

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de proyecto de graduación para
optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

*Evaluación del efecto de la ultrafiltración, la diafiltración y de las condiciones de
secado por atomización para la obtención de un extracto de broza de café en
polvo rico en antocianinas*

Elaborado por

Grettel Zúñiga Barrantes

Carné: B07063

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica

2017

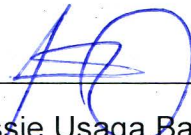
Tribunal examinador

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:

Grettel Zúñiga Barrantes

Aprobado por:



Ph.D. Jessie Usaga Barrientos
Presidente del tribunal



Ph.D. Elba Cubero Castillo
Directora del proyecto



Ph.D. Ana Ruth Bonilla Leiva
Asesora del proyecto



M. Sc. Marvin Soto Retana
Asesor del proyecto



Ph.D. Ana Mercedes Pérez
Profesor designado

Dedicatoria

A mis padres y hermanas que confiaron en mí cuando yo no lo hice.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por permitirme llegar hasta acá, porque me dio la fuerza y la sabiduría desde el momento en que decidí trasladarme de carrera, y ha guiado mi camino, hasta convertirme en profesional.

Gracias mami y papi por convertirme en la persona que soy, porque no me premiaron por mis buenas notas, a pesar de ser mejores que las de los demás, y aunque yo no lo entendía muy bien, me enseñaron a ser perseverante y esforzarme porque es mi responsabilidad y no por obtener un bien material. Gracias a mis grandes ejemplos, a Celi y a Isa, mis hermanas, por amarme, soportarme y ayudarme aunque no entendieran nada de lo que les explicaba. Por escuchar mis exposiciones y mis problemas con amor y paciencia, como nadie, son un gran ejemplo de mujeres, profesionales y seres humanos.

Gracias profe Elba, por tanta paciencia y apoyo, por llenarme de paz, gracias por creer en mí. También a la profe Ana Ruth y a Marvin por guiarme y ayudarme en este proyecto. Gracias a la profe Graciela y Carolina, del CITA, por ayudarme en los análisis de muestras y hasta en los cálculos cuando lo necesité.

Infinitas gracias a Cama, quien no solo fue un asistente de planta, sino un gran amigo, que me apoyó, acompañó, escuchó y aconsejó, gracias por siempre sacarme una sonrisa. Muchas gracias Giova y a Luis por tanta ayuda y consejos.

Gracias a mis TA's por recorrer tan largo camino juntas, a vos Mari mi gran amiga y compañera de reportes, estudiadas y trabajos, pero también de vida. A Camilo por tantas veces escucharme, aconsejarme y ser mi amigo. Gracias Sol por tantas risas, buenos recuerdos e incondicional amistad. Gracias Naty y Vale por ser tan pacientes y humildes y ser un gran ejemplo de personas a quienes admirar. Gracias a Andre, Davicito, Silvia, Henry, Pri, Marie, Fabi, Caro y Bea por dejar tan buenos recuerdos en mi mente.

Índice general

Tribunal examinador	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos	iii
Índice general	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de cuadros.....	ix
Abreviaturas.....	x
Resumen	xi
I. Justificación	1
II. Objetivos.....	7
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos específicos	7
III. Marco teórico	8
3.1 Antocianinas	10
3.1.1 Estructura química	10
3.1.2 pH.....	11
3.1.3 Copigmentación.....	12
3.1.4 Temperatura	13
3.1.5 Azúcares.....	14
3.1.6 Enzimas.....	15
3.2 Secado	15
3.2.1 Generalidades	15
3.2.2 Secado por atomización	16
3.2.3 Factores operacionales.....	19
3.2.4 Temperatura de transición vítrea	23
3.2.5 Uso de recubrimientos en el secado por atomización	25
3.3 Tecnología de membranas	27
3.3.1 Generalidades	27
3.3.2 Proceso de separación	29
3.3.3 Tipos de separación	31

3.4	Superficie de respuesta	32
3.5	Análisis de Componentes Principales (PCA).....	38
IV.	Materiales y métodos	41
4.1	Localización	41
4.2	Materias primas	41
4.3	Efecto del proceso membranario en la reducción del contenido de azúcares del extracto de broza de café.....	41
4.3.1	Obtención del extracto de broza de café.....	41
4.3.2	Equipos empleados en el proceso de membranas.....	42
4.3.3	Elección de la membrana que permita la mayor retención de antocianinas y menor retención de azúcares durante la ultrafiltración (Pruebas preliminares).....	44
4.3.4	Evaluación del proceso membranario en la reducción de azúcares de un extracto de broza de café	45
4.4	Efecto del proceso membranario en el secado del extracto de broza de café y la calidad del polvo final	47
4.4.1	Equipo empleado en el secado del extracto de broza de café sometido al proceso membranario.....	47
4.4.2	Evaluación del efecto de la diafiltración en el extracto de broza de café sobre el proceso de secado por atomización	49
4.4.3	Diseño experimental	50
4.4.4	Análisis de datos.....	50
4.5	Condiciones de secado por atomización y su efecto en las características de un polvo rico en antocianinas.....	50
4.5.1	Preparación de las muestras antes del secado (adición de recubrimiento)	50
4.5.2	Condiciones de secado.....	51
4.5.3	Diseño experimental	51
4.5.4	Análisis estadístico	53
4.5.5	Análisis de Componentes Principales	53
4.5.5	Validación de las condiciones predichas por el modelo	53
4.6	Métodos de análisis	54
4.6.1	Determinación de azúcares totales	54
4.6.2	Determinación de la acidez total expresada como equivalentes de ácido cítrico.....	54

4.6.3	Determinación de la humedad o materia seca	55
4.6.4	Determinación de la densidad “bulk”	55
4.6.5	Determinación de antocianinas totales.	55
4.6.6	Determinación del índice del oscurecimiento	57
4.6.7	Determinación instrumental del color	57
4.6.8	Determinación del rendimiento másico	57
4.6.9	Determinación de cianidina 3-rutinósido por HPLC.....	58
4.6.10	Determinación del índice de solubilidad en agua (WSI)	58
V.	Resultados y discusión	60
5.1	Efecto del proceso membranario en la concentración de antocianinas y la reducción del contenido de azúcares para facilitar el proceso de secado del extracto de broza de café	60
5.1.1	Efecto de la microfiltración sobre compuestos del extracto de broza de café.....	60
5.1.2	Efecto de la ultrafiltración sobre el extracto de broza de café	64
5.1.3	Efecto de diafiltración sobre el contenido de azúcares, ácidos y antocianinas del extracto de broza de café.....	67
5.1.4	Efecto del secado por atomización sobre el rendimiento, la densidad “bulk”, el color y las antocianinas de un extracto de broza de café sometido a procesos de membrana.....	69
5.2	Optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café sometidos a procesos membranarios	79
5.2.1	Resultados de la Superficie de Respuesta.....	79
5.2.2	Aplicación del modelo de superficie de respuesta.....	80
5.2.3	Optimización del proceso de secado por atomización.....	86
5.2.4	Elección de las condiciones óptimas.....	94
5.2.5	Verificación de los modelos.....	96
VI.	Conclusiones.....	101
VII.	Recomendaciones.....	103
VIII.	Bibliografía	105
IX.	Anexos	115

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de tres antocianinas comunes.....	11
Figura 2. Variaciones de la estructura de las antocianinas en medios acuosos a diferentes pH.....	12
Figura 3. Etapas del proceso de secado experimentado por las gotas.	17
Figura 4. Evolución típica del contenido de humedad de las gotas durante el secado.	18
Figura 5. Representación de los estados de equilibrio y no equilibrio termodinámico y cambios en la movilidad molecular.	24
Figura 6. Tipos de alimentación en sistemas de membranas.	30
Figura 7. Representación gráfica en tercera dimensión (a) y gráfico de contorno (b) de una superficie de respuesta	34
Figura 8. Representación gráfica en 3D (a) y de contorno (b) del punto máximo de una superficie de respuesta	34
Figura 9. Representación gráfica en 3D (a) y de contorno (b) del punto mínimo de una superficie de respuesta.	35
Figura 10. Representación gráfica en 3D (a) y de contorno (b) del punto sillín o silla de montar de una superficie de respuesta.	35
Figura 11. Diseño de Box – Behnken (a) y diseño central compuesto (b) para tres niveles.....	37
Figura 12. Representación gráfica de un análisis de componentes.	40
Figura 13. Esquema de la unidad piloto de ultra- y nanofiltración tangencial empleada en los procesos de ultra y diafiltración de un extracto de broza de café.	43
Figura 14. Diagrama del proceso para la obtención de un producto en polvo rico en antocianinas a partir de un extracto de broza de café	46
Figura 15. Esquema del equipo de secado por atomización Büchi Mini Spray Dryer B-290 empleado para secar el extracto de broza	48
Figura 16. Efecto de la microfiltración sobre el contenido de antocianinas, sólidos totales, azúcares totales, ácido cítrico e índice de oscurecimiento de un extracto de broza de café en la alimentación y en el permeado.	61
Figura 17. Efecto de la ultrafiltración sobre el contenido de antocianinas, sólidos totales, azúcares totales y ácido cítrico de un extracto de broza de café medidos en el retenido y el permeado.....	65
Figura 18. Porcentajes de retención de cianidina 3-rutinósido y azúcares de las diferentes etapas del proceso membranario y de secado por atomización en el retenido a través de las membranas y el producto seco.....	75
Figura 19. Fotografía del polvo de extracto de broza de café, diafiltrado y secado por atomización, reconstituido en agua.	77
Figura 20. Polvo de extracto de broza de café luego del procedimiento para determinar WSI.	78

Figura 21. Análisis de componentes principales para evaluar la variabilidad (la discriminación) entre tratamientos con base en las variables respuesta en la superficie de respuesta.....	84
Figura 22. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) del rendimiento del polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.	88
Figura 23. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) de la densidad "bulk" del polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.....	90
Figura 24. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) de la tonalidad (h^0) del polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.....	91
Figura 25. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) de la concentración de cianidina 3- rutinósido en el polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.	93
Figura 26. Gráfico de contorno de las superficies de respuesta del rendimiento, tonalidad (h^0) y de la concentración de cianidina 3-rutinósico en el polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina.....	95

Índice de cuadros

Cuadro I. Información general de las membranas usadas en la selección de la membrana con mayor retención de antocianinas y menor retención de azúcares.	44
Cuadro II. Diseño Box-Behnken para el estudio del efecto de la temperatura de entrada al secador por atomización, la concentración del recubrimiento y el flujo de alimentación sobre un extracto de broza de café.	52
Cuadro III. Comparación de azúcares, antocianinas, humedad y acidez promedio de las muestras del retenido de los extractos de broza UF y UF-DF por medio de una t-Student.	67
Cuadro IV. Rendimiento, densidad “bulk”, cianidina 3-rutinósido (en base seca), humedad, h^0 y C promedio de las muestras UF o UF-DF y secadas por atomización (SA).	69
Cuadro V. Evaluación cualitativa del efecto del diafiltrado sobre el secado de un extracto de broza de café con tres repeticiones.	71
Cuadro VI. Promedios de las variables respuesta, que definen la calidad del producto final, para la optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café.	80
Cuadro VII. Parámetros de ajuste (utilizando mínimos cuadrados) de los modelos generados mediante la superficie de respuesta asociada a la optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café.	81
Cuadro VIII. Parámetros de ajuste de los modelos generados mediante la superficie de respuesta asociada a la optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café, para el modelo reducido.	82
Cuadro IX. Resultados predichos por el modelo y obtenidos experimentalmente de las variables respuestas usadas en la optimización del secado de un extracto de broza de café para validar el modelo.	98

Abreviaturas

DF: diafiltración

FRV: factor de reducción volumétrica

h°: ángulo de tono (hue angle en inglés)

MF: microfiltración

MWCO: *molecular weight cut off*

UF: ultrafiltración

WSI: índice de solubilidad en agua

Bs: base seca

Cn mal: concentración de maltodextrina

Cian 3-rut: cianidina 3-rutinósido

Resumen

Se evaluó el efecto del proceso de membranas, sobre la purificación o concentración de un extracto de broza de café y de las condiciones de secado por atomización, con el fin de obtener un producto con la mayor coloración. El proceso de membranas consistió en realizar etapas de microfiltración, luego ultrafiltración y por último diafiltración. En la optimización del secado por atomización se evaluó la temperatura de entrada, la concentración de maltodextrina y el flujo de alimentación.

La microfiltración permitió un proceso de clarificación, al reducir los sólidos insolubles sin afectar el contenido de antocianinas ni de ácido cítrico en el permeado. Además, permitió una reducción de compuestos oscuros. La glucosa, fructosa y sacarosa aumentaron su contenido en el permeado, sin embargo, no se cuenta con evidencia estadística.

En la etapa de ultrafiltración se dio una concentración en el producto retenido de fructosa, sacarosa, ciadinina 3-rutinósido y ácido cítrico. En la etapa de diafiltración se logró una purificación del extracto, ya que, aumentó el contenido de antocianinas y se redujo el de ácido cítrico, glucosa y fructosa, mientras que la sacarosa tuvo una retención del 100%.

La etapa de membranas favoreció el aumento del rendimiento del secado, por la reducción del contenido de monosacáridos en el producto diafiltrado, lo que además preservó las antocianinas durante la etapa de secado. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en el tono del color (h°) entre los polvos previamente ultrafiltrados o diafiltrados. Además, el proceso membranario no tuvo un efecto en la rehidratación del producto en polvo, el cual se disolvió un 100% en agua.

En la optimización del secado por atomización el flujo de alimentación no presentó un efecto significativo para ninguna de las variables respuesta.

Las altas temperaturas durante el secado por atomización incrementaron las pérdidas de cianidina 3-rutinósido, así como del tono del color (h° mayores), principalmente cuando se empleó 4% ó 8% de maltodextrina. La concentración de

maltodextrina jugó el papel más importante en la preservación de la cianidina 3-rutinósido, debido a un efecto de encapsulación, independientemente de las condiciones de flujo y temperatura.

Las condiciones óptimas de secado fueron 135 °C, 5,5% de maltodextrina y 4 mL/min. Los modelos generados no presentaron un buen ajuste, debido a un rango de condiciones evaluadas muy estrechas, principalmente de temperatura y flujo de entrada.

Se realizó un proceso de validación del modelo, por tripicado, en dos extractos de zonas de producción diferentes, y se encontró que los resultados de cianidina 3-rutinósido, color y rendimiento, del extracto procedente de la zona de Alajuela, presentaron valores más cercanos a lo predicho por el modelo que el extracto de la zona de Cartago.

I. Justificación

La apariencia de los alimentos es un atributo que influye en las elecciones de los consumidores, y el color resulta de suma importancia, ya que los hace más atractivos para el ojo humano y, además, puede ser relacionado con factores como calidad, frescura, sabor, deseos de consumo entre otros (Lee & Schwartz, 2005). Es por esta razón, que en la industria alimentaria se han empleado los colorantes, para restaurar el color propio de los alimentos perdido o alterado como parte del procesamiento, manufactura y almacenamiento; así como homogeneizar el color (Martins *et al.*, 2016).

En los últimos años se ha presentado una tendencia, por parte del consumidor, a reducir la ingesta de colorantes artificiales; esto debido a evidencia de toxicidad a corto o largo plazo derivada del consumo de éstos y; posibles efectos carcinogénicos, así como, reacciones alérgicas y hasta posible efecto en el comportamiento de niños y adolescentes (Martins *et al.*, 2016). Es por esta razón, que se han buscado opciones alternativas para sustituir los colorantes artificiales por productos que, por su naturaleza, contienen pigmentos como carotenoides, betalaínas y antocianinas; los cuales, además de presentar una atractiva coloración, se ha relacionado su consumo con beneficios en la salud humana por sus propiedades bioactivas, así como ser más seguros (Mercadante & Bobbio, 2007).

El café es uno de los cultivos de mayor producción en Costa Rica y que representa un importante impacto en la economía del país. En el período de 2015-2016 la producción nacional de café fruta fue de 2 233 453,07 fanegas, un 17,7% mayor a la cosecha anterior. De dicha cosecha, un 81,95% fue destinado a exportación y un 18,03% a consumo nacional (ICAFE, 2016).

A pesar de la importancia de la actividad cafetalera para el país, el proceso de producción tiene el inconveniente que genera una gran cantidad de subproductos, ya que la pulpa y la cáscara comprenden cerca de un 45% del fruto; por lo que, representan de los principales subproductos de la agroindustria

que pueden aportar un valor agregado, al ser empleados para otros propósitos como extracción de cafeína y polifenoles (Esquivel & Jiménez, 2012). Según Murthy y Madhava-Naidu (2012), los subproductos o desechos de la industria cafetalera suelen ser usados como fertilizantes, para alimentación de ganado y composteo. Sin embargo, estos subproductos son ricos en carbohidratos, proteínas, pectinas y compuestos bioactivos como carotenoides, vitaminas y compuestos fenólicos, incluidas las antocianinas.

Las antocianinas son compuestos flavonoides responsables de la coloración roja/azul de muchas frutas y representan un potencial sustituto de los colorantes artificiales (Ersus & Yurdagel, 2007). Por lo que, el empleo de la broza de café, compuesta por la cáscara, pulpa y residuos de mucílago, es una propuesta atractiva para el uso de subproductos que ocasionan daño al medio ambiente, al aprovechar sus beneficios en el desarrollo de productos nuevos que satisfagan las necesidades del mercado.

En el estudio realizado por Ariza (2011), se encontró que las principales antocianinas de la, comúnmente, llamada broza del café son cianidina 3-rutinósido y cianidina 3-glucósido. Factores como la estructura, la concentración de pigmento, el pH, la temperatura, la luz, la presencia de copigmentos, los iones metálicos, las enzimas, el oxígeno, los azúcares y las proteínas afectan la estabilidad de los pigmentos naturales, especialmente compuestos de antocianinas (Ersus & Yurdagel, 2007). Como consecuencia, se ha investigado diferentes tratamientos que permitan aumentar la estabilidad de los pigmentos. Por ejemplo, Quirós (2014) evaluó el uso de escaldado y diferentes ácidos orgánicos, en varias concentraciones, para determinar las condiciones que permitieran el mayor contenido de antocianinas en un extracto deshidratado y otro concentrado.

En los estudios anteriores donde se obtuvo un extracto crudo de antocianinas, se utilizó maltodextrina como acarreador o ayudante de secado. El uso de polímeros es recomendado en procesos de secado de jugos de frutas, ya que, la mayoría de los sólidos solubles en las frutas son azúcares de bajos pesos

moleculares, los cuales al ser sometidos a procesos de eliminación rápida de agua, como el secado por atomización, resultan en una matriz amorfa que puede sufrir cambios en el estado de transición vítrea, ocasionando problemas de pegajosidad, apelmazamiento, colapso y cambios de color (Nicoletti & Martínez, 2012).

Se ha observado que con la adición de recubrimientos, antes o después del secado, mejora la calidad del producto final, ya que, además de reducir los problemas de pegajosidad y aglomeración, forman una especie de capa sobre las gotitas que permite encapsular compuestos activos (Chiou & Langrish, 2011; Burnside, 2014). Los ayudantes de secado pueden contribuir a mantener las propiedades funcionales deseadas en el producto terminado, como la estabilidad frente a la oxidación, la facilidad de manejo, mejora de la solubilidad, y aumento de la vida útil (Nicoletti & Martínez, 2012).

En los estudios realizados por Ariza (2011) y Quirós (2014) se empleó maltodextrina como recubrimiento; sin embargo, en otras investigaciones se han secado jugos de frutas por atomización empleando otros recubrimientos como: goma mesquite, almidón de yuca, goma arábiga y maltodextrinas con diferentes grados de dextrinización (Tonon *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2012). Varias de las publicaciones concuerdan en que la mayor retención de pigmentos se da con el uso de maltodextrina. Por ejemplo, en la investigación de Peng *et al.* (2013) se observó que la maltodextrina generó la mayor retención de antocianinas y compuestos fenólicos comparado con la β -ciclodextrina. Además, Ferrari *et al.* (2012) publicaron que la goma arábiga causó la menor retención de antocianinas, mientras que el uso de maltodextrina disminuyó el ángulo de tono (relacionado con pigmentos rojos) de 10,67 con goma arábiga a 8,81 al usar maltodextrina el ángulo de tono h° , es decir, se dio una mayor conservación de dichos pigmentos.

Otro factor importante en la obtención de pigmentos a partir de broza de café es la temperatura empleada en la entrada del secador. El secado por atomización ha sido el método por excelencia, ya que, el agua al ser evaporada en un tiempo muy corto reduce el efecto de las altas temperaturas sobre

compuestos sensibles a ésta (Chiou & Langrish, 2011; Nicoletti & Martínez, 2012).

Las condiciones de secado empleadas por Ariza (2011) y Quirós (2014) fueron de 160°C; sin embargo, varios estudios han encontrado que un aumento de la temperatura de entrada en el secador ocasiona mayor degradación de los pigmentos. Por ejemplo, Jiménez *et al.* (2011) encontraron que a 140 °C se da la menor pérdida de compuestos fenólicos y color que aquellos secados a 160 °C. Asimismo, Mishra *et al.* (2014) publicaron que al aplicar mayor temperatura se da una reducción de la luminosidad (L^*), del ángulo de tono (h°) y menor contenido de compuestos fenólicos.

La degradación más rápida de antocianinas a temperaturas más altas también puede estar relacionada con la presencia de azúcares que junto con proteínas, pueden resultar en la reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático) (Tonon *et al.*, 2010). Por lo que, reducir el contenido de azúcares resulta de suma importancia, ya que, la presencia de azúcares o productos resultantes de su degradación puede acelerar la pérdida de antocianinas. Los productos resultantes de la reacción de Maillard (furfural e hidroximetilfurfural) condensan junto con las antocianinas, conduciendo a la formación de compuestos con coloración marrón (Tonon *et al.*, 2010).

Actualmente la ultrafiltración está siendo foco de muchas investigaciones con el propósito de clarificar jugos de frutas. Ya que, esta tecnología está basada en la selectividad según la permeabilidad de la membrana hacia los componentes de los fluidos a los cuales se les aplica un gradiente de presión (Echavarría *et al.*, 2012). Por lo tanto, como esta tecnología se basa en la separación de componentes según los pesos moleculares, puede ser utilizada para separar los azúcares de pesos moleculares bajos.

Vergara *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la ultrafiltración en jugo de cactus (*Opuntia ficus-indica*) y encontraron que el contenido de sólidos solubles y azúcares totales del jugo ultrafiltrado fueron significativamente menores; mientras que el contenido de compuestos polifenólicos fueron significativamente mayores que en el jugo sin ultrafiltrar. En su caso Echavarría *et al.* (2012)

analizaron las propiedades físico-químicas del jugo clarificado (permeado) de pera, manzana, mandarina y melocotón que mostró un aumento de los sólidos solubles y una disminución del valor L^* . Este oscurecimiento fue asociado con la remoción del agua, es decir por procesos de concentración de los compuestos fenólicos responsables del color; por lo tanto, se confirma que con la ultrafiltración se da una separación de los compuestos fenólicos y de los azúcares.

En investigaciones recientes se ha usado la microfiltración como una etapa previa a la ultrafiltración, con el fin de eliminar partículas en suspensión y, por lo tanto, reducir la colmatación de la membrana, así como estabilizar microbiológicamente el producto (Berk, 2013). También la diafiltración es una técnica usada en procesos de ultrafiltración para purificar y completar la separación de azúcares, sales y ácidos de soluciones que contienen proteínas, pectinas y otras macromoléculas mejorando el rendimiento del proceso (Yazdanshenas *et al.*, 2005).

Además, en el estudio de Vergara *et al.* (2014) se encontró que al aplicar ultrafiltración se lograba realizar el secado por atomización con una menor concentración de recubrimiento, lo cual es de suma importancia, ya que en el estudio realizado por Quirós (2014) se usó una concentración de maltodextrina del 8%. Sin embargo, se observó que al emplear mayor cantidad de recubrimiento se da una dilución del pigmento. Por lo tanto, se busca secar el extracto de broza con una menor concentración de recubrimiento y así evitar dicho efecto de dilución del color. En investigaciones realizadas en jugos de frutas se ha evaluado el empleo de concentraciones de 3, 5, 6 y 7% de diferentes recubrimientos como maltodextrina, goma arábica, almidón de tapioca entre otros (Tonon *et al.*, 2010; Tonon *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2014) obteniéndose resultados satisfactorios al reducir la pegajosidad y, además, aumentar la estabilidad de los pigmentos.

Por lo tanto, bajo este contexto el objetivo de la presente investigación fue evaluar el uso de distintas tecnologías de membranas para reducir el contenido de azúcares, así como, concentrar y posteriormente deshidratar por atomización, variando las condiciones de temperatura de entrada y el flujo de entrada al

secador y la concentración del recubrimiento que permitieran obtener la mayor potencia de coloración del extracto de broza de café en polvo.

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de tecnologías de membranas y de las condiciones de secado por atomización sobre el extracto de broza de café para la obtención de un polvo con la mayor conservación del color y contenido de antocianinas.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Determinar el efecto de la combinación de microfiltración, ultrafiltración y diafiltración sobre el contenido de azúcares totales, acidez, sólidos totales y contenido de antocianinas del extracto de broza de café para el mejoramiento de las características del producto durante el secado por atomización.
- 2.2.2 Evaluar las condiciones de temperatura de entrada, flujo de alimentación y concentración de maltodextrina en el secado por atomización para la obtención de un extracto de broza de café en polvo con el mayor contenido de antocianinas y la mayor conservación del color.

III. Marco teórico

El café se ha conocido por muchas propiedades estimulantes, sin embargo, los subproductos generados durante la obtención del grano en muchos casos no son debidamente manejados, generando gran cantidad de residuos que contaminan el ambiente (Esquivel & Jiménez, 2012). El café después de ser cosechado puede ser procesado de dos formas diferentes: en húmedo o en seco. En el método en seco, el fruto fresco es extendido con un espesor de aproximadamente 8 cm en un patio limpio y es agitado cada hora hasta que un puñado de café produzca un sonido crujiente, esto puede tardar de 12 a 15 días dependiendo del clima. Posteriormente se trata de evitar las condiciones húmedas para evitar la formación de mohos (Murthy & Naidu, 2012). Muchas veces el café obtenido por el método seco posee menor calidad, porque no ha sido previamente seleccionado, por lo que incluye granos maduros y verdes reduciendo la calidad del producto final (Brando & Brando, 2014).

Por el contrario, en el procesamiento en húmedo se realiza una selección mediante flotación en tanques con agua, que permiten, por diferencia de densidad, separar los granos maduros de los verdes o hasta de aquellos dañados (Brando & Brando, 2014). Después de la selección, en el procesamiento en húmedo la pulpa es removida de los granos antes del secado, con un equipo para despulpar que busca eliminar la mayoría del mucílago y del pergamino para obtener un café de buena calidad.

Posteriormente se da una fermentación que elimina los restos del mucílago (Murthy & Naidu, 2012). Dicha fermentación puede llevarse a cabo en forma seca o húmeda. La fermentación natural seca es más rápida pero difícil de controlar y debe estar bajo techo y protegida de la lluvia; por el contrario, la fermentación en húmedo es más homogénea y no requiere de tanques techados, sin embargo, requiere de más agua ya que los tanques son llenados con agua limpia. Durante la fermentación el mucílago es removido por acción de pectinasas presentes en la flora de los granos, que llevan a cabo hidrólisis enzimática de la pectina (Brando & Brando, 2014). La temperatura ideal es entre 30-35 °C y puede

tardar entre 24-36 h dependiendo de la concentración de enzimas pectinolíticas en el ambiente, la temperatura y la elevación (Murthy & Naidu, 2012). El tiempo al que se detiene la fermentación es de suma importancia ya que si es sobre fermentado pueden formarse sabores desagradables y si la fermentación es incompleta o muy lenta puede desarrollarse ácido butírico o propiónico. La fermentación puede acelerarse adicionado levaduras (*Saccharomyces*) (Brando & Brando, 2014). El proceso de desmucilaginado también puede llevarse a cabo de manera mecánica por fricción fuerte en máquinas llamadas removedores de mucílagos reduciendo el uso del agua (Murthy & Naidu, 2012; Brando & Brando, 2014).

Luego de la fermentación se hace un lavado para eliminar el pergamino y posteriormente un secado, que puede ser al sol o mecánicamente y así reducir el contenido de humedad cerca de un 10%-12% para luego ser almacenado (Murthy & Naidu, 2012; Brando & Brando, 2014).

La producción de café genera una gran cantidad de desechos, dependiendo del tipo de procesamiento empleado (Ribeiro *et al.*, 2014). La pulpa o broza del café es el principal subproducto del procesamiento en húmedo, se estima que por cada 2 ton de café producido, 1 ton de pulpa de café es obtenida (Murthy & Naidu, 2012). La disminución de la contaminación debida a la pulpa o broza es cada vez más importante a medida que los países productores de café toman conciencia de los daños ambientales causados por el proceso húmedo (Brando & Brando, 2014).

Según lo anterior, se debe de tomar en cuenta que dicha pulpa es rica en carbohidratos, proteínas, minerales, como potasio, y apreciables cantidades de taninos, polifenoles y cafeína (Murthy & Naidu, 2012). Es por eso que el empleo de la broza de café, es una propuesta atractiva para el uso de subproductos que ocasionan daño al medio ambiente, al aprovechar sus beneficios en el desarrollo de productos nuevos que satisfagan las necesidades del mercado.

Se ha realizado previa investigación acerca del contenido de antocianinas en la broza del café, con el fin de extraer dichos pigmentos. Prata & Oliveira

(2007) y Ariza (2011) encontraron la cianidina 3-rutinósido como la principal antocianina presente en la broza del café seguida de cianidina 3-glucósido. Por lo tanto, dichas antocianinas pueden ser empleadas para obtener productos como, por ejemplo, sustitutos de colorantes, ya que, el uso de colorantes en la industria alimentaria es de suma importancia pues permite restaurar el color perdido durante el procesamiento, haciendo los alimentos más atractivos y de mayor aceptación por el consumidor (Prata & Oliveira, 2007).

3.1 Antocianinas

Las antocianinas son compuestos flavonoides. Las antocianidinas son la estructura básica; cuando las antocianidinas se encuentran en su forma glicósidica (enlazada a una molécula de azúcar) se conocen como antocianinas (Ignat *et al.*, 2011). Dentro de los azúcares que se enlazan a las antocianidinas se encuentra la glucosa, la ramnosa, la xilosa, la galactosa y la arabinosa así como algunos disacáridos (Kammerer, 2016). Estos compuestos presentan tonalidades desde el amarillo hasta el rojo-azul dependiendo del pH, son solubles en agua y además han sido relacionados con beneficios a la salud debido a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Prata & Oliveira, 2007; Murthy & Naidu, 2012).

Las antocianinas se caracterizan porque poseen una baja estabilidad, siendo un gran reto para la industria. Son susceptibles a factores como: la concentración, la luz, el oxígeno, el pH, la temperatura, la presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, ácido ascórbico y azúcares (Ignat *et al.*, 2011).

3.1.1 Estructura química

En la **Figura 1** se muestra la estructura química de algunas de las antocianinas más comunes en alimentos. Las principales diferencias entre los tipos de antocianinas son el número de grupos hidroxilo en la molécula, el grado de metilación de estos grupos hidroxilo; la naturaleza, el número y la posición de glicosilación; y la naturaleza y número de ácidos aromáticos o alifáticos unidos al residuo de glucosilo (Wilska, 2006).

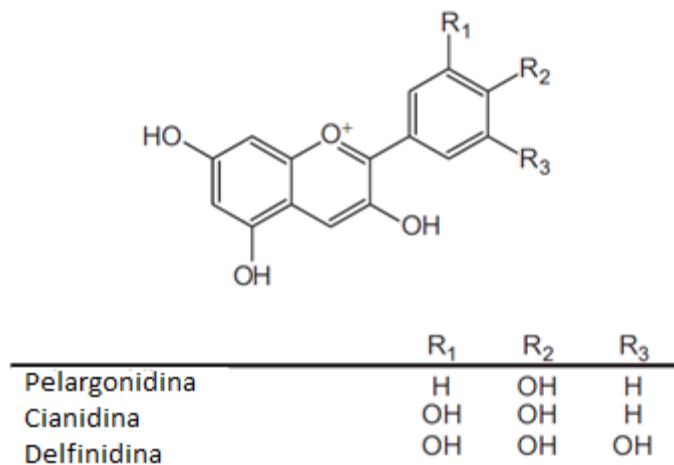


Figura 1. Estructura química de tres antocianinas comunes. Adaptado de (Kammerer, 2016).

La sustitución de los grupos hidroxilo y metoxilo afecta al color de las antocianinas, pues, un aumento en el número de grupos hidroxilo tiende a profundizar el color a un tono más azulado, mientras que, un aumento en el número de grupos metoxilo incrementa la coloración roja (Wilska, 2006). Pero además, la estabilidad del color de las antocianinas también depende de los sustituyentes, ya que, se ha visto que el aumento de la hidroxilación disminuye la estabilidad, mientras que, la metilación tiende a incrementar la estabilidad del pigmento, lo que se debe al bloqueo de los grupos hidroxilo reactivos (Lee & Schwartz, 2005).

Por otra parte, la sustitución glicosídica de las antocianinas aumenta la estabilidad y la solubilidad en agua de estos pigmentos. Se ha observado que al aumentar el número de residuos de azúcar dentro de la molécula, la antocianina tiende a aumentar la estabilidad, pero además, sí estos restos de azúcar son acilados la estabilidad se ve mejorada (Lee & Schwartz, 2005).

3.1.2 pH

El pH del medio juega un papel particularmente importante en el equilibrio de las diferentes formas de las antocianinas y, por consiguiente, en la modificación del color (Ver **Figura 2**). En una solución fuertemente ácida, a un pH inferior a 2, el catión flavilo de color rojo es la forma dominante. A medida que

aumenta el pH, se produce una pérdida rápida de protones para producir la base quinoidal roja o azul, y con un incremento del pH se da la hidratación del catión de flavilo para producir una pseudobase de carbinol incolora. En valores de pH entre 6-8 se forman las chalconas (Wilska, 2006).

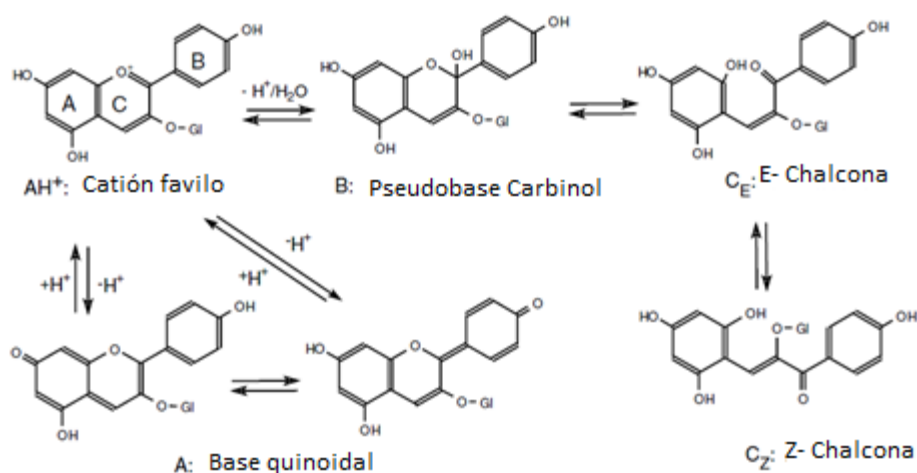


Figura 2. Variaciones de la estructura de las antocianinas en medios acuosos a diferentes pH. Adaptado de (Wilska, 2006).

3.1.3 Copigmentación

Las reacciones de copigmentación intermolecular de las antocianinas son comunes en la naturaleza y resultan de la asociación entre pigmentos y cofactores (Del Pozo *et al.*, 2004). También pueden llevarse a cabo reacciones conocidas como auto-asociación que consisten en la unión entre antocianinas. Se han sugerido principalmente fuerzas de Van der Waals, efectos hidrófobos e interacciones iónicas como fuerzas motrices para este tipo de interacción con el catión de flavilo o con la forma base quinoidal de antocianinas (Kammerer, 2016).

Los copigmentos pueden pertenecer a una amplia gama de clases de compuestos diferentes, tales como, compuestos fenólicos incoloros, es decir, tanto flavonoides como ácidos fenólicos, alcaloides, aminoácidos, purinas y ácidos orgánicos (Kammerer, 2016). Los mejores cofactores son típicamente derivados de flavonoides que contienen muchos grupos hidroxilo. Los cofactores más fuertes tienen sistemas ricos en electrones, que se asocian con compuestos

pobres en electrones, tales como el catión de flavilo (Mercadante & Bobbio, 2007). Los polifenoles son los cofactores predominantes presentes en las frutas y verduras que contienen antocianinas, el aumento de la estabilidad de la antocianina en estas matrices se ha atribuido a sus altas concentraciones (Del Pozo *et al.*, 2004).

Este tipo de reacciones ocasionan que las antocianinas exhiban más color de lo que se esperaría según su concentración, lo que es conocido como efecto hipercromático, y resulta en una sobreestimación del total de antocianinas en métodos espectrofotométricos, pero además, provoca un desplazamiento de la longitud de onda llamado cambios bocrómicos, dando colores púrpura a azul. Dichos complejos formados principalmente en condiciones ácidas no solamente mejoran el color visualmente sino que también la estabilidad del color en sistemas alimentarios (Wilska, 2006; Pacheco *et al.*, 2007).

La intensidad del efecto de copigmentación depende de varios factores, incluyendo el tipo y la concentración de antocianinas y copigmentos, el pH y la temperatura del disolvente (Wilska, 2006). Se ha observado que una alta relación copigmento-pigmento es favorable para aumentar la estabilidad del pigmento (Lee & Schwartz, 2005; Kammerer, 2016).

Los efectos de copigmentación son más pronunciados a temperaturas bajas y se reducen al calentarse, llegando a ser insignificantes a temperaturas próximas al punto de ebullición del agua, lo cual es de particular interés para la preparación de alimentos que implican etapas de tratamiento térmico (Mercadante & Bobbio, 2007; Kammerer, 2016).

3.1.4 Temperatura

Las antocianinas son sensibles a la temperatura, se ha reportado que su degradación sigue cinéticas de reacción de primer orden, es decir, que los pigmentos disminuyen al aumentar la temperatura (Mercadante & Bobbio, 2007). El procesamiento térmico puede cambiar el equilibrio de los cuatro tipos de antocianinas hacia un derivado de chalcona incoloro, ya que todas estas reacciones son sensibles al calor (Lee & Schwartz, 2005).

La degradación térmica induce la pérdida de los restos glicosilo de las antocianinas, por hidrólisis del enlace glicosídico. Esto da como resultado, la formación de diferentes productos de degradación polifenólicos dependiendo de las condiciones del tratamiento térmico. La degradación de la antocianina conduce a pérdidas de color y, eventualmente, puede generar productos marrones, especialmente en presencia de oxígeno (Miller & Silva, 2012).

Sí bien se sabe que las antocianinas son termosensibles, y que se dan pérdidas del pigmento durante los tratamientos térmicos, también es importante evaluar la matriz en la cual se encuentran los pigmentos, ya que se ha observado que la presencia de azúcares facilita su degradación. Esto debido a que la aplicación de calor en presencia de azúcares resulta en la formación de hidroximetilfurfural y otros derivados de furfural como producto de reacciones de caramelización y de Maillard, lo que genera interacciones con las antocianinas resultando en mayor pérdida del pigmento (Kammerer, 2016).

La reacción de Maillard consiste en la interacción entre el grupo carbonilo de azúcares reductores con un grupo amino proveniente de proteínas, péptidos y grupos amino. Da como resultado compuestos pardeados y una reducción del valor nutricional. Dicha reacción se ve favorecida por condiciones de altas temperaturas, alto pH y un bajo Aw. El producto final de esta reacción es conocido como melanoidinas, los cuales poseen diferentes pesos moleculares y son color café. Otros compuestos intermedios, como el furfural y el 5-hidroximetilfurfural, también son encontrados en alimentos al aplicar calor, y que como ya se mencionó puede interaccionar con las antocianinas (Belitz *et al.*, 2009).

3.1.5 Azúcares

Las altas concentraciones de azúcar pueden estabilizar los pigmentos, ya que se da una disminución de la actividad del agua en el medio, pues el agua puede reaccionar con el catión de flavilo en la posición C2 y formar carbinol base incolora. A baja concentración de azúcares, no sólo el agua sino el propio azúcar pueden acelerar la degradación de las antocianinas (Lee & Schwartz, 2005).

Sin embargo, tal y como ya se mencionó, un alto contenido de azúcares al aplicar un tratamiento térmico puede favorecer la reacción de Maillard y los productos de dicha reacción, ocasionando interacciones con las antocianinas, causando una pérdida del pigmento, coloración y capacidad antioxidante (Kammerer, 2016).

3.1.6 Enzimas

Las glicosidasas y las polifenoloxidasas pueden causar pérdidas de color, ya que las glicosidasas hidrolizan los enlaces glucosídicos generando el azúcar y respectiva aglicona y, como la antocianidina es menos soluble, se da reducción del color. Por su parte, la polifenoloxidasa oxida las antocianinas en presencia de oxígeno y *o*-difenoles. La enzima oxida los *o*-difenoles en *o*-benzoquinona, y estos a su vez reaccionan con las antocianinas para formar antocianinas oxidadas y productos de degradación (Lee & Schwartz, 2005).

El escaldado como paso inicial durante el procesamiento puede contribuir a aumentar los rendimientos de antocianinas, lo que se atribuye a la inactivación térmica de las enzimas degradadoras de pigmentos, aumentando así los rendimientos de extracción (Kammerer, 2016).

3.2 Secado

3.2.1 Generalidades

Dentro de los principales propósitos de la deshidratación de alimentos se encuentra disminuir la disponibilidad de agua a niveles en los cuales no resulte peligroso el crecimiento de microorganismos indeseados, tanto patógenos como de deterioro, además de minimizar la velocidad de reacciones químicas, aumentando la vida útil del producto (Goula, 2015). Otra de las ventajas del secado de alimentos es la facilidad y reducción de costos en el transporte y almacenamiento, debido a la reducción del peso y el volumen (Tonon *et al.*, 2010)

Según Goula (2015), en general, los procesos de secado se pueden dividir en tres categorías:

1. *En contacto con aire caliente a la presión atmosférica*: el calor es transferido a través de la superficie de los alimentos por medio de aire caliente y además el vapor de agua es removido a través del aire.
2. *Secado al vacío*: la ventaja de este tipo de secado es que la evaporación del agua ocurre a menores presiones y, por lo tanto, a menores temperaturas, la transferencia de calor es generalmente mediante conducción o algunas veces por radiación.
3. *Liofilización*: el vapor del agua es sublimado del alimento previamente congelado, debido al uso de bajas temperaturas la estructura de los alimentos se mantiene en mejores condiciones que en otros procesos de secado.

A pesar de que los dos últimos métodos ofrecen ventajas al utilizar bajas temperaturas, en los últimos años se ha utilizado ampliamente el secado por atomización, que pertenece a los primeros métodos, y es explicado más ampliamente a continuación.

3.2.2 Secado por atomización

El secado por atomización es un método en el cual el líquido de alimentación, que puede ser una solución, una pasta o una suspensión, es bombeado a través de un atomizador que forma pequeñas gotitas dentro de una cámara cilíndrica o cónica. Posteriormente dichas gotitas pasan dentro de un flujo de aire caliente (también pueden emplearse otros gases inertes) (Chiou & Langrish, 2011), donde el calor del aire es transferido a las gotas mediante convección y es convertido a calor latente durante la evaporación de la humedad de las mismas (Murugesan & Orsat, 2012). Seguidamente las partículas son separadas mediante un ciclón, removiendo de esta manera el material ya seco que resulta en un producto en polvo con buena calidad, baja actividad del agua, fácil transporte y almacenamiento (Tonon *et al.*, 2011).

Durante el proceso de secado las gotas se enfrentan a diferentes etapas, las cuales se muestran en las **Figura 3** y **Figura 4**. En la primera etapa la gota con exceso de líquido gana calor sensible y comienza a darse evaporación en la superficie, con lo que ocurre una contracción del diámetro y, además, un aumento

en la concentración de sólidos por lo que empieza a formarse una corteza y la gota se transforma en una partícula húmeda. En la segunda etapa, la transferencia de masa se ve interferida por la presencia de la corteza. Esta etapa continúa hasta que la humedad de la partícula se reduce al valor de equilibrio de secado, luego de que el proceso de secado finaliza, la partícula alcanza la temperatura de equilibrio (Goula, 2015).

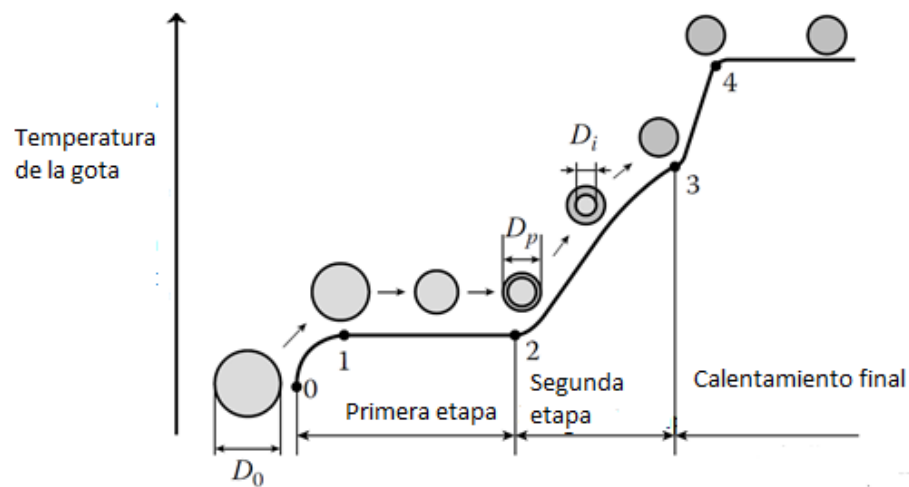


Figura 3. Etapas del proceso de secado experimentado por las gotas. Adaptado de Goula (2015). Donde D_p es el diámetro de la partícula y D_i es el diámetro interno (Sin tomar en consideración la corteza).

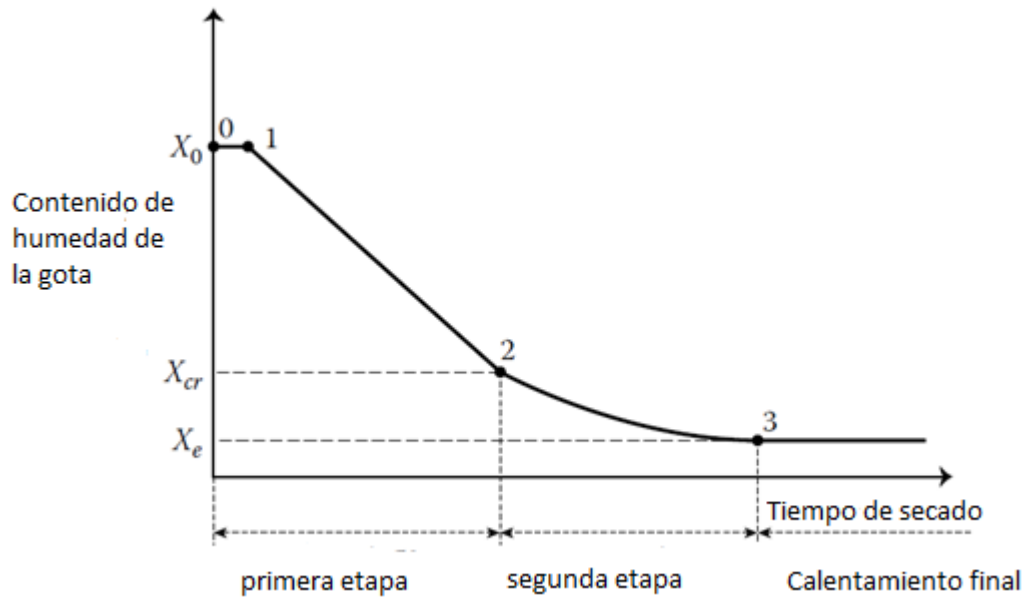


Figura 4. Evolución típica del contenido de humedad de las gotas durante el secado. Adaptado de Goula (2015). Donde x_0 , x_{cr} , x_e son la humedad inicial, intermedia y final respectivamente.

El secado por atomización ha sido sumamente empleado en los últimos años debido a que la evaporación se lleva a cabo rápidamente y las gotas se mantienen a temperaturas relativamente bajas, por lo que la calidad del producto se ve menos afectado que en otros tipos de secado, lo cual, resulta de suma importancia en productos sensibles al calor (Goula, 2015).

Otra de las ventajas de este tipo de secado es la relativa uniformidad del producto final, ya que, las partículas esféricas presentan una proporción similar de compuestos no volátiles en el líquido de alimentación. Además, el secado por atomización permite un alto tonelaje de producción continua en un equipo relativamente sencillo. Sin embargo, requiere mayores tasas de evaporación que en otros tipos de secado, esto debido al mayor contenido de humedad en la alimentación, a su vez esto implica que el fluido de alimentación deba ser bombeado; también se ha observado que el secador por atomización generalmente puede fallar si un producto de alta densidad “bulk” es requerido (Li & Mujumdar, 2009). La densidad “bulk” es una relación entre la masa de un producto en polvo y el volumen que ocupa dicha masa, tomando en consideración

el espacio entre las partículas (Goula & Adamopoulos, 2005). Es un parámetro fácil de determinar experimentalmente, pero que aporta importante información acerca de la relación de condiciones de secado como temperatura de entrada, flujo y concentración de sólidos sobre la calidad del producto final, tal como, el tamaño de partícula que puede tener efecto en procesos como el transporte del producto en polvo.

3.2.3 Factores operacionales

Dentro de los principales factores operacionales que influyen en el proceso de secado por atomización se encuentran:

- ✓ *El gas*: este es el medio que extrae la humedad de la solución alimentada, puede ser aire, gases reactivos como el dióxido de carbono o gases inertes como el nitrógeno. La velocidad del gas puede afectar la humedad del mismo, y por lo tanto, la del producto final (Chiou & Langrish, 2011). Un flujo de aire bajo ocasiona un incremento en el tiempo que demora el producto en la cámara, es decir, al aumentar el flujo del aire disminuye el tiempo de residencia del producto en la cámara de secado, dejando un mayor contenido de humedad en el producto final (Goula, 2015).
- ✓ *Temperatura del gas*: este es el principal factor que favorece la fuerza de evaporación del agua y, por lo tanto, juega un papel muy importante en la remoción de humedad; sin embargo, la eficiencia del secado depende tanto de la temperatura del aire como de la humedad (Murugesan & Orsat, 2012). En general, al usar una mayor temperatura de entrada el contenido de humedad del producto final es menor, ya que existe un mayor gradiente de temperatura entre la muestra y el medio de secado, favoreciendo la transferencia de calor. Sin embargo, un aumento en la temperatura de entrada ocasiona una disminución en la densidad “bulk” y degradación de compuestos termosensibles (Goula, 2015).
- ✓ *Composición del líquido de alimentación*: propiedades inherentes del producto alimentado como la concentración de sólidos pueden afectar la carga evaporativa, además, propiedades como la viscosidad pueden influir en el tamaño de las partículas y el esfuerzo de cizalla durante el bombeo

y la atomización (Chiou & Langrish, 2011). Un mayor contenido de sólidos hace más lenta la formación de partículas sólidas en la superficie, pero además, el porcentaje de humedad disminuye. Un mayor contenido de sólidos forma partículas más grandes ya que esto ocasiona un aumento en la viscosidad y, por lo tanto, se requiere de más energía en la atomización (Goula, 2015).

- ✓ *Atomización*: consiste en transformar el fluido alimentado en finas gotitas, lo cual se puede obtener por diferentes métodos. Como su nombre lo muestra, ésta es una de las etapas cruciales en el secado por atomización. Cuando el aspergado es eficiente las gotitas formadas presentan un tamaño uniforme, permitiendo una transferencia de masa y de energía uniforme (Murugesan & Orsat, 2012).

La elección del tipo de atomizador es de suma importancia, ya que puede influir en las características del producto final así como en la eficiencia del proceso. Según Li y Mujumdar (2009) dentro de los tipos de atomizador se encuentra el **atomizador centrífugo**, el cual consiste en un conjunto de discos giratorios con paletas curvadas que giran a altas velocidades, obteniendo la forma esférica por la tensión superficial. Presenta la ventaja de una menor tendencia a obstruirse, además de manejar altas velocidades de alimentación. Sin embargo, ocasiona mayor consumo energético comparado con boquillas de presión.

Por otra parte, las **boquillas de alta presión** son una alternativa de atomización en la que el fluido adquiere una alta velocidad tangencial mientras es forzado a través del orificio de la boquilla, el cual es normalmente de 0.5- 0.3 mm. Las altas presiones favorecen gotas de menor tamaño. Las ventajas que presenta este tipo de atomizador es que son compactos, simples y baratos así como de bajo consumo energético; sin embargo, tiene una baja capacidad de alimentación y tendencia a aglomerarse (Li & Mujumdar 2009).

Además, la boquilla de **tipo neumático** es un atomizador con una mezcla interna o externa de gas y líquido. La atomización se da por una interacción entre

el líquido y un segundo fluido, usualmente aire comprimido. El aire permite transformar el fluido de alimentación en finas gotitas. Ni el fluido ni el aire requieren de altas presiones, lo normal es entre 200-450 kPa. El tamaño de las partículas o gotitas puede ser controlado con la relación de fluido y aire comprimido. Dentro de las ventajas se encuentra que es simple, compacto, barato, tiene partes no movibles, pueden alimentarse fluidos con alta viscosidad y dentro de sus desventajas está: alto consumo de energía, baja capacidad de alimentación (velocidad de alimentación) y alta tendencia de aglomeración (Li & Mujumdar 2009).

Por último, los atomizadores **ultrasónicos** funcionan con una fuente de energía de vibración, el líquido se somete a un campo de alta intensidad ultrasónica que lo divide en finas gotitas que son expulsadas al aire circundante. Presenta la ventaja de que la distribución de tamaño de las partículas es pequeño, pero tiene una alta tendencia a la aglomeración.

- ✓ *Velocidad del líquido de alimentación:* la velocidad de alimentación está relacionada con el volumen que es alimentado y es normalmente controlado mediante una bomba peristáltica. Un incremento de la velocidad disminuye la humedad residual, forma gotitas más pequeñas y más humedad es evaporada como resultado de una mayor área de contacto, también previene la formación de corteza en las mismas ya que el secado es más rápido. Un incremento en la velocidad de atomización disminuye el tamaño de partículas, reduce los sólidos insolubles y como resultado la solubilidad se ve favorecida (Goula, 2015). Además, cuando el flujo de alimentación incrementa, se da un menor tiempo de residencia de la gota dentro del secador, y por lo tanto, un menor tiempo en contacto con el medio de secado ocasionando partículas húmedas, es decir, un mayor contenido de agua residual, y un mayor incremento visual de depósitos en las paredes del secador (Keshani *et al.*, 2015).

El tiempo en contacto entre el líquido aspergeado y el aire caliente es un componente importante en el secado por atomización ya que determina la velocidad y la intensidad del secado. El tiempo de permanencia de cada gota dentro de la cámara de secado es determinado por el flujo de alimentación, así como del tamaño de la cámara. Se ha observado que la principal razón del depósito es las paredes, es el rápido viaje de las gotas lo cual reduce el tiempo en contacto con el aire de secado, y a su vez, impide un adecuado escape de los compuestos volátiles (Li & Mujumdar, 2009; Goula, 2015).

Dependiendo de cómo el medio de secado y las gotitas formadas por el atomizador entran en contacto con el aire existen tres diferentes configuraciones: flujo cocorriente, contracorriente y flujo mixto. En el flujo cocorriente el líquido aspergeado y el aire pasan a través de la cámara de secado en la misma dirección, en este tipo de flujo el producto se somete a temperaturas menores que en los otros dos tipos de flujos. En el caso del sistema contracorriente, el líquido aspergeado y el aire caliente entran a la cámara de secado en extremos opuestos del secador, este tipo de flujo generalmente da productos con alta densidad “bulk”. Cuando el flujo es mixto se da la combinación de ambos tipos de flujos explicados anteriormente; las gotas entran en contacto en la misma y en opuesta dirección en la cámara de secado. Éstos se usan cuando se desean polvos aglomerados, además el producto no debe ser sensible al calor (Li & Mujumdar, 2009).

Existen propiedades importantes de los polvos como el contenido de humedad y la actividad de agua que son esenciales en la estabilidad y el almacenamiento; mientras que otros, como la densidad “bulk” son importantes para el empaque y consideraciones de envío (Tonon *et al.*, 2011). Sin embargo, hay factores como el rendimiento y las características del producto final que representan retos en el secado por atomización. Ya que aunque las características del producto final son importantes por el consumidor, si el rendimiento no es lo suficientemente alto comparado con los costos de operación se convierte en un proceso no sustentable (Chiou & Langrish, 2011).

Es por esta razón que se ha realizado abundante investigación sobre características inherentes del fluido alimentado que deben considerarse al escoger las condiciones de operación, de manera que se obtenga productos con las características deseadas, pero además con un rendimiento aceptable. Se ha observado que la pegajosidad es una de las propiedades que influyen en los rendimientos, ya que al aumentar la pegajosidad del fluido éste tiende a adherirse más a las paredes del secador, así como mayor tendencia a aglomerarse. Esto puede generar problemas de calidad ya que al formarse aglomerados en el secador el producto puede ser sometido excesivamente al calor y darse reacciones de pardeamiento y caramelización (Chiou & Langrish, 2011).

3.2.4 Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea es un fenómeno importante a considerar en los procesos de secado por atomización, pero principalmente en el secado de jugos ricos en azúcares.

Los polvos de jugos de frutas obtenidos mediante secado por atomización tienden a presentar una alta pegajosidad, debido a la presencia de azúcares de bajo peso molecular como la glucosa, fructosa y sacarosa; así como ácidos, tales como cítrico, málico y tartárico, los cuales presentan una temperatura de transición vítrea muy baja y, por lo tanto, una alta movilidad molecular (Fazaeli *et al.*, 2012; Nicoletti y Martínez, 2012).

En el estado vítreo o amorfo las moléculas exhiben un grado de movilidad similar a los sólidos cristalinos debido a la alta viscosidad de la matriz (sobre 10^{12} Pa.s) (Mosquera *et al.*, 2010), mientras que en el estado gomoso la movilidad a nivel molecular se incrementa drásticamente hasta que el material presenta propiedades viscoelásticas (Ver **Figura 5**) (Nicoletti y Martínez, 2012). Durante el secado por atomización como se da un incremento en la temperatura, la viscosidad disminuye hasta un valor crítico alrededor de 10^7 Pa.s, este estado crítico se alcanza 10 ó 20°C sobre la temperatura de transición vítrea (Goula, 2015). El principal problema del estado gomoso es que los productos en polvo

son más pegajosos y tienden a aglomerarse, además del colapso y cambios de color (Nicoletti y Martínez, 2012).

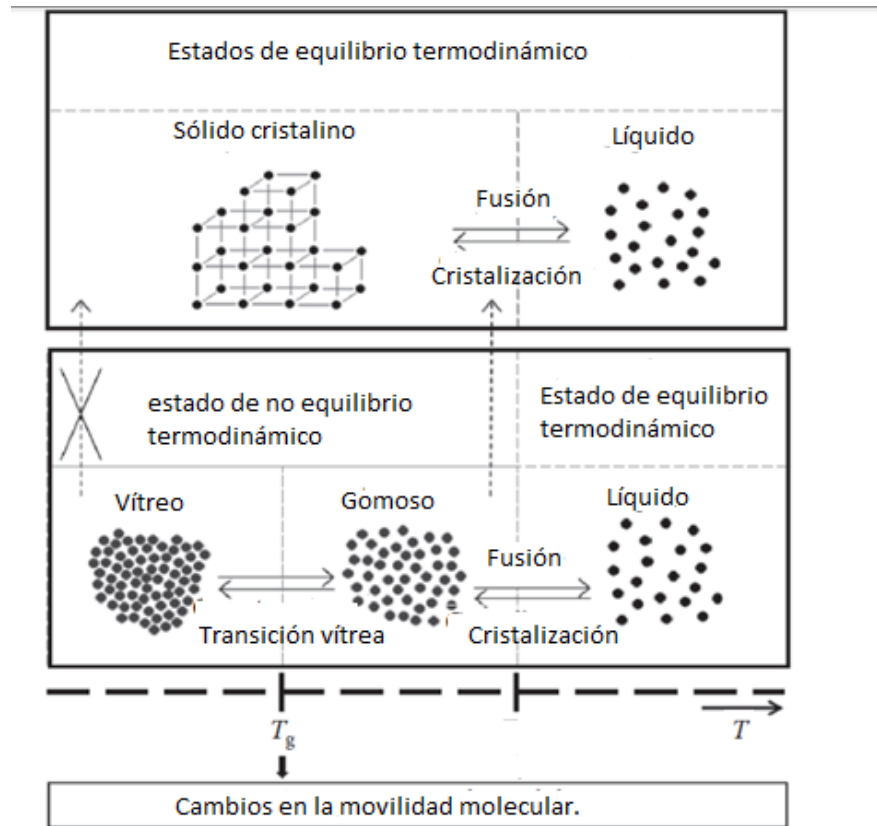


Figura 5. Representación de los estados de equilibrio y no equilibrio termodinámico y cambios en la movilidad molecular. El eje x representa el aumento de temperatura y los cambios en la movilidad molecular. Adaptado de Nicoletti & Martínez (2012).

La temperatura de transición vítrea, es un punto medio en un intervalo de temperatura, que describe cuando un material primero exhibe un comportamiento plástico hasta que entra en un estado donde las moléculas del material se encuentran en desorden, es decir, el paso del estado vítreo al gomoso de los materiales amorfos. Por encima de dicha temperatura el material es más propenso a cambios como la fusión y la cristalización (Chiou & Langrish, 2011).

Por lo tanto, si se conoce la temperatura de transición vítrea las condiciones del secado pueden ser manipuladas de manera que se obtenga partículas en estado amorfo o cristalino según se desee. Pero, además la

velocidad de cristalización juega un papel importante, ya que si las gotitas formadas después de la atomización se secan rápidamente y las temperaturas se elevan por encima del estado de transición vítrea, estas partículas serán gomosas y pegajosas, por lo que si chocan contra las paredes del secador pueden adherirse a las mismas. Si la velocidad de cristalización es rápida, las partículas cristalizarán antes de colisionar con la pared del secador, de manera que rebotarán (Chiou & Langrish, 2011).

También, la temperatura de transición vítrea (T_g) se puede usar como parámetro para caracterizar propiedades, calidad, estabilidad y seguridad de algunos sistemas de alimentos. En algunos casos se ha observado que conocer el contenido de agua disponible en un alimento es importante para predecir su vida útil; por otro lado, al conocer la T_g se puede entender y cuantificar la movilidad del agua en los alimentos, así como, caracterizar el estado amorfo y, por lo tanto, puede ayudar a establecer condiciones de almacenamiento para mantener este estado (Mosquera *et al.*, 2010).

A nivel industrial se han empleado compuestos llamados “acarreadores o recubrimientos” los cuales permiten aumentar la temperatura de transición vítrea y, por lo tanto, reducir la problemática de pegajosidad típica en jugos de frutas. A continuación se explica su aplicación en el secado por atomización.

3.2.5 Uso de recubrimientos en el secado por atomización

En los procesos de secado por atomización se emplean polímeros, los cuales contribuyen tanto en el proceso de secado, como durante el almacenamiento. Estos beneficios se presentan por varias razones: compiten por la humedad, forman una barrera física entre las partículas, así como, una barrera protectora en la superficie de productos higroscópicos y aumentan la temperatura de transición vítrea. Se ha observado que su uso presenta beneficios en la preservación de compuestos bioactivos; sin embargo, no se conoce cuál de los mecanismos es el predominante (Nicoletti & Martínez, 2012).

Los recubrimientos, en general, pueden dividirse en tres grandes grupos: polisacáridos (ejemplos, maltodextrinas, gomas y almidones), proteínas

(ejemplos, suero, gelatina, caseína y proteína de soya) y lípidos (ejemplo, ácido esteárico) (Peng *et al.*, 2013). Sin embargo, las maltodextrinas son las más ampliamente usadas en el proceso de secado por atomización debido a su alta solubilidad, baja viscosidad y bajo costo (Tonon *et al.*, 2010; Nicoletti & Martínez, 2012; Peng *et al.*, 2013).

La maltodextrina consiste en moléculas de β -d-glucosa unidas principalmente por enlaces glicosídicos (1 \rightarrow 4) y son normalmente clasificados de acuerdo a los equivalentes de dextrosa (DE). Las maltodextrinas son definidas como productos con DE<20, mientras que aquellos productos con 20<DE<60 son conocidos como jarabes de maíz. El grado de dextrinización está inversamente relacionado con la masa molar y, por lo tanto, el efecto sobre la temperatura de transición vítrea (Nicoletti & Martínez, 2012). Además se ha observado que se da mayor degradación de pigmentos a mayor DE, debido que a mayor DE las maltodextrinas son más higroscópicas y adsorben más agua, lo que las hace más susceptibles a reacciones de degradación (Tonon *et al.*, 2010). En general, la temperatura de transición vítrea puede ser de 100-243°C dependiendo del grado de dextrinización (Goula, 2015).

La alta solubilidad de los agentes de recubrimiento es de suma importancia, ya que, es necesario que el fluido alimentado esté bien disuelto con el recubrimiento de manera que el secado inmediato de la mezcla (el juego en conjunto con el biopolímero) conduzca a la formación de un sistema, en el cual, el polímero forma una red tridimensional que contiene el material protegiéndolo tanto de las condiciones del secado como del almacenamiento (Tonon *et al.*, 2010). Este proceso se conoce como microencapsulación y consiste en que al formarse las gotitas después del aspergeado, el acarreador o recubrimiento, cubre la gotita formando una fina capa protectora. La microencapsulación permite preservar la estabilidad de compuestos bioactivos durante el procesamiento y el almacenamiento, además de prevenir interacciones indeseables con la matriz del alimento, disminuir la velocidad de degradación como oxidación e hidrólisis, manteniendo la funcionalidad de compuestos bioactivos (Aguiar *et al.*, 2016). De manera que protege los compuestos sensibles de condiciones adversas como

las altas temperaturas, mejora la solubilidad y extiende la vida útil (Tonon *et al.*, 2010, Nicoletti & Martínez, 2012).

De esta forma, compuestos bioactivos como las antocianinas, son encapsulados por el biopolímero, protegiéndolos de la luz, el oxígeno, el agua y otras condiciones que pueden causar inestabilidad, además de mejorar las características de solubilidad del polvo final. Se ha observado que los compuestos fenólicos pueden formar complejos con polisacáridos, y este complejo formado entre el catión flavilo de las antocianinas con las dextrinas previene su transformación en compuestos menos estables (Mahdavi *et al.*, 2016).

Por lo antes mencionado, los recubrimientos presentan muchos beneficios en el secado por aspersión. Pero además se ha observado que permiten un aumento en los rendimientos. Esto se debe al alto peso molecular que poseen los biopolímeros que permite aumentar la temperatura de transición vítrea reduciendo la pegajosidad, explicado previamente y, por lo tanto, evitan que los polvos tiendan a adherirse en las paredes de la cámara de secado, así como, aglomeraciones y transformaciones estructurales, como el colapso o la cristalización (Tonon *et al.*, 2010; Chiou & Langrish, 2011; Peng *et al.*, 2013).

3.3 Tecnología de membranas

3.3.1 Generalidades

El proceso de membranas es basado en la permeabilidad selectiva de los poros de las membranas, éstas permiten el paso de ciertos componentes a través de ellas en el fluido conocido como permeado, mientras que los componentes que no logran pasarla forman el fluido conocido como retenido (Muthukumarappan & Marella, 2010).

Las tecnologías de membranas han sido usada ampliamente en los últimos años, pues dentro de las ventajas que presentan es que no requieren aplicar calor, especialmente cuando se habla de compuestos bioactivos que son sensibles a las temperaturas altas, ya que la separación puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (Belleville & Vaillant, 2015). Además, durante la

separación no se da un cambio de fase y no se adicionan compuestos químicos pues la separación se lleva a cabo por medios físicos (De & Mondal, 2012). También, es un proceso de separación continua, generalmente el consumo energético es bajo (debido únicamente al funcionamiento de las bombas) y el escalamiento es relativamente fácil. Dentro de las desventajas se puede mencionar que las membranas tienen una corta vida útil, se pueden dar procesos de concentración y poseen una baja selectividad (Muthukumarappan & Marella, 2010).

En todos los procesos, la membrana juega un papel muy importante ya que es la barrera selectiva ante dos fases y la transferencia de masa a través de la misma (Belleville & Vaillant, 2015); sin embargo, las características de separación de las membranas dependen no solo de las propiedades fisicoquímicas de las mismas, sino, también de las características del fluido de alimentación, así como, las variables de operación (Kumar, 2006).

El desempeño de una membrana es definido en términos de dos factores: el flujo y la retención o selectividad. El flujo es el volumen de fluido que pasa a través del área de la membrana por unidad de tiempo, mientras que la selectividad es la medida de la tasa de permeación relativa de ciertos compuestos a través de la membrana, la retención es la fracción de soluto retenido por la membrana, lo ideal es una membrana con una alta selectividad y alto flujo (Morais, 2014).

Las membranas pueden ser de diferentes materiales ya sean poliméricas o inorgánicas y de diferentes conformaciones: tubulares o planas. Algunos ejemplos de materiales de membranas poliméricas son acetato de celulosa, polisulfona y poliamida, mientras que para las membranas inorgánicas se emplean materiales como cerámicas, éste último tipo de membranas tienen la ventaja que pueden resistir procesos en los cuáles se aplican altas temperaturas, sin embargo presentan mayor dificultad para el control del tamaño de poros (De & Mondal, 2012).

3.3.2 Proceso de separación

En los procesos de filtración se observan varias etapas: en la primera se da una caída del flujo de permeado, debido principalmente a la formación de una capa de soluto sobre la membrana, llamado comúnmente como torta. La formación de la torta ocurre cuando hidrocoloides y macromoléculas como proteínas de mayor tamaño, comparado con el tamaño del poro de la membrana, son retenidas acumulándose sobre la superficie de la membrana (Morais, 2014).

En la segunda etapa el flujo continúa disminuyendo debido a interacciones entre el material de la membrana y el soluto llamado “incrustación”; en una tercera etapa el flujo alcanza un estado casi estacionario donde el flujo disminuye lentamente debido a la deposición de partículas. Este proceso de deposición en la membrana se ve afectado por la composición química de la estructura de la membrana, las interacciones entre la membrana y los solutos, y las interacciones entre las moléculas de los solutos (Morais, 2014).

En las tecnologías de membranas el fluido de alimentación es bombeado favoreciendo el proceso de separación; puede ser operado en modo de punto muerto (perpendicular) o flujo cruzado (tangencial) (ver **Figura 6**). Cuando se usa el modo de punto muerto el fluido es bombeado hacia la membrana de forma perpendicular de este modo la resistencia de la torta aumenta drásticamente por lo que el flujo de permeado disminuye. Por el contrario, en el flujo cruzado el fluido es bombeado tangencialmente, o a través de la superficie de la membrana, lo cual presenta la ventaja de que reduce la colmatación de la misma. Sin embargo, velocidades altas causan erosión de los sólidos acumulados en la membrana reduciendo de este modo la resistencia de la torta al flujo (Muthukumarappan & Marella, 2010).

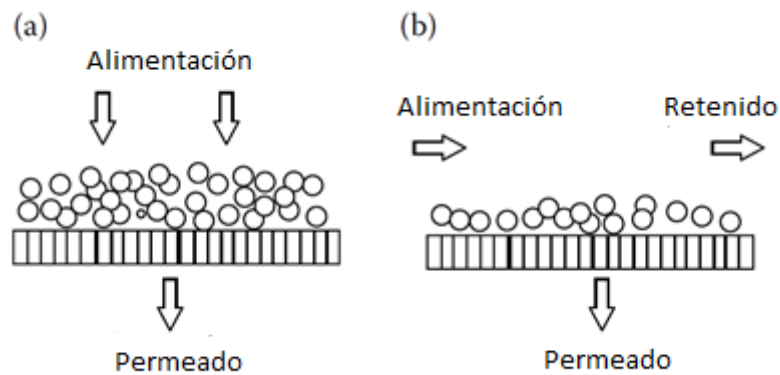


Figura 6. Tipos de alimentación en sistemas de membranas. A) flujo muerto o perpendicular b) flujo cruzado o tangencial. Adaptado de (Muthukumarappan & Marella, 2010).

Los principales factores que afectan el flujo de permeado son la presión, la temperatura, la viscosidad y la densidad del líquido de alimentación (relacionada con la concentración de solutos), la velocidad tangencial y el modo de alimentación (perpendicular o tangencial). El flujo de permeado es directamente proporcional a la presión aplicada e inversamente proporcional a la viscosidad; la cual se ve afectada por la temperatura y la concentración de sólidos. Un incremento en la concentración de sólidos afecta la viscosidad, densidad y la difusividad causando un decremento del flujo de permeado y un aumento de la colmatación de la membrana (Morais, 2014).

Sin embargo, el mecanismo de separación es mucho más complejo que la retención o flujo de partículas de determinado diámetro, pues muchas variables como la composición de la membrana, el método de elaboración, la morfología y configuración 3D de las moléculas, así como las interacciones con la superficie de la membrana y factores como presión y temperatura intervienen en los procesos de filtración (Morais, 2014).

Tal y como se menciona más adelante, existen diferentes procesos de membranas dependiendo del tamaño de poro de la membrana y de la presión que se aplique. Si el tamaño de los poros es menor a $0,3 \mu\text{m}$ se expresa normalmente como “molecular weight cut off” (MWCO). El MWCO puede ser

considerado como una guía aproximada del tamaño de poro, ya que el diámetro efectivo de las moléculas orgánicas varía dependiendo no solo de la conformación de ellas, sino también del pH, fuerza iónica, temperatura entre otros factores. Por lo tanto, el tamaño de poro o MWCO de una membrana puede verse ligeramente variado por la naturaleza del producto y la colmatación de la misma (Yoon, 2015). Debido a la importancia del tamaño de poro que presentan las membranas es uno de los factores más controlados durante el proceso de elaboración (Morais, 2014).

3.3.3 Tipos de separación

Los principales procesos de separación a través de membranas incluyen la microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, estos procesos pueden distinguirse por el tamaño de partículas o moléculas que pueden ser retenidas lo cual está relacionado con el tamaño del poro de la membrana, tal y como ya se mencionó (Morais, 2014).

La microfiltración es generalmente usada para la remoción de partículas finas como bacterias y la reducción de turbidez, es decir, para clarificar ya que permite separar moléculas y partículas basados en el tamaño y la solubilidad. Se emplean membranas que poseen tamaños de poro entre 1- 0,1 μm (Belleville & Vaillant, 2015; Yoon, 2015). El flujo de tipo tangencial es preferido ya que se evita la formación de la torta. Se emplean presiones transmembrabarias de 0,3-2 bar. El principal problema de este proceso es la presencia de agregados coloidales presentes en el fluido de alimentación que colmatan los poros de la membrana. El uso de membranas cerámicas ha permitido el desarrollo de esta tecnología ya que permite trabajar en condiciones de acidez, álcali así como una alta estabilidad al calor, además del uso de membranas multicanales con alta permeabilidad (Muthukumarappan & Marella, 2010).

Por su parte, la ultrafiltración es usada para la concentración y fraccionamiento de macromoléculas pues permite simultáneamente purificar, concentrar y fraccionar moléculas de una suspensión coloidal. Se emplean membranas con tamaño de poro más pequeño que 0,1 μm ; el MWCO tiene un

rango 1000 a 200 000 Da lo cual permite separar macromoléculas pero no iones inorgánicos (Belleville & Vaillant, 2015; Yoon, 2015). Debido a que el tamaño de los poros es más pequeño, se emplean presiones de un rango de 1 a 15 bar, es decir, mayores a las de microfiltración (Muthukumarappan & Marella, 2010).

En el caso de la nanofiltración su uso es principalmente para el tratamiento de agua y la desmineralización del suero, así como la concentración de pequeñas moléculas orgánicas (Belleville & Vaillant, 2015). También, es usada en muchas ocasiones para la retención de iones divalentes. Las presiones utilizadas en estos procesos son mayores a las de micro y ultrafiltración, pero menores que en otros procesos como la ósmosis inversa (Yoon, 2015). La nanofiltración remueve partículas con pesos moleculares menores que 300-1000 Da, y retiene las demás (Muthukumarappan & Marella, 2010).

Por su parte, la ósmosis inversa es usada principalmente para la desalinización del agua, pero además es ampliamente usada para la concentración de compuestos termosensibles de soluciones acuosas. Sin embargo, la combinación de varios procesos membranarios permiten una mejor separación (Belleville & Vaillant, 2015).

La diafiltración, por su parte, es un proceso en el cual el retenido al final del proceso membranario (micro, ultra o nanofiltración) es diluido con agua, y es procesado nuevamente. La cantidad de agua a adicionar depende del soluto que será removido en un rango del 40 al 200% del volumen inicial de alimentación (Muthukumarappan & Marella, 2010). La diafiltración es empleada para aumentar la purificación del retenido eliminando moléculas que no son de interés.

3.4 Superficie de respuesta

La superficie de respuesta es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas para modelar y analizar un problema; en el cual una variable respuesta de interés es influenciada por varios factores o variables y cuyo objetivo es optimizar dicha respuesta (Montgomery, 2004). Permite al investigador conocer la respuesta de los factores sobre una región de interés, así como, evaluar la sensibilidad de la respuesta de los factores a los tratamientos

(Kuehl, 2000). Incluye diseños estadísticos de experimentos, técnicas de modelación de regresiones y métodos de optimización. En las aplicaciones, normalmente el investigador controla las variables independientes o factores y observa las variables respuesta como una salida del experimento (Myers, 2012).

En una superficie de respuesta la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida; por lo tanto, el primer paso es encontrar una adecuada aproximación de la relación entre la variable respuesta y el conjunto de variables independientes. Usualmente se emplean polinomios de orden bajo para las variables independientes (Kuehl, 2000; Montgomery, 2004). Los modelos de primer orden asumen que la variable independiente tiene un efecto lineal sobre la variable respuesta. Mientras que los modelos de segundo orden asumen que la variable independiente tiene una curva o efecto cuadrático sobre las variables respuesta (Myers, 2012).

Normalmente, las superficies de respuesta son representadas en forma gráfica, ya que facilita un adecuado entendimiento de las mismas. Éstos pueden ser gráficos en tres dimensiones o gráficos de contornos (ver **Figura 7**). En estos últimos se trazan líneas de respuesta constante en el plano, cada contorno corresponde a una altura particular de la superficie respuesta. El dibujo de contorno juega un papel muy importante en la superficie de respuesta, ya que, permite caracterizar la forma de la superficie y localizar el punto óptimo con razonable precisión (Montgomery, 2004; Myers, 2012).

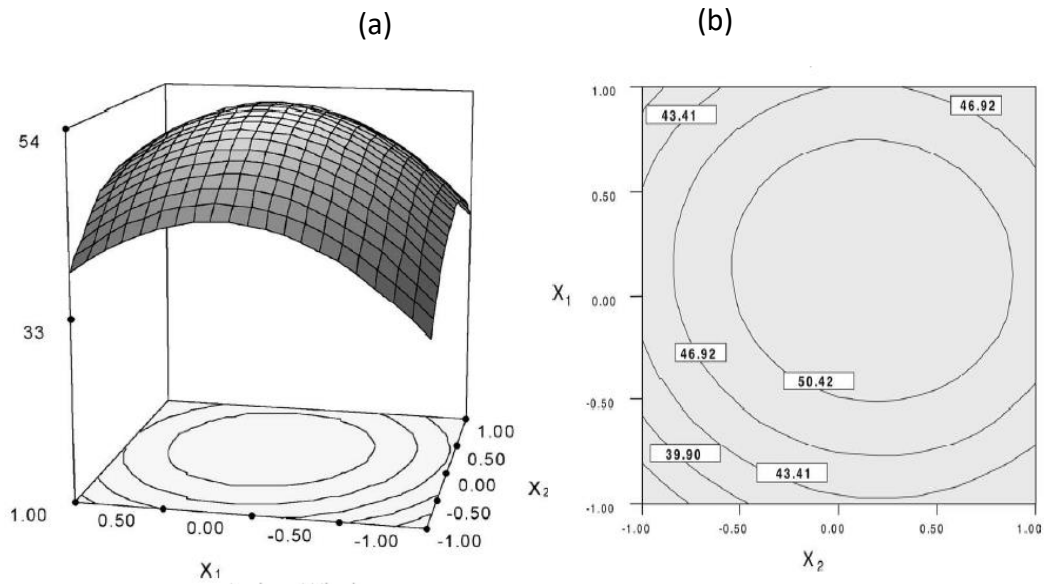


Figura 7. Representación gráfica en tercera dimensión (a) y gráfico de contorno (b) de una superficie de respuesta (Myers, 2012).

El punto donde se optimiza la respuesta predicha es llamado punto estacionario y es donde las derivadas de la respuesta estimada con respecto a las variables de diseño son todas cero. Se puede presentar como: punto de respuesta máxima, punto de respuesta mínima o un punto de silla (Ver **Figura 8**, **Figura 9** y **Figura 10**) la cual se presenta en situaciones en las que el punto estacionario no es ni un máximo ni un mínimo (Montgomery, 2004; Myers, 2012).

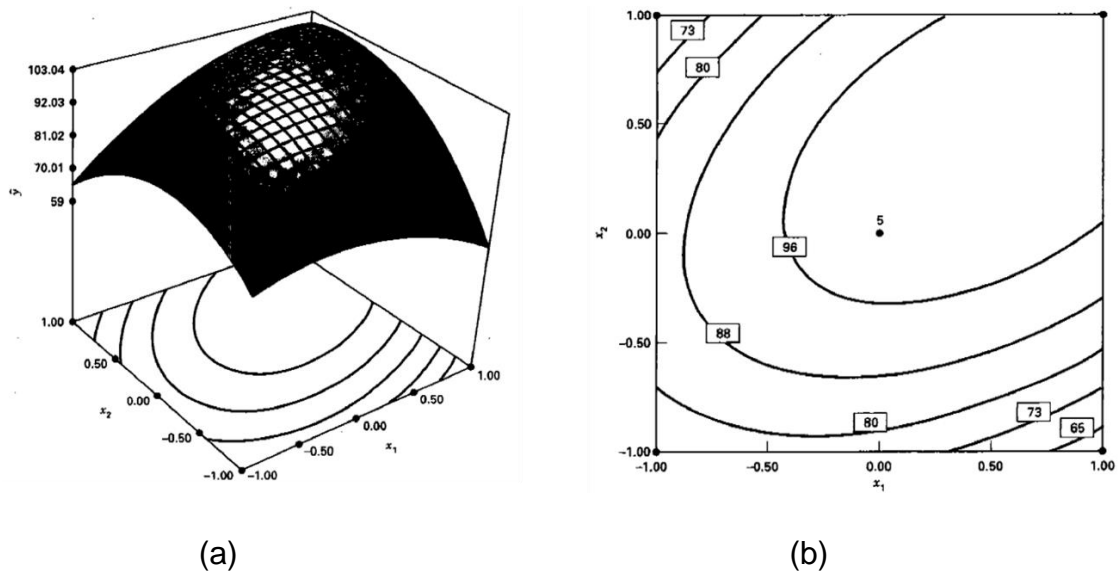


Figura 8. Representación gráfica en 3D (a) y de contorno (b) del punto máximo de una superficie de respuesta (Montgomery, 2004).

Por otra parte, también se puede emplear el análisis canónico, el cual se utiliza rutinariamente para determinar si el punto estacionario es un punto máximo, mínimo o de silla. El análisis canónico comienza con una rotación de la función de respuesta a un nuevo conjunto de ejes, que corresponden a los ejes principales del sistema de contorno real (Myers, 2012).

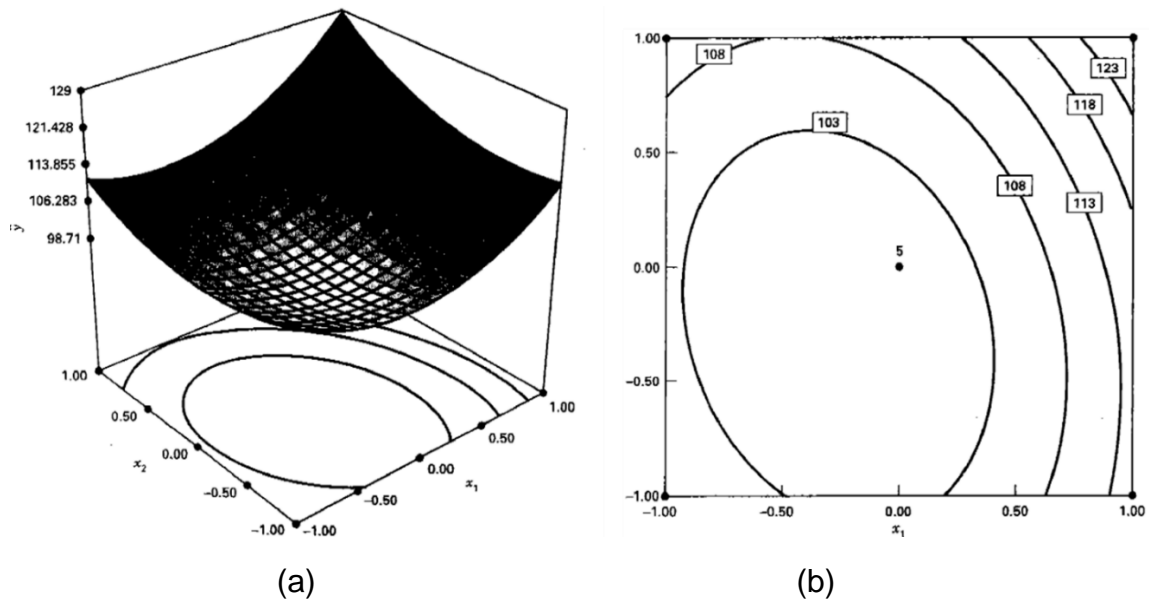


Figura 9. Representación gráfica en 3D (a) y de contorno (b) del punto mínimo de una superficie de respuesta (Montgomery, 2004).

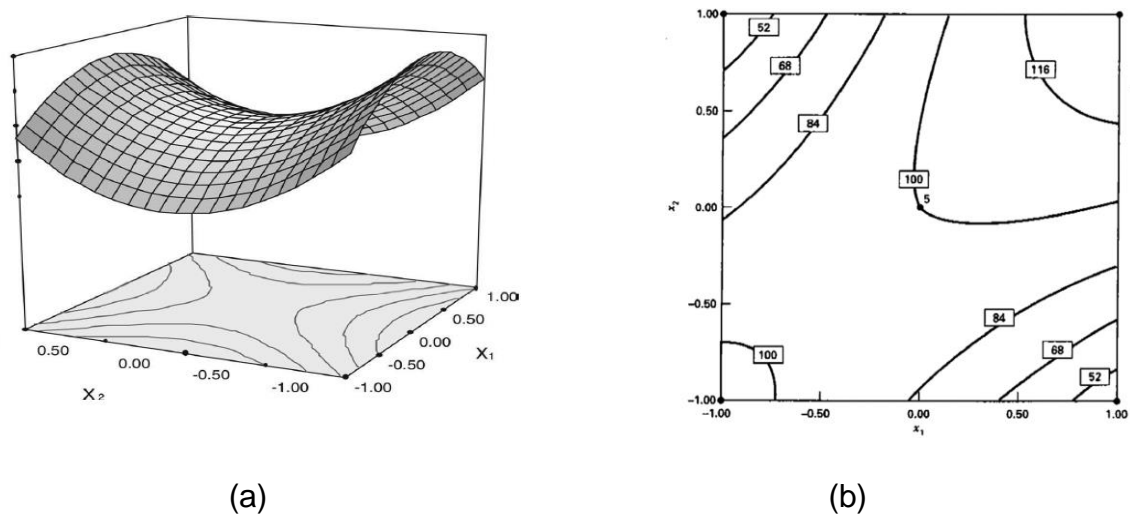


Figura 10. Representación gráfica en 3D (a) y de contorno (b) del punto sillín o silla de montar de una superficie de respuesta (Montgomery, 2004; Myers, 2012).

Cuando un diseño es de segundo orden es común usar el diseño central compuesto el cual consta de un factorial 2^k con n_f corridas, $2k$ corridas axiales y n_c puntos centrales (Montgomery, 2004). Una ventaja de la implementación de las repeticiones de los puntos centrales en un diseño factorial $2k$, es obtener una estimación atractiva del error que es independiente de la selección del modelo, es decir, que el error puro depende de la repetición o replicación. La adición de puntos centrales proporciona la capacidad de determinar si la curvatura (o efectos cuadráticos) está presente en la región experimental. El número de puntos centrales es una consideración importante para mantener la estabilidad de la variancia para diseños esféricos donde se pueden usar de 3 a 5 puntos centrales mientras que para un diseño cuboidal una o dos corridas pueden ser aplicadas (Myers, 2012).

Por otra parte, la rotabilidad es de suma importancia en los modelos de segundo orden ya que proporciona buenas predicciones en toda la región de interés. Esto implica que la variancia es la misma en todos los puntos x que están a la misma distancia del diseño central, es decir, que la variancia de la respuesta predicha es constante en esferas. La rotabilidad es una de las razones para elegir un modelo de superficie de respuesta, ya que con este modelo se busca optimizar; por lo tanto, encontrar el punto óptimo que es desconocido antes de realizar el experimento, por lo que tiene sentido emplear un diseño que provea igual precisión en todas las direcciones (la precisión no depende de la orientación o la dirección) (Montgomery, 2004).

Otro diseño estadístico que se emplea en modelos de segundo orden es Box – Behnken (BBD) el cual es un diseño para estimar superficies de respuesta de segundo orden con tres niveles. Dicho diseño está formado por la combinación de 2^k factoriales con un diseño de bloque incompleto, este es un diseño rotatable o casi rotatable con una reducción del número de unidades experimentales o corridas comparado con un diseño 3^n . Es un modelo esférico, con todos los puntos en la esfera de radio $\sqrt{2}$ (Kuehl, 2000; Montgomery, 2004). Debido a que es de naturaleza esférica, no predice bien en los extremos (o esquinas) de la

región de diseño como si lo hacen un diseño central compuesto rotable de tres niveles (ver **Figura 11**). Por lo tanto, el BBD debe limitarse a los casos en que la predicción en las esquinas del cubo no es importante (Myers, 2012). Esto podría ser ventajoso cuando los puntos de las esquinas del cubo representan combinaciones de los factores que son excesivamente costosos o imposible de evaluar debido a limitaciones de procesos físicos (Montgomery, 2004).

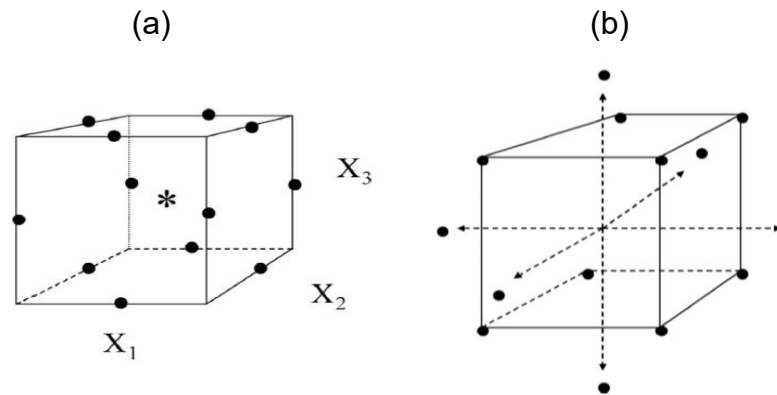


Figura 11. Diseño de Box – Behnken (a) y diseño central compuesto (b) para tres niveles (Myers, 2012).

Por otra parte, en los últimos años se han aplicado modelos de superficie de respuesta con multirespuesta; porque requiere menos tiempo, esfuerzo y recursos que los procedimientos univariados (que, sin embargo, todavía se desarrollan), y facilita la recolección de grandes cantidades de información al tiempo que minimiza el número de experimentos (Vera *et al.*, 2014). En un experimento de multirespuesta se obtienen mediciones en varias respuestas para cada ajuste de un grupo de variables de control. Es decir, es un experimento donde un número de variables respuesta se miden simultáneamente para cada nivel de un conjunto de variables independientes, pueden encontrarse variables respuesta que desean ser maximizadas mientras que otras minimizadas. Cuando se está realizando el análisis de los datos es importante considerar la posible correlación entre las variables (Khuri & Mukhopadhyay, 2010).

Al seleccionar un criterio de optimización de diseño para experimentos de respuesta múltiple, es necesario considerar todas las respuestas

simultáneamente. En este tipo de diseño el significado de "óptimo" a veces no está claro ya que no existe una forma única de ordenar los datos. Las condiciones óptimas para una respuesta pueden estar lejos de ser óptimas o incluso físicamente impracticables para las otras respuestas, desde el punto de vista experimental (Khuri & Mukhopadhyay, 2010).

Para realizar un adecuado análisis de multirespuestas se han desarrollado varias técnicas entre ellas un enfoque gráfico en el cual los contornos de todas las respuestas se superponen entre sí; y se identifica la región donde las condiciones de operación son casi óptimas para todas las respuestas. Sin embargo, a medida que aumenta el número de respuestas y factores de control, encontrar el óptimo gráficamente se vuelve muy complicado (Khuri & Mukhopadhyay, 2010). Otro método empleado es la función de deseabilidad cuyo objetivo es encontrar las condiciones de operación que garanticen el cumplimiento de que todas las variables involucradas provean el mejor valor en la respuesta. Esto se logra convirtiendo las respuestas múltiples en una sola, combinando las respuestas individuales dentro de una sola función compuesta. Los valores de D (Deseabilidad Global) varían entre 0-1, si una de las variables es completamente indeseable $D=0$ y si $D \neq 0$ todas las variables son simultáneamente optimizadas (Vera *et al.*, 2014).

Luego de llevar a cabo los experimentos de la superficie de respuesta y su respectivo análisis, con ayuda de los modelos o ecuaciones se realiza un estudio confirmatorio. Para ello, se llevan a cabo ensayos bajo las condiciones encontradas como óptimas; con el cual se busca comparar de forma experimental los resultados predichos por el modelo, y así confirmar o validar las condiciones encontradas como óptimas mediante la superficie de respuesta (Abas *et al.*, 2008).

3.5 *Análisis de Componentes Principales (PCA)*

El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) tiene como principal objetivo describir la variación de un conjunto de variables correlacionadas, $x_1, x_2, x_3, \dots, x_g$, en un nuevo grupo de variables que no están

correlacionadas, $y_1, y_2, y_3, \dots, y_g$, cada una de ellas es una combinación lineal de las variables .

El PCA transforma las variables originales dependientes en una nueva dimensión no correlacionada, y eso simplifica la estructura de los datos y ayuda en la interpretación de los mismos (Lawless & Heymann, 2010).

Los componentes principales se obtienen por medio de la combinación lineal de aquellas variables dependientes que maximizan la varianza de los datos, por lo tanto, el primer componente principal debe explicar la mayor variabilidad de los mismos (Lawless & Heymann, 2010).

El análisis suele presentarse en forma gráfica (Ver **Figura 12**), cada uno de los ejes (x y y) corresponde a un componente principal. Los puntos corresponden a los tratamientos mientras que los vectores son las variables respuesta. Los vectores alineados a cada eje, así como su longitud, son los que permiten explicar cada componente. Aquellos vectores de poca longitud, es decir, cercanos a cero, indican que no están asociados al componente aunque estén alineados con ellos, ya que esto representa que el vector está más asociado a otro componente. Por otro lado, los vectores de gran longitud y alineados al componente si están asociados a éste mientras que aquellos vectores ubicados entre componentes indican su asociación con ambos (Lawless & Heymann, 2010). Si el vector y los puntos están en la misma dirección, implica que la característica representada por el vector explica mayormente las muestras. Cuando dos vectores se encuentran opuestos significa que esas variables se encuentran correlacionadas.

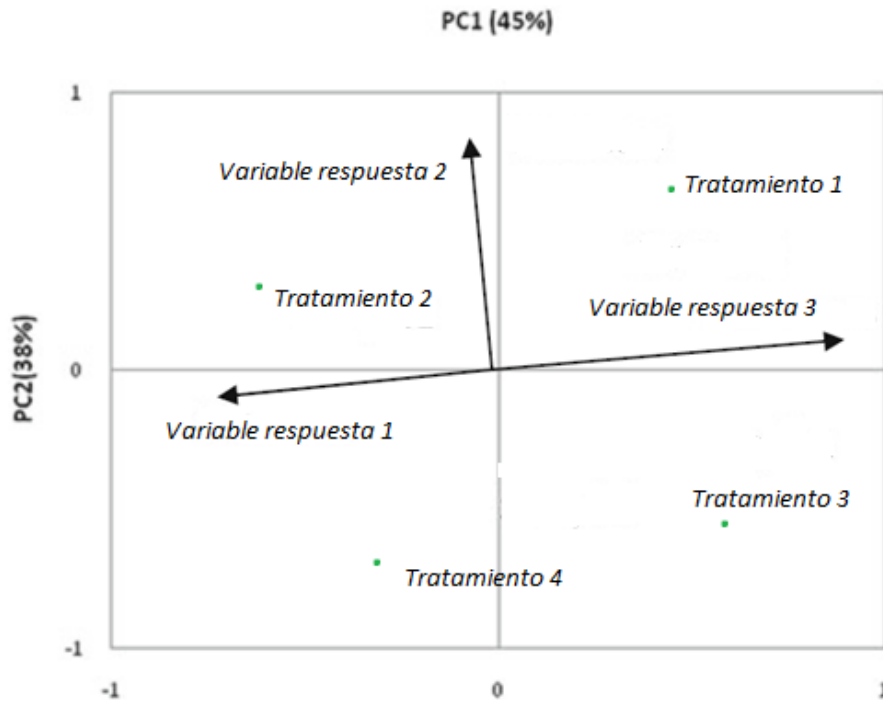


Figura 12. Representación gráfica de un análisis de componentes. Adaptado de (Lawless & Heymann, 2010)

IV. Materiales y métodos

4.1 Localización

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de Costa Rica, en la sede Rodrigo Facio, localizada en San Pedro de Montes de Oca, en la provincia de San José. El proceso de microfiltración, ultrafiltración y diafiltración se llevó a cabo en la planta piloto del CITA y los análisis físico-químicos en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, en el Laboratorio de Química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA).

4.2 Materias primas

La materia prima fue la broza de café maduro de la especie *Coffea arabica* de las variedades Caturra, Catuaí y Villalobos típica; mezcladas en diferentes proporciones, de acuerdo con la finca donde se recolectó. Se trabajó con café orgánico para evitar la presencia de agroquímicos y fue obtenido de varias fincas de la zona de Zarcero en la provincia de Alajuela. La cosecha correspondió al período de 2015-2016. Para el proceso de validación de la superficie de respuesta se obtuvo un segundo lote de broza de café de la zona de Turrialba en agosto del 2016 de las variedades de F_1 millenium, Obata y Catuaí. Las diferentes pruebas se realizaron de un único lote, el cual se microfiltró en una única tanda, fue dividido en bolsas y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriormente realizar los procesos de ultrafiltración y diafiltración, así como de secado. Se utilizó maltodextrina adquirida en Distribuidora del Caribe con un grado de dextrinización de 10-12, humedad de $\leq 6\%$. El ácido cítrico de grado alimentario fue suministrado por IQS y de grado alimentario.

4.3 Efecto del proceso membranario en la reducción del contenido de azúcares del extracto de broza de café

4.3.1 Obtención del extracto de broza de café

Se aplicó la metodología seguida por (Quirós, 2014), luego se realizó la extracción siguiendo la metodología de Ariza (2011).

Los extractos para la validación de la superficie de respuesta se almacenaron a -80 °C.

4.3.2 Equipos empleados en el proceso de membranas

La etapa de microfiltración se llevó a cabo en un equipo que cuenta con una bomba centrífuga y una neumática, un tanque de alimentación y un módulo para membrana tipo tubular de cerámica con área $0,22 \text{ m}^2$. La membrana usada fue marca Membralox con un tamaño de diámetro de poro promedio de $0,2 \mu\text{m}$; el volumen muerto del equipo es de 3,5 L.

Los ensayos de ultrafiltración se llevaron a cabo en la unidad piloto de NF-UF (Iberlact, España). Dicho equipo se compone de un módulo para membranas planas, una bomba de desplazamiento positivo la cual provee el flujo tangencial, un tanque de alimentación, una llave de paso para controlar la presión y un intercambiador de calor para controlar la temperatura. Los ensayos se llevaron a cabo empleando membranas de película delgada con un área efectiva de filtración de 0,0139 a $0,0234 \text{ m}^2$ (ver **Cuadro I**) en la **Figura 13** se muestra un diagrama del equipo empleado.

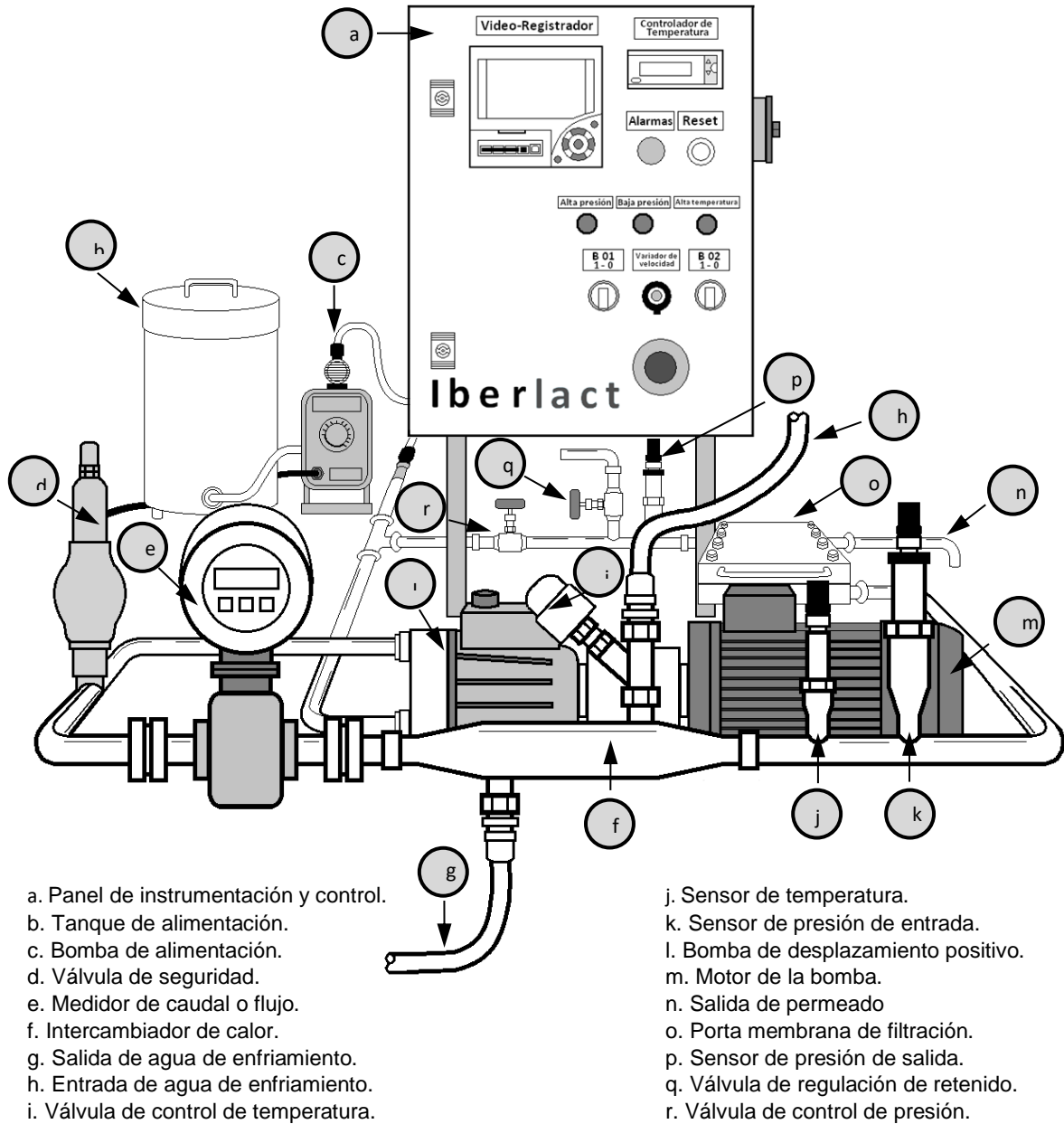


Figura 13. Esquema de la unidad piloto de ultra- y nanofiltración tangencial empleada en los procesos de ultra y diafiltración de un extracto de broza de café. Fuente: Soto (2014).

4.3.3 Elección de la membrana que permita la mayor retención de antocianinas y menor retención de azúcares durante la ultrafiltración (Pruebas preliminares)

A continuación en el **Cuadro I** se muestra la información general de las diferentes membranas usadas con el fin de seleccionar la membrana de UF que permitiera la mayor reducción de azúcares y una alta retención de antocianinas del extracto.

Cuadro I. Información general de las membranas usadas en la selección de la membrana con mayor retención de antocianinas y menor retención de azúcares.

Membrana	Fabricante	País	Material	Peso molecular de corte (MWCO)	Retención de Na ₂ SO ₄
NF270	Dow FILMTEC	USA	Poliamida de película delgada	200-400 Da	-*
Nadir NP010	Micrody-Nadir GmbH	Alemania	Poliétersulfona	-*	35-75%
Nadir NP030	Micrody-Nadir GmbH	Alemania	Poliétersulfona	-*	80-95%
GK**	GE Osmonics	USA	Película delgada de poliamida	2000 Da	-*

-*Datos no suministrados. ** Elegida.

La membrana GK de GE Osmonics fue la membrana elegida como ideal para el proceso de reducción de azúcares y concentración de antocianinas, ya que permitió el mayor contenido de antocianinas e intermedio de azúcares, además, dentro de las membranas evaluadas, ésta fue la membrana que permitió obtener el extracto más puro (menor contenido de sólidos). La membrana Nadir NP010 presentó un alto contenido de azúcares mientras que la NF270 presentó valores menores, pero con menos antocianinas que la GK. Por otra parte, la membrana Nadir NP030 presentó un flujo de permeado demasiado bajo y, a pesar de que se aumentó la presión a 30 bar, el extracto se fermentó dentro del equipo antes de finalizar el proceso (aproximadamente 15 h), por lo que no pudo realizarse la cuantificación. En los Anexos **Cuadro A1** se muestran los resultados

de la cuantificación de azúcares, antocianinas e índice de acidez de los retenidos según las diferentes membranas utilizadas.

4.3.4 Evaluación del proceso membranario en la reducción de azúcares de un extracto de broza de café

Se evaluó la efectividad del uso de la microfiltración, la ultrafiltración y la diafiltración en la reducción de azúcares totales, así como, en la obtención de un extracto más puro y concentrado de broza de café (Ver **Figura 14**). Dichas separaciones son posibles gracias a las diferencias en los pesos moleculares entre los azúcares, glucosa (180,16 g/mol), fructosa (180,16 g/mol) y sacarosa (342,30 g/mol), con las antocianinas. La principal antocianina presente en la pulpa de café es ciadinina 3- rutinósido la cual tiene un peso molecular de 595 g/mol (Miranda *et al.*, 2012). De manera que, al emplear una membrana adecuada (determinada previamente en pruebas preliminares) se buscó separar los pigmentos de interés de los azúcares. La microfiltración y ultrafiltración se han utilizado en la purificación y concentración de un extracto de subproducto de mora; por lo tanto, las condiciones de ultrafiltración y microfiltración fueron las mismas que utilizó Soto (2014). En el proceso de ultrafiltración se usaron membranas con un MWCO de 100- 2000 Da. En la etapa de diafiltración se empleó agua desionizada y se utilizó 1 diavolumen. Para la determinación del diavolumen se empleó la ecuación 1, donde V_a es el volumen de agua adicionada y V_r es el volumen retenido.

$$DV = \frac{V_a}{V_r} \quad [1]$$

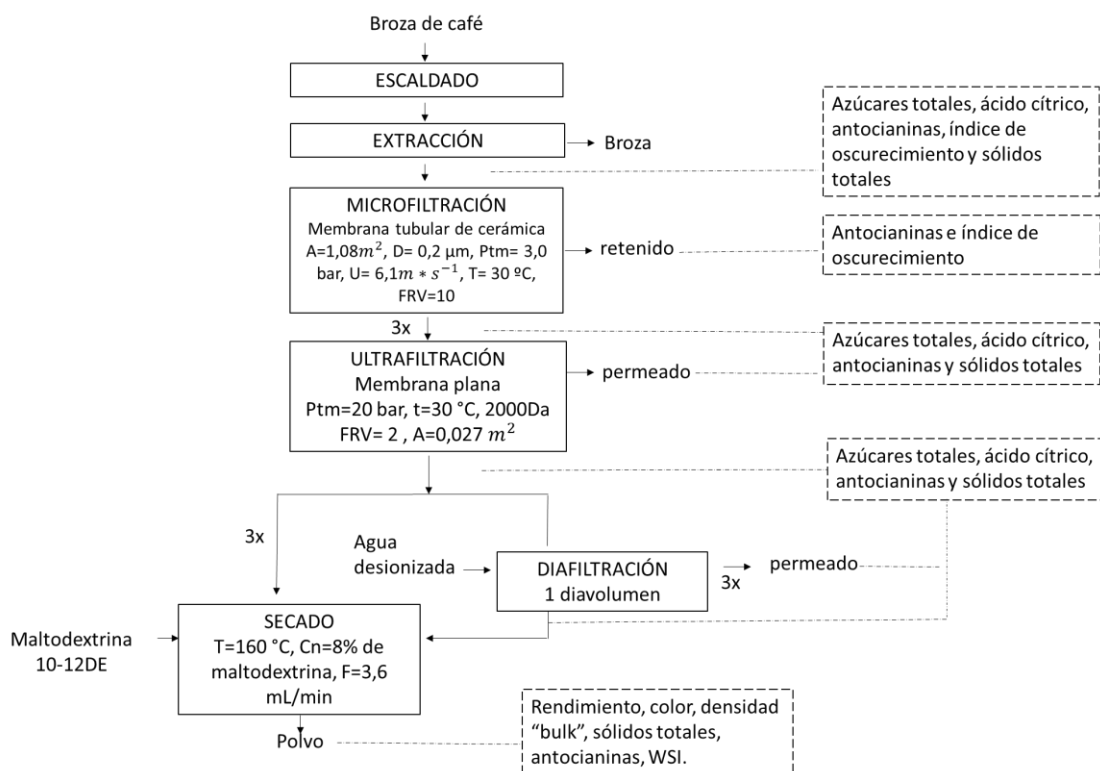


Figura 14. Diagrama del proceso para la obtención de un producto en polvo rico en antocianinas a partir de un extracto de broza de café.

Para evaluar el efecto del proceso membranario en la reducción de azúcares y ácidos se cuantificaron los azúcares, los sólidos totales, el ácido cítrico y la humedad del extracto colado (se removió la broza) así como al permeado, tanto ultrafiltrado como diafiltrado. El contenido de ácido se cuantificó ya que la presencia de ácido cítrico favorece la estabilidad del pigmento (Quirós, 2014). Para ello, se realizaron 3 repeticiones del proceso de ultrafiltrado así como para el diafiltrado, pero solo una repetición de microfiltración.

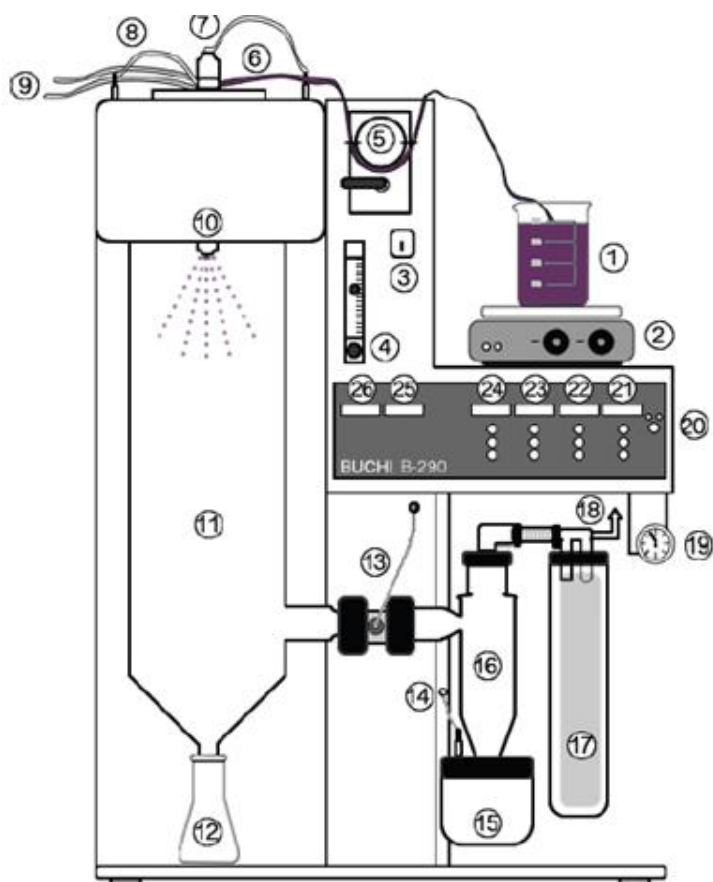
Además, se cuantificaron las antocianinas, tanto en el retenido como en el permeado, para evaluar si durante la microfiltración había pérdidas. Por su parte, el índice de oscurecimiento fue cuantificado en el filtrado (alimentado al microfiltrador) y el retenido del microfiltrado, para verificar si con dicha etapa se lograba eliminar polifenoles degradados por enzimas endógenas. También se comparó los datos después de la microfiltración con aquellos ultrafiltrados para

determinar la retención de antocianinas, no se realizó análisis estadístico ya que era un único lote del extracto microfiltrado.

4.4 Efecto del proceso membranario en el secado del extracto de broza de café y la calidad del polvo final

4.4.1 Equipo empleado en el secado del extracto de broza de café sometido al proceso membranario

El secado se llevó a cabo en un secador por atomización de marca Büchi Labortechnik, modelo Mini Spray Dryer B-290. La temperatura máxima de trabajo es de 220 °C, el flujo de aire máximo de 35 m³/h, el tamaño de orificio de la boquilla o *nozzle* es de 0,7 mm, el tiempo de residencia promedio es de 1,0 a 1,5 s y el tamaño de partícula promedio de 1 a 25 µm. La **Figura 15** muestra un diagrama del equipo.



Partes del equipo de secado por atomización

- | | |
|---|---|
| ① Mezcla alimentada | ⑭ Conexión eléctrica a tierra |
| ② Plantilla de agitación magnética | ⑮ Contenedor receptor de producto deshidratado |
| ③ Interruptor de encendido/apagado | ⑯ Ciclón |
| ④ Medidor de flujo de gas | ⑰ Filtro |
| ⑤ Bomba peristáltica | ⑱ Conexión a aspirador |
| ⑥ Entrada de mezcla | ⑲ Manómetro |
| ⑦ Conexión de limpiador de tobera | ⑳ Regulador de válvula de alimentación |
| ⑧ Conexión de aire comprimido | ㉑ Pantalla y regulador de limpiador de tobera |
| ⑨ Conexión de sistema de enfriamiento de aspersor | ㉒ Pantalla y regulador de bomba |
| ⑩ Aspersor | ㉓ Pantalla y regulador de aspirador |
| ⑪ Cilindro de secado | ㉔ Pantalla y regulador de temperatura de entrada |
| ⑫ Contenedor | ㉕ Pantalla indicadora de la temperatura de salida |
| ⑬ Sensor de temperatura | ㉖ Pantalla indicadora de la temperatura de entrada medida |

Figura 15. Esquema del equipo de secado por atomización Büchi Mini Spray Dryer B-290 empleado para secar el extracto de broza. Fuente: Hernández (2017).

4.4.2 Evaluación del efecto de la diafiltración en el extracto de broza de café sobre el proceso de secado por atomización

Con el fin de evaluar el efecto de la diafiltración en la reducción de azúcares del extracto y posteriormente en el producto en polvo; se aplicó un secado tanto al retenido solo ultrafiltrado como al retenido ultrafiltrado y diafiltrado bajo las condiciones empleadas por Quirós (2014): 160 °C de temperatura de entrada y 94 °C de salida, 90% en el aspirador, 12% en la bomba y 3 en el *nozzle* (Ariza, 2011) y una presión del filtro de 3 800 Pa. Previo al proceso de secado se adicionó 8% de maltodextrina. Posterior al secado, se tomaron fotografías para comparar de manera cualitativa el efecto de la diafiltración sobre la pegajosidad y además se determinó el rendimiento, índice de solubilidad en agua (WSI), la densidad “bulk”, el color, el contenido de sólidos totales y antocianinas.

Para las variables respuesta de contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y antocianinas se expresaron, además, los resultados como porcentajes de retención con el fin de conocer las pérdidas en cada etapa. Para los procesos de membrana se utilizó la ecuación 2, donde Cn_i es la concentración del líquido de alimentación y Cn_f es la concentración final en el retenido expresadas ambas en base húmeda; m_i y m_f son las masas de líquido de alimentación y del retenido respectivamente, y R es el porcentaje de retención.

$$R = \frac{Cn_i \left(\frac{m_i}{m_f} \right)}{Cn_f} * 100 \quad [2]$$

Para la retención de antocianinas en el secado por atomización se utilizó la ecuación 3. Donde Cn_{polvo} es la concentración de antocianinas en el polvo y Cn_{ext} es la concentración del extracto o líquido de alimentación, expresadas ambas en base seca.

$$R = \frac{Cn_{polvo}}{Cn_{ext}} * 100 \quad [3]$$

4.4.3 Diseño experimental

Para determinar la efectividad de la diafiltración (sin secado) del extracto de broza de café, en la reducción de azúcares, ácidos, sólidos totales y antocianinas, se usó un diseño irrestricto aleatorio con un factor y dos niveles (antes y después de la diafiltración), para cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones.

Por otra parte, para evaluar la efectividad de la diafiltración en el extracto deshidratado se aplicó un diseño irrestricto aleatorio con un factor y dos niveles (diafiltrado vrs diafiltrado seco y sin diafiltrar vrs sin diafiltrar seco). Se emplearon como variable respuesta el rendimiento, la densidad “bulk”, el color, y la humedad. Para cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones.

4.4.4 Análisis de datos

Para analizar los resultados obtenidos al aplicar diafiltración al extracto de broza de café se aplicó una prueba de t- Student con un nivel de significancia del 5%.

Por otra parte, para analizar los resultados obtenidos de los extractos deshidratados se aplicó una prueba de t-Student para cada variable respuesta con un nivel de significancia del 5%.

4.5 Condiciones de secado por atomización y su efecto en las características de un polvo rico en antocianinas

4.5.1 Preparación de las muestras antes del secado (adición de recubrimiento)

Para la obtención del extracto de broza de café se siguió el procedimiento seguido por Quirós (2014) y las etapas previas de microfiltración, ultrafiltración y diafiltración, luego se adicionaron concentraciones de recubrimiento de mínimo 3% y máximo 8%. Se eligió la concentración del 3% como mínimo ya que fue el porcentaje más bajo encontrado en la literatura (Mishra *et al.*, 2014). Por su parte, se tomó como máximo el 8% ya que ésta es la condición empleada por Quirós (2014) que causó dilución de la coloración y que, por lo tanto, se deseaba reducir. El recubrimiento utilizado fue maltodextrina con grado de dextrinización de 10-12 DE, ya que es el que se encuentra disponible en el país y, además, está en el

ámbito que se encontró que permite buenos resultados en el secado de jugos de frutas (Ersus & Yurdagel, 2007; Tonon *et al.*, 2010; Tonon *et al.*, 2011).

4.5.2 Condiciones de secado

Se varió la temperatura de entrada al secador por aspersion con el fin de determinar la condición que causara la menor reducción de color del extracto de broza de café. Se utilizó la temperatura de 160 °C que fue la empleada por Ariza (2011) y Quirós (2014) en extracto de broza de café como la más alta y 125 °C, basándose en literatura, como la más baja, ya que es en la que se ha presentado menor pérdida de antocianinas en amla (*Embllica officinalis*) (Mishra *et al.*, 2014). Además, debido a las posibles variaciones de las viscosidades y humedades iniciales de los extractos debido a las diferentes concentraciones de maltodextrina se varió el flujo de alimentación del equipo de 1,5 mL/min como mínimo y un máximo de 5,7 mL/min.

4.5.3 Diseño experimental

Se aplicó una metodología de superficie de respuesta de Box-Behnken empleando tres factores: la concentración de recubrimiento, la temperatura de entrada al secador y el flujo de alimentación, con tres niveles cada factor. Las variables respuestas evaluadas fueron: color (h° , C^* y L^*), humedad, contenido de antocianinas totales, rendimiento y densidad “bulk” de los polvos obtenidos tras el secado con diferentes temperaturas de entrada, flujo de alimentación y concentraciones de recubrimiento.

El diseño experimental se muestra a continuación en el **Cuadro II**.

Cuadro II. Diseño Box-Behnken para el estudio del efecto de la temperatura de entrada al secador por atomización, la concentración del recubrimiento y el flujo de alimentación sobre un extracto de broza de café.

	x_1 Temperatura	x_2 Concentración de maltodextrina	x_3 Flujo de alimentación
2 ² Factorial Temperatura vrs Concentración	-1	-1	0
	+1	-1	0
	-1	+1	0
	+1	+1	0
2 ² Factorial Temperatura vrs Flujo de alimentación	-1	0	-1
	+1	0	-1
	-1	0	+1
	+1	0	+1
2 ² Factorial Concentración vrs Flujo de alimentación	0	-1	-1
	0	+1	-1
	0	-1	+1
	0	+1	+1
Diseño central	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0

4.5.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados por la metodología de Box-Behnken, la cual generó un modelo, que permitió determinar las condiciones óptimas, es decir, aquellas que causaron el menor cambio de color y pérdida de antocianinas del extracto de broza de café secado por atomización con el uso de maltodextrina.

Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.3 (Cary, NC, USA) para determinar el modelo que proveía un máximo en el contenido de antocianinas, color L^* y C^* y un mínimo de h° y de densidad "bulk". Para determinar si los modelos matemáticos generados para cada variable respuesta tenían un buen ajuste y eran significativos se tomó en cuenta el coeficiente de determinación (R^2), el R^2 ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y la distribución de residuos.

4.5.5 Análisis de Componentes Principales

Para evaluar la variabilidad de las diferentes variables respuesta al aplicar los tratamientos de la superficie de respuesta, se realizó un análisis de componentes principales con ayuda del programa XLSTAT (Addinsoft, USA).

4.5.5 Validación de las condiciones predichas por el modelo

Mediante la superficie respuesta se obtuvieron una serie de ecuaciones, las cuales suministraron los valores de las variables respuesta y las condiciones óptimas. Para validar el modelo, se realizaron tres ensayos bajo las condiciones óptimas (de temperatura de secado, concentración de maltodextrina y flujo de alimentación), se cuantificaron las variables respuestas y se compararon con lo predicho por el modelo. Los ensayos se realizaron con dos extractos diferentes, ya que, el extracto almacenado (a -80°C) podía presentar degradaciones durante el almacenamiento, por lo que, se obtuvo otro extracto, pero de la zona de Turrialba en el período de agosto del 2016 y de las variedades F_1 millenium, Obata y Catuaí, para descartar que las diferencias se pudieran deber a variaciones en el contenido de antocianinas. El valor predicho por el modelo debió

encontrarse dentro del intervalo de confianza de los valores promedios obtenidos experimentalmente en el punto óptimo, según cada variable respuesta.

4.6 Métodos de análisis

4.6.1 Determinación de azúcares totales

Se siguió el protocolo P-SA-MQ-006 del CITA basado en los métodos expuestos por Pirisino (1983) y Sullivan & Carpenter (1993); que corresponde a la determinación de azúcares totales por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (Shimadzu, USA). El extracto se inyectó en la columna cromatográfica Phenomenex Luna NH₂, 5 m, 250 mm x 4,6 mm para su separación. La identificación y cuantificación se realizó utilizando un detector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. Se inyectaron patrones de azúcares de concentración conocida, los cuales permitieron la elaboración de curvas de calibración necesarias para cuantificar y aportar los tiempos de retención necesarios para la identificación.

La fase móvil utilizada fue acetonitrilo: agua grado 1 o HPLC (80:20), filtrada por microporo (0,45 µm), con un flujo de 1,5 mL/min, a temperatura de 35 °C. Se inyectaron 20 µL de la muestra y de los patrones, los cuales tenían concentraciones entre 0,1 % y 1% en cada uno de los azúcares que componen la mezcla. Para realizar los cálculos de la determinación de azúcares totales, se utilizó la ecuación 4.

$$\frac{g}{100g \text{ de muestra}} = \frac{\left(\% \left(\frac{g}{100mL}\right)\right) * Volumen (mL)}{masa \text{ de muestra } (g)} * 100 \quad [4]$$

4.6.2 Determinación de la acidez total expresada como equivalentes de ácido cítrico

La determinación de ácido cítrico se realizó mediante potenciometría debido a la presencia de coloración en el extracto de broza de café que dificulta la lectura del punto final. Para ello se usó NaOH 0,10 M como agente valorante, que fue previamente estandarizado. En un beacker se colocaron aproximadamente 75 mL (que cubría el electrodo) del extracto de broza de café con agitación constante (que permita mezclado sin salpicar). Se adicionó el NaOH lentamente hasta que el pH-metro mostró un valor de pH de 8,1; ya que

se ha observado que a este pH se da el punto final de una valoración de ácido cítrico (Kenkel, 2002). Para determinar los g de ácido cítrico se usó la ecuación 5:

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{(V(\text{mL}) * Cn (\text{mol/L})) \text{NaOH} * 0.064 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{m \text{ extracto (g)}} \quad [5]$$

4.6.3 Determinación de la humedad o materia seca

Para la determinación de materia seca tanto del producto en polvo como del extracto concentrado, se determinó la humedad utilizando una estufa de vacío, como se indica en el método de la AOAC 920.151: Sólidos totales en frutas y productos de frutas (AOAC, 2002). El uso de la arena fue de suma importancia en el extracto, para ello se adicionaron 3 g de arena y 3 g de extracto. Para el producto en polvo se adicionaron 2 g de polvo y no se utilizó arena.

Para el pigmento en polvo, inicialmente se le agregó maltodextrina al extracto para secarlo, por lo que a la materia seca obtenida se le restó la materia prima proveniente de la maltodextrina y así obtener cuánto corresponde a pigmento, y así tener valores de materia seca comparables con la materia seca de los extractos concentrados (sin secar).

4.6.4 Determinación de la densidad “bulk”

La densidad “bulk” del polvo fue determinada pesando 2 g de muestra y colocándolos en un cilindro de 50 mL graduado. Posteriormente se colocó en un agitador tipo vortex por 1 min. La densidad “bulk” se obtuvo dividiendo la masa del polvo entre el volumen ocupado por el mismo dentro del cilindro (Tonon *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2014). Este procedimiento se realizó por triplicado.

4.6.5 Determinación de antocianinas totales.

A continuación se detalla la metodología para la determinación del contenido total de antocianinas monoméricas según el método propuesto por Giusti y Wrolstad (2001).

Se determinó el factor de dilución (fd) adecuado para la muestra, diluyendo con KCl 0,025 M, pH=1, hasta lograr que la absorbancia a $\lambda_{\text{vis-máx}}$ esté dentro del

rango adecuado (entre 0,2 y 0,8) para que se cumpla la ley de Beer (Pino y Pérez, 1983). Para este caso, la $\lambda_{vis-m\acute{a}x}$ es 510 nm, según lo indicado por Wrolstad *et al.* (2005) para las antocianinas principales de la broza de café, cianidina-3-rutinósido y la cianidina-3-glucósido. Para lograr estas especificaciones se toman alícuotas del extracto y del buffer hasta 5mL que permitieran lograr los valores de la absorbancia dentro del rango dicho. En el caso del extracto seco, se pesó 1 g del polvo se aforó en un balón de 10 mL y luego se tomaron las alícuotas y se mezclaron con el buffer pH 1 hasta 5 mL.

Se prepararon dos diluciones de la muestra; la primera con KCl 0,025 M, pH 1 y la otra con acetato de sodio 0,4 M, pH 4,5, utilizando el factor de dilución determinado anteriormente. Se dejaron en reposo las muestras por 15 minutos. Luego se midió la absorbancia de ambas muestras a 510 y 700 nm (la longitud de onda de 700 nm se utilizó como parámetro de corrección), contra una cubeta con agua destilada. Las mediciones se realizaron en un lapso de tiempo entre 15 y 60 minutos.

Se calculó la absorbancia de la muestra diluida con la ecuación 6:

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 1,0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 4,5} \quad [6]$$

Se calculó la concentración de antocianinas monoméricas (mg/g) en la muestra original según la ecuación 7:

$$\text{Concentración de antocianinas monoméricas} = \frac{(A * MM * 1000 * V)}{(\Sigma * 1 * m)} \quad [7]$$

Donde MM es la masa molar de la antocianina mayoritaria (cianidina-3-rutinósido) y se utiliza 631 g/mol (Ariza, 2011). A es el valor obtenido según la ecuación 6; 1000 es el factor de conversión de gramos a miligramos, V es el volumen del balón (en el caso de las muestras en polvo), Σ es la absortividad molar, se utilizó $28\ 800\ L \cdot cm^{-1} mol^{-1}$ (Ariza, 2011; Prata y Oliveira, 2007) y m es la masa de la muestra en gramos (en el caso de las muestras en polvo). En esta fórmula se asume una longitud de recorrido de luz de 1 cm. El resultado obtenido se expresa en mg de cianidina-3 rutinósido/100g de muestra (extracto).

Esta determinación se realizó con un espectrofotómetro marca Jasco, modelo V-630 del laboratorio de Química del CITA.

Es importante especificar que el resultado se expresa en base seca. Para ello, se les calculó la materia seca a los extractos. En el caso de los polvos se determinó la materia seca proveniente de la maltodextrina, la materia seca del extracto inicial y la materia seca del polvo, con el fin de reportar los resultados en base seca excluyendo la cantidad que corresponde a la maltodextrina, es decir, en el caso de las muestras en polvo los resultados fueron expresados como mg de cianidina-3 rutinósido/ 100 g extracto; con el fin de poder comparar las muestras antes y después del secado; en los anexos se presenta una muestra de cálculo.

4.6.6 Determinación del índice del oscurecimiento

Para la determinación de este parámetro se midió la absorbancia de la muestra a pH 1 (sección 4.6.5) a dos longitudes de onda diferentes: 510 nm, donde se presenta la absorbancia máxima de las antocianinas, y 420 nm, donde se detectan no solo antocianinas sino también productos pardos (Buglione y Lozano, 2002; Wrolstad *et al.*, 2005; Del Pozo-Insafran *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2010).

Este índice se calculó como se indica en la ecuación 8:

$$\text{índice de oscurecimiento} = \frac{A_{510 \text{ nm}}}{A_{420 \text{ nm}}} \quad [8]$$

4.6.7 Determinación instrumental del color

El color se determinó con un colorímetro marca Hunter Lab, por medio de la escala CIE L*, a*, b* (CIELAB), utilizando una fuente de luz D65, un ángulo de visión de 10 °, con geometría óptica 45/0.

Una vez medidos dichos parámetros se procedió a determinar el croma (C*, saturación), la tonalidad (h°, hue) y la luminosidad (L*).

4.6.8 Determinación del rendimiento másico

Para la determinación del porcentaje del rendimiento másico se midió la masa del extracto seco recuperado del envase receptor (Ver **Figura 15**) y la masa

de la sustancia alimentada, se calculó como se muestra a continuación en la ecuación 9:

$$\%Rendimiento\ mástico: \frac{Masa\ del\ extracto\ seco\ recuperado\ (g)}{Masa\ de\ muestra\ alimentada\ (g)} * 100 \quad [9]$$

4.6.9 Determinación de cianidina 3-rutinósido por HPLC

Para los polvos de la superficie de respuesta se cuantificaron la cianidina 3-rutinósido por el método de HPLC, ya que, los puntos extremos presentaron coloraciones oscuras que interfirieron en la determinación por el método de diferencia de pH por ser un método espectrofotométrico.

Se usaron como fases móviles una disolución de ácido fórmico al 2% y otra de acetonitrilo 80% y ácido fórmico 2%; con una columna cromatográfica Phenomenex Luna 5 μ m C18 100A , tamaño 150 mm x 2,00 mm, número de serie 546184-17Se realizaron patrones de 150, 125, 100, 75, 50, 25 y 10 ppm de cianidin-3 rutinósido. La temperatura usada en el horno fue de 30 °C inyectando 20 μ L con un flujo de 0,30 mL/min.

Se tomó 0,1 g del polvo y se disolvió en un balón aforado de 10 mL, se agitó vigorosamente en un Vortex, se pasó por un microporo de 0,2 μ L y se tomaron alícuotas con micropipeta de 1000 μ L que se inyectaron directamente en el HPLC (sin necesidad de realizar diluciones). Luego, empleando la curva de calibración (se muestra en la **Figura A 1** de los anexos) se calcularon las concentraciones de las muestras aplicando la ecuación 10:

$$mg\ cianidina\ 3 - rutinósido = \frac{(\text{área}-b/cn(\frac{mg}{L})) * fd * v(L)}{masa\ (g)} \quad [10]$$

Donde el fd (factor de dilución) fue 20/5 ya que para la curva de calibración se inyectaban 5 mL y en las muestras 20 mL.

4.6.10 Determinación del índice de solubilidad en agua (WSI)

El índice de solubilidad en agua se determinó utilizando el método descrito por Mishra *et al.* (2014). Se colocaron 2,0 g del extracto seco y 25 mL de agua destilada en una tubo de centrifuga de 100 mL, el cual se agitó vigorosamente utilizando un equipo de agitación Vortex® y posteriormente se incubó en un baño

de agua a 37°C por 30 min, el tubo luego se sometió a centrifugación a 10 000 rpm durante 20 min. El supernatante se colocó en una cápsula prepesada y se secó a 103 ± 2 °C hasta alcanzar masa constante; el cálculo respectivo se muestra a continuación en la ecuación 11:

$$WSI = \frac{\text{Masa supernatante seco (g)}}{\text{Masa del extracto seco (g)}} * 100 \quad [11]$$

V. Resultados y discusión

Evaluación del proceso membranario en la reducción de azúcares de un extracto de broza de café

5.1 *Efecto del proceso membranario en la concentración de antocianinas y la reducción del contenido de azúcares para facilitar el proceso de secado del extracto de broza de café*

5.1.1 Efecto de la microfiltración sobre compuestos del extracto de broza de café

Para el proceso de microfiltración se requería un gran volumen de extracto, 40 L aproximadamente, por lo que se obtuvo un único lote de broza de café, el cual se homogenizó y se dividió posteriormente para realizar los diferentes procesos. Es por esta razón, que el proceso de filtración y microfiltración se llevó a cabo solo una vez y, por lo tanto, no fue posible realizar un análisis estadístico. Sin embargo, en la **Figura 16** se muestran los resultados de las diferentes variables respuesta con el fin de analizar de forma cualitativa el efecto del proceso de microfiltración. Para ello, se mostrará los cambios en cada una de estas variables respuesta en la alimentación (antes de la microfiltración) y en el permeado. En el retenido se midió las antocianinas y el índice de oscurecimiento, ya que, era interesante conocer si los compuestos fenólicos fueron retenidos por la membrana, y esto podría representar una reducción en el oscurecimiento del extracto deshidratado posteriormente.

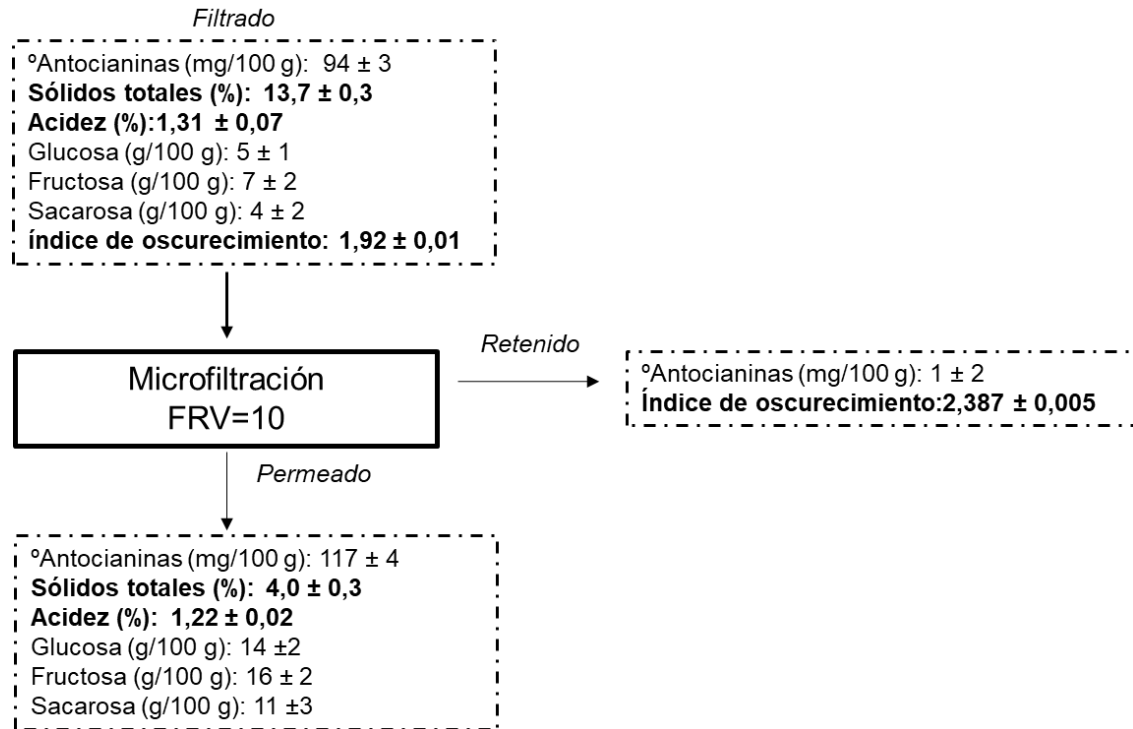


Figura 16. Efecto de la microfiltración sobre el contenido de antocianinas, sólidos totales, azúcares totales, ácido cítrico e índice de oscurecimiento de un extracto de broza de café en la alimentación y en el permeado. *Los resultados de antocianinas están expresados como equivalentes de mg cianidina-3-rutinósido/100 g extracto. Los resultados de azúcares y antocianinas están expresados en base seca. Valores expresados como promedios (de las 3 réplicas de una muestra) ± desviación estándar. Los valores en negrita son los que presentan mayor variación.

En primer lugar se puede observar que el contenido de antocianinas podría presentar un leve aumento en el permeado obtenido de la etapa de microfiltración, mientras que en el retenido se pudo considerar despreciable, dicho resultado no concuerda con los estudios realizados por Couto *et al.* (2011) en açai (*Euterpe oleracea Mart.*) y Soto *et al.* (2016) en mora (*Rubus adenotrichos*) ya que, estos no encontraron diferencias significativas en el contenido de antocianinas entre el fluido alimentado en el microfiltrador y el permeado; lo cual indica que la etapa de clarificación no afectó el contenido de antocianinas de esas dos frutas.

Por otra parte, en el estudio realizado por Cassano *et al.* (2010), en jugo de la fruta del cactus (*Opuntia ficus-indica*), y por Oliveira *et al.* (2016), en sandía, por el contrario, observaron una concentración de betaxantinas y licopeno

(respectivamente) en el retenido; al usar también una membrana de 0,2 μm . Dichas diferencias se pueden deber al peso molecular de las moléculas a separar, al contenido de sólidos que pueden colmatar la membrana, la matriz alimentaria, la interacción de los pigmentos con la membrana (por ejemplo diferentes polaridades) y las condiciones de operación, por ejemplo la presión transmembranaria.

Por otra parte, el contenido de sólidos del permeado microfiltrado fue menor que el contenido de sólidos de extracto filtrado (antes de la MF), lo cual se debió a que, dicho proceso es conocido como una etapa de clarificación, pues, las moléculas de mayor peso molecular, tal como pectinas y otros sólidos, son retenidos. Cuando se realizan procesos membranarios donde se emplean membranas con poder de corte (MWCO) menor a la microfiltración, como por ejemplo ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, se recomienda realizar una etapa de clarificación para reducir el contenido de sólidos y así disminuir la colmatación de la membrana, uno de los principales problemas de los procesos membranarios (Thakur & Kumar, 2006). Se ha observado que la microfiltración es un método eficiente y eficaz en la clarificación de jugos y extractos principalmente en aquellos con compuestos sensibles a las altas temperaturas. De ahí que, en el caso que interesa a este estudio, la clarificación se logró, minimizando las pérdidas de antocianinas.

Similares resultados fueron encontrados en los estudios de Cassano *et al.* (2010) en el jugo de la fruta del cactus (*Opuntia ficus-indica*) y Couto *et al.* (2011) en jugo de açai (*Euterpe oleracea Mart.*), en los cuales observaron una reducción del contenido de sólidos suspendidos luego del proceso de microfiltración.

Con respecto al contenido de acidez expresado como equivalentes de ácido cítrico, según los resultados obtenidos se presentó una pequeña reducción en el permeado con respecto al fluido alimentado. A pesar, de que no fue posible realizar el análisis estadístico las diferencias observadas fueron muy pequeñas, por lo que muy probablemente la diferencia no sería significativa. Lo anterior se puede apoyar en los estudios realizados por Couto *et al.* (2011) y Cassano *et al.*

(2010) quienes no encontraron diferencias significativas en el contenido de acidez en jugos de açai (*Euterpe oleracea Mart.*) y la fruta del cactus (*Opuntia ficus-indica*) antes y después de la microfiltración con una membrana de 0,2 μm ; es decir, no hay retención de los ácidos orgánicos por parte de esta membrana. La permanencia del ácido cítrico en el extracto es de suma importancia ya que permite la estabilidad de las antocianinas (Ariza, 2011) en el resto del proceso al que serían sometidas.

Con respecto al contenido de azúcares se observa en la **Figura 16** un posible aumento en el permeado luego del proceso de microfiltración. Sin embargo, al haber realizado solamente una repetición del proceso, no es posible afirmar dicho comportamiento; además, según la reducción de sólidos totales en el permeado, no era de esperar un aumento de azúcares. En el estudio realizado por Oliveira *et al.* (2016) se obtuvo un aumento de azúcares en el retenido mientras que en el realizado por Chhaya *et al.* (2008) se dio una leve reducción en el permeado, indicando que los azúcares atraviesan en su mayoría la membrana (ambas de 0,2 μm al igual que la empleada en la presente investigación).

Por último, el índice de oscurecimiento presentó un aumento en el retenido del microfiltrado con respecto al filtrado (extracto alimentado al microfiltrador). Este método químico determina la presencia de antocianinas poliméricas (antocianinas que condensaron con otros compuestos fenólicos), ya que, éstas no presentan un pronunciado cambio reversible de color con variaciones del pH, lo cual, es una característica de las antocianinas monoméricas (Wrolstad *et al.*, 2005). También este análisis determina la presencia de compuestos oscuros, producto de reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático, así como otros compuestos polifenólicos y, además, la presencia de enzimas endógenas como peroxidasa y polifenoloxidasas que ocasionan la degradación de antocianinas (Wrolstad *et al.*, 2005; Ariza, 2011). En el presente caso la eliminación de compuestos oscuros resulta de suma importancia, ya que, implica la separación de enzimas endógenas que no fueron eliminadas durante el

proceso de escaldado previo y que, por lo tanto, al ser retirados en el retenido aumentaría la estabilidad del extracto durante el almacenamiento.

En una investigación realizada por Jampani *et al.* (2014) se estudió la purificación de antocianinas presentes en jambul o jambolán (*Syzygium cumini* L.) mediante métodos adsorbentes y encontraron una reducción significativa en el índice de oscurecimiento en el extracto purificado, similares resultados a lo encontrado en el presente estudio, ya que al aumentar el índice de oscurecimiento en el retenido se espera una reducción del mismo en el permeado microfiltrado (a pesar de no haber sido cuantificado).

Con respecto al FRV (fracción de reducción volumétrica) se alcanzó un valor de 10, en el estudio realizado por Oliveira *et al.* (2016) se obtuvo 5,7; por lo tanto, en el presente estudio se logró una mayor retención en esta etapa, lo cual es importante ya que, permite que el permeado obtenido posea un bajo contenido de sólidos evitando la colmatación de la membrana en procesos posteriores. Los flujos de permeado durante el proceso de microfiltración no se midieron, sin embargo, el monitoreo de los flujos permite observar la colmatación de la membrana con el avance del proceso de filtrado.

5.1.2 Efecto de la ultrafiltración sobre el extracto de broza de café

Después de la microfiltración se procedió a realizar la ultrafiltración del permeado microfiltrado. Se hicieron 3 corridas diferentes de ultrafiltración, de las cuales se promediaron los resultados de las variables respuestas ya que, como ya se mencionó, en el proceso de microfiltración se empleó un único lote, para poder compararlos. A continuación en la **Figura 17** se muestran los resultados del retenido y el permeado del proceso de ultrafiltración. Debido a que para la microfiltración se contaba con una única repetición y para la ultrafiltración se realizaron tres repeticiones, no fue posible realizar análisis estadístico.

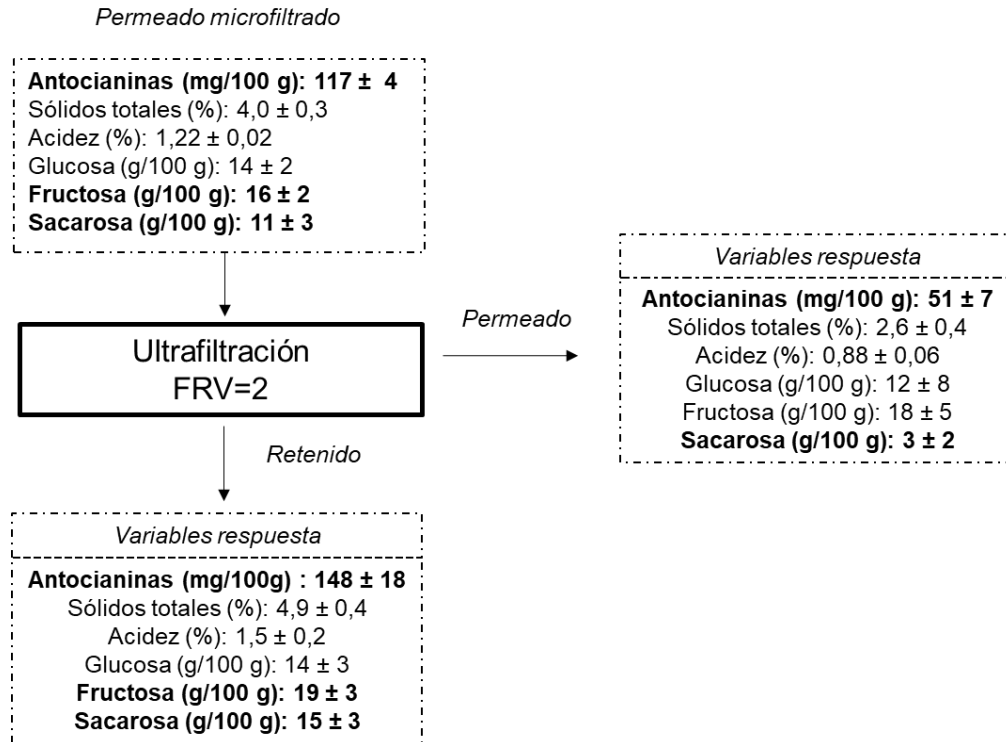


Figura 17. Efecto de la ultrafiltración sobre el contenido de antocianinas, sólidos totales, azúcares totales y ácido cítrico de un extracto de broza de café medidos en el retenido y el permeado. *Los resultados de antocianinas están expresados como equivalentes de mg cianidina 3-rutinósido/100 g extracto. Los resultados de azúcares y antocianinas están expresados en base seca. Valores de UF expresados como promedios ± intervalos de confianza, con n=3 y nivel de confianza del 5%. Los valores en negrita son los que presentaron mayor variación.

Con respecto al contenido de antocianinas, se puede observar que se da un aumento de las mismas; es decir, el retenido ultrafiltrado experimentó un proceso de concentración de antocianinas, debido a que el peso molecular de la cianidina 3-rutinósido es mayor al poder de corte (MWCO) de la membrana, de acá radica la importancia de la elección de la misma. Sin embargo, existen otros factores como consideraciones estéricas, interacciones entre solutos y solutos con la membrana, así como condiciones de operación (principalmente la presión transmembranaria) que también pueden interferir en los procesos de membranas (Conidi *et al.*, 2017).

Similares resultados fueron encontrados por Cissé *et al.* (2011) en un extracto de rosa de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) donde se probaron varias membranas y se encontró una alta retención de antocianinas (delpinin-3-

xilosilglucósido). Además, Conidi y otros (2017), en un estudio realizado en granada real, encontraron retenciones mayores al 80% de antocianinas en todas las membranas de ultrafiltración evaluadas. Más adelante se mostrarán los porcentajes de retención de las diferentes etapas del proceso membranario.

Se debe de tomar en consideración que el proceso membranario se llevó a cabo de forma discontinua y, además, entre el proceso de microfiltración y ultrafiltración la muestra fue congelada y descongelada, lo cual podría ocasionar degradación de las antocianinas, al igual que pudo reducir la capacidad antioxidante debido a reacciones de oxidación (Oliveira *et al.*, 2016). El proceso no fue realizado de forma continua debido a limitaciones de tiempo, esto podría evitarse al usar equipos de tipo industrial, con un área de filtración más amplia, que permita mayores flujos. Sin embargo, a pesar de esto, se observaría un aumento de la concentración de antocianinas en el retenido.

Por otra parte, el contenido de sólidos totales presentó un ligero aumento entre el extracto alimentado y el retenido ultrafiltrado, lo cual se puede deber al efecto de concentración de antocianinas y azúcares como se verá más adelante. En los estudios realizados, por Vergara *et al.* (2014) en la fruta del cactus (*Opuntia ficus-indica*) y por Mirsaeedghazi y otros (2010) en jugo de granada real (*Punica granatum L.*), se observó una reducción del contenido de sólidos en el permeado después de la ultrafiltración y fue asociada a una reducción de sólidos solubles.

La acidez de los extractos presentó una leve concentración durante el ultrafiltrado, al igual que los azúcares. Se puede observar que la fructosa y la sacarosa aumentaron con el proceso membranario, sin embargo, se encuentran dentro de los intervalos de confianza, por lo que no se puede asegurar que hayan diferencias entre ambos. Era de esperar que los azúcares y el ácido cítrico, al poseer un peso molecular menor a las antocianinas, atravesaran la membrana; sin embargo, este comportamiento se puede deber a una adsorción de solutos en la membrana, que ocasiona una reducción de los

poros efectivos, favoreciendo la concentración de las antocianinas pero también de las moléculas de menor tamaño (Couto *et al.*, 2011).

5.1.3 Efecto de diafiltración sobre el contenido de azúcares, ácidos y antocianinas del extracto de broza de café

Se realizaron tres repeticiones de las etapas de UF y DF, por lo que sí fue posible realizar el análisis estadístico. A continuación en el **Cuadro III**, se muestra el efecto del proceso de diafiltración sobre el contenido de antocianinas, sólidos totales, acidez y contenido de azúcares en el retenido de la ultrafiltración de un extracto de broza de café clarificado. Cabe resaltar que durante la etapa de diafiltración se empleó solamente un diavolumen, al utilizar mayores diavolumenes se puede alcanzar mayor purificación del extracto con respecto a las antocianinas.

Cuadro III. Comparación de azúcares, antocianinas, humedad y acidez promedio de las muestras del retenido de los extractos de broza UF y UF-DF por medio de una t-Student.

Proceso	Fructosa (g/100 g materia seca)	Glucosa (g/100 g materia seca)	Sacarosa (g/100 g materia seca)	Antocianinas	Humedad (%)	Acidez (%)
UF	19 ± 3 a	14 ± 3 a	15 ± 3 a	148 ± 19 a	95,0 ± 0,3 a	1,5 ± 0,2 a
UF-DF	16 ± 3 b	12 ± 9 a	14 ± 3 a	186 ± 5 b	96,6 ± 0,8 b	1,1 ± 0,2 b

Las letras diferentes, en la misma columna, implican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Los resultados de antocianinas están expresados como mg de cianidina 3- rutinósido en 100 g de muestra en base seca. Los resultados son los promedios de las repeticiones \pm intervalo de confianza, con $n=3$ y un nivel de confianza de 5%.

Se puede observar en el **Cuadro III**, que se encontraron diferencias significativas en el contenido de cianidina 3-rutinósido ($p=0,001$) (ver **Cuadro A2**) siendo mayor el contenido en el retenido diafiltrado. Dicho comportamiento se debe a la purificación que permite la diafiltración, al separar moléculas de menor peso molecular de las macromoléculas, lo que aumentó los rendimientos (Yasdanshenas *et al.*, 2005). Similares resultados fueron encontrados por Oliveira *et al.* (2016) y Chaparro *et al.* (2016) ambos en la purificación de carotenoides, donde encontraron que la diafiltración permite obtener extractos más concentrados, pero además, más puros.

Cabe resaltar que en la presente investigación se empleó solamente un diavolumen en la etapa de diafiltración por limitaciones del equipo, pero, al emplear mayores diavolumenes es posible alcanzar una mayor purificación del extracto y, por lo tanto, un mayor contenido de antocianinas, que podrían mejorar, además, la coloración del producto en polvo.

Además, (ver **Cuadro III**) los contenidos de fructosa, glucosa y sacarosa presentaron reducciones durante el proceso de diafiltración, tal y como se deseaba. Sin embargo, solamente la fructosa presentó diferencias significativas ($p=0,018$). Este resultado se puede deber al mayor peso molecular de la sacarosa con respecto a la glucosa y fructosa y que, por lo tanto, por consideraciones estéricas impiden el paso de la molécula (sacarosa) a través de la membrana.

La reducción de acidez, estadísticamente significativa ($p=0,003$), se relacionó con lo previamente discutido acerca de la reducción de compuestos de menor peso molecular, que permite la purificación durante la etapa de diafiltración. Esta reducción de la acidez puede significar un aspecto positivo en la calidad del producto deshidratado, ya que, puede resultar en un polvo menos ácido y, por lo tanto, causar menor impacto en el sabor del alimento en el cual se adicione. Debido a la reducción de acidez y de azúcares por la purificación, al adicionar un volumen de agua, que además, redujo la viscosidad mejorando la eficiencia del proceso (Oliveira *et al.*, 2016), se dio un aumento de la humedad ($p<0,001$) y, por lo tanto, reducción de sólidos.

Con respecto al FRV (fracción de reducción volumétrica) se alcanzó un valor de 2; en otras investigaciones, por ejemplo, Conidi *et al.* (2017) en granada real logró un valor de 4,8, es decir, que alcanzó una mayor concentración que en el presente estudio. Por limitaciones del equipo, no se obtuvo una mayor concentración, sin embargo, al ampliar el FRV y por lo tanto concentrar más el extracto y aumentar el contenido de antocianinas; se puede obtener un producto en polvo con una coloración más intensa.

5.1.4 Efecto del secado por atomización sobre el rendimiento, la densidad “bulk”, el color y las antocianinas de un extracto de broza de café sometido a procesos de membrana

En el **Cuadro IV** se muestran los resultados de las diferentes variables respuesta evaluadas en polvos obtenidos de los extractos previamente ultrafiltrados y ultrafiltrados -diafiltrados con su respectivo análisis estadístico.

Cuadro IV. Rendimiento, densidad “bulk”, cianidