, S; 2004. Enzymes. Capítulo 10. Marcel Dekker, Inc.
- Ognean, M., Darie, N. & Ognean, C.F. 2006. Wheat fiber as additives in reduced calories wheat bread-part one: dough and bread properties. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 12(1): 37-42.

- Omojasola, P.F., Jilani, O.P. & Ibiyemi, S.A. 2008. Cellulase Production by some fungi cultured on pineapple waste. *Nature and Science* 6(2): 64-79.
- Ortiz, M.L. 2009. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia* 13(2):137-144.
- O'Shea, N., Arendt, E.K. & Gallagher, E. 2012. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 16:1-10.
- Özcan, E. 2006. Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace. A thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of middle east technical university.
- Pacheco-Reyes, I. 2009. Evaluación del efecto de sonicación-microondas en el beneficio de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Instituto politécnico nacional. Oaxaca, México.
- Padrón-Pereira, C.A., Moreno-Álvarez, M.J., Montes-Hernández, A.I. & Oropeza-González, R.A. 2009. Obtention of enzymatically hydrolyzed flour from epiphytes cactus phyllocladia (*Epiphyllum hookeri* (Link and Otto) Kimn.) *African Journal of Food Science* 3 (9): 262-269.
- Pandey, A., Soccol, C., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R. & Roussos, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 6: 153-162.
- Pareyt, B. & Delcour, J.A. 2008. The role of wheat flour constituents, sugar, and fat in low moisture cereal based products: A review on sugar-snap cookies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:824-839.
- Parkin K.L. 2008. Enzymes. En: Damodaran, S., Parkin, K.L. & Fennema, O.R. (editores). *Fennema's Food Chemistry*. Cuarta Edición. CRC Press: Florida, Estados Unidos.
- Pereira, J., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, I., Ferreres, F., Bento,

- A., Seabra, R. & Estevinho, L. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chemistry of Toxicology* 45(11):2287-2295.
- Perez-Váladez, E. 2010. Estudio *in vitro* e *in vivo* del proceso digestivo de fibra dietética y almidón resistente. Protocolo de investigación para obtener el grado de maestro en ciencias biológicas. Universidad Michoacana. Facultad de químico farmacobiología. México.
- Pernalete, Z., Piña, F., Suárez, M., Ferrer, A. & Aiello, M.C. 2008. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: Efecto de la humedad del bagazo y la carga del amoniaco. *Bioagro* 20(1): 3-10.
- Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H. & Sedaghat, N. 2012. Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *Food Science and Technology* 50(2): 599-606.
- Pozuelo, M.J., Agis-Torres, A., Hervert-Hernández, D., López-Oliva, M., Muñoz-Martínez, E., Rotger, R. & Goñi, I. 2012. Grape antioxidant dietary fiber stimulates *Lactobacillus* growth in rat cecum. *Journal of Food Science* 77(2): H59-H62.
- Quiñones, M, Miguel, M. & y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria* 27(1):76-89.
- Quirk, A., Clarke, A., Lipkowski, J., Cockburn, D. & Glickman, D. 2009. Real-time observation of cellulose biodegradation by atomic force microscopy. *Bioenergy-II: Fuels and Chemicals from Renewable Resources*. ECI Symposium Series, Volume 10.
- Quiroz-Reyes, C.N., Aguilar-Méndez, M.A., Ramírez-Ortíz, M.E. & Ronquillo de Jesús, E. 2012. Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12(1): 11-18.
- Quirrasco-Baruch & López Munguía. 2006. Enzimas. En: Badui, S.D. *Química de los alimentos*. 4a Edición. Pearson Educación.

- Raghuveer, C. & Tandon R.V. 2009. Consumption of functional food and our health concerns. *Pakistan Journal of Physiology* 5(1): 76-83.
- Ramírez, A. & de Delahaye, E. 2008. Elaboración de una galleta dulce tipo wafer con fibra y sin azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía* 34: 263-276.
- Ramírez-Martínez, A. 2012. Internal structure and water transport in endosperm and parchment of coffee bean. Tesis para obtener el grado de Doctor en Mecánica de Ingeniería Civil. Universidad de Montpellier, Francia.
- Rettenmaier, J. & Söhne. sf. Data sheet. Vitacel wheat fibre. grade WF 600.
- Rodríguez-Valencia, N. 1999. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. Seminario Internacional gestión de residuos sólidos y peligrosos, siglo XXI. Cenicafé. Colombia.
- Román M.M.O. & Valencia, F.E.G. 2006. Evaluación de galletas con fibra de cereales como alimento funcional. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 13(2): 36-43.
- Romanchik-Cerpovicz, J.E., Tilmon, R.W. & Baldree, C.A. 2002. Moisture retention and consumer acceptability of chocolate bar cookies prepared by okra gum as a fat ingredient substitute. *Journal of the American Dietetic Association* 102(9): 1301-1303.
- Rosero-Bixby, L.; Brenes-Camacho, G. & Méndez-Chacón, E. 2008. Obesidad, envejecimiento y mortalidad en Costa Rica. *Sociedad y Adulto Mayor en América Latina. Estudios sobre Envejecimiento en la Región, Rio de Janeiro, Brasil: ALAP Editor, UNFPA.*
- Rubio, M.M. & Usaquén-Castro, X.P. 2005. Evaluación del efecto de pre-tratamientos con ultrasonido sobre el nivel de extracción y la actividad de sustancias antioxidantes contenidas en el bagazo de uva (*Vitis vinifera*). Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero en Producción Agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana, Colombia.
- Sakac, M., Gyura, J., Misan, A., Seres, Z. & Pajin, B. 2011. Antioxidant properties of cookies supplemented with sugar beet dietary fibre. *Tecnology* 151-156.

- Sáyago-Ayerdi, S., Arranz, S., Serrano, J. & Goñi, I. 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7886-7890.
- Saura-Calixto, F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: A New Concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4303-4306.
- Saura-Calixto, F. 2010. Antioxidant dietary fiber: a new functional ingredient. *Ernährung/Nutrition* 34: 509-514.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 43-49.
- Sharif, M.K., Masood, S.B., Faqir, M. A. & Nawaz, H. 2009. Preparation of fiber and mineral enriched defatted rice bran supplemented cookies. *Pakistan Journal of Nutrition* 8(5): 571-577.
- Scheller, H. V. & Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61:10.1-10.27.
- Segura, F.S., Echeverri, R.F., Patiño, A.C.L. & Mejía, A.I.G. 2007. Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *VITAE* 14(1): 72-81.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite* 51: 456-467.
- Soto, N.A., Ruíz-Machado, W. & López-López, D. 2010. Determinación de los parámetros cinéticos en la pirólisis del pino ciprés. *Química Nova* 33(7): 1500-1505.
- Soto-Mendivil, E.A. & Vidal-Quintanar, R.L. 2001. Evaluation of nixtamalized corn hull as fiber source in baking products. *Food Science and Technology International* 7(4): 355-361.
- Spiridon, I. & Popa, V.I. 2005. *Hemicelluloses: Structure and Properties*. Marcel Dekker, Inc.
- Sriwattana, S., Laokuldilok, N. & Prinyawiwatkul, W. 2008. Sensory optimization of broken-rice based snacks fortified with protein and fiber. *Journal of Food Science* (73): 6-S333-S338.

- Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Van Sinderen, D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 198-203.
- Sun, J.X., Mao, F.C. & Sun, R.C. 2004. Comparative study of hemicelluloses isolated with alkaline peroxide from lignocellulosic materials. *Journal of wood chemistry and technology* 24 (3): 239-262.
- Sun-Waterhouse, D., Melton, L.D., O'Connor, C.J., Kilmartin, P.A. & Smith, B.G. 2008. Effect of apple cell walls and their extracts on the activity of dietary antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 289-295.
- Swanson, M.J.K., Petran, R.L. & Hanlin, J.H. 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms. En: Pouch-Downes, F; Ito, K. (Eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4. ed. American Public Health Association: Washington DC.
- Tan, H., Yang, R., Sun W. & Wang. 2010. Peroxide-acetic acid pretreatment to remove bagasse lignin prior to enzymatic hydrolysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49(4): 1473-1479.
- Torres-Castro, M.P. & Vargas-Aguilar, G.M. 2010. Modificación enzimática de la fibra dietaria del pergamino de café (*Coffea arabica* L.). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1(2): 262-271.
- Valdez-Martínez, S.E. 2006. Polisacáridos. Pearson Education En: Badui, S. *Química de los Alimentos*. Capítulo 2.
- Villanueva, N.D.M., Petenate, A.J. & Da Silva, M.A.A.P. 2005. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. *Food Quality and Preference* 16:691-703.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K. & Cameron, R.G. 2007. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology* 98: 1596-1601.
- Viquez-Ugalde, R. 2007. Efecto de la sustitución de harina por fibra sobre las características de calidad del pan dulce. Proyecto de Graduación presentado como

requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Escuela de Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica.

- Wong, K.H. & Cheung, P.C.K. 2005. Dietary Fibers from Mushroom *Sclerotia*: 1. Preparation and physicochemical and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9395-9400.
- Wu, H., Dwyer, K.M., Fan, Z., Shircore, A., Fan, J. & Dwyer, J.H. 2003. Dietary fiber and progression of atherosclerosis: the Los Angeles. *Atherosclerosis Study*. *American Journal of Clinical Nutrition* 78:1085-91.
- Wyman, C.E., Decker, S.R.; Himmel, M.E., Brady, J.W. & Skopec, C.E. 2005. En Dumitriu, S. (Ed). Capitulo 43. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. CRC Press: New York.
- Yang, B. & Wyman, C.E. 2006. BSA Treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 94(4): 611-617.

Apéndice.

Pruebas preliminares

Definición de la concentración del porcentaje de pergamino de café en la galleta

Para definir la concentración de fibra en las galletas, se elaboraron galletas dulces que contenían 50,4% de harina de trigo, 24,15% de mantequilla, 15,45% de azúcar, 8,05% de huevo y 2% de vainilla. Se agregó a los productos diferentes porcentajes de fibra (1%, 5%, 7% y 10%), y se compararon con una galleta control (0% fibra), por medio de una prueba sensorial con un grupo pequeño de personas (4 panelistas). Se utilizó la fibra comercial marca Vitacel® WF 600, la cual es usada especialmente en productos de panadería (Ramírez & de Delahaye, 2008) y se extrae de las partes que forman la estructura del trigo mediante un procesamiento especial termo-dinámico y de refinamiento (Viquez-Ugalde, 2007). Este tipo de fibra es micro fina, de color blanco, olor y sabor neutro. La longitud promedio de las fibras es de 80 μm . Tiene capacidad de ligar agua de 480% y una absorción de agua de 370%, haciendo que por cada gramo de fibra se deben adicionar 3,8 gramos de agua (Ramírez & de Delahaye, 2008). Posee un 97% de fibra dietética (Ognean *et al.*, 2006; Viquez-Ugalde, 2007; Rettenmaier & Söhne, *sf.*), de la cual el 94,5% pertenece a fibra dietética insoluble y el 2,5% a fibra soluble. Su composición se basa en 74% celulosa, 26% hemicelulosa y 0,5% lignina. Es libre de gluten y ácido fítico (Viquez-Ugalde, 2007; Rettenmaier & Söhne, *s.f.*).

En el panel se determinó que el límite de aceptación sensorial de las galletas con fibra Vitacel® fue de 5%, ya que al 1% no había diferencias en la textura comparada con la galleta control, al 5% se percibía la fibra añadida pero el producto aún seguía siendo aceptable, y al 7 % y 10%, las características de la masa habían cambiado por completo, pues presentaban una apariencia reseca y se percibía la fibra con una mayor intensidad, lo cual no fue aceptable desde el punto de vista sensorial. Por lo tanto, se definieron los

porcentajes de pergamino de café que serían agregados a las galletas en 4 niveles: 0%, 1%, 2% y 5%.

Cabe destacar que la fibra Vitacel® se hidrata en una proporción de 1 g fibra/3,8 g de agua por lo que se utilizó esta misma proporción de fibra: agua utilizando el pergamino de café, y éste no absorbió el agua añadida. Esto implicó que no fue necesario agregar agua a la formulación de las galletas con pergamino.

Definición del tamaño de la malla de molienda del pergamino de café

Luego de definir los porcentajes de fibra de pergamino que serían agregados a la galleta control, fue necesario determinar si éste podría agregarse a la masa de la galleta entero, o si era necesario molerlo. Por lo tanto, se elaboraron galletas con 5% de pergamino de café entero y sometido a molienda en un molino de martillos, con los siguientes diámetros de malla: 0,60 mm y 0,33 mm. Por lo tanto, hubo 2 tipos de galletas según el diámetro de la malla con el que fue molido el pergamino de café.

Se percibió una textura dura y difícil de masticar en las galletas con pergamino sin moler y el que fue molido en la malla de 0,60 mm. Sin embargo, la galleta con pergamino molido en malla 33 (0,33 mm de diámetro) fue aceptada sensorialmente, y no se describió la sensación dura y desagradable al masticar; por lo tanto, fue elegida para la molienda del pergamino en todas las pruebas.

Definición de la relación agua:pergamino utilizada en la ultrasonicación del pergamino de café

El pergamino de café se sometió a ultrasonicación con el objetivo de determinar si este tratamiento produciría algún efecto tanto en la disminución de sus fracciones insolubles y solubles, por medio de determinación de las mismas, así como en su estructura anatómica, por medio de visualización microscópica. Se utilizó un equipo de ultrasonido Misonix Ultrasonic Liquid Processor modelo S4000 y se determinó la relación agua:pergamino que se utilizaría en la investigación, realizando pruebas con diferentes pesos en gramos de pergamino y volúmenes de agua en mililitros. El equipo consta de una pieza cilíndrica llamada convertidor, que cambia las señales eléctricas a vibraciones mecánicas y se encuentra conectada a una sonda que genera vibración acústica y posee una punta que se introduce en la muestra.

Se probaron diferentes relaciones pergamino:agua, hasta que se obtuvo un burbujeo en la muestra, que indicó que el proceso de ultrasonido se estaba realizando eficientemente. Por lo tanto, 30g de pergamino y 300mL de agua fueron las cantidades que se utilizaron para los procesos de ultrasonido, variando los tiempos y las potencias aplicadas a la muestra en las pruebas definitivas.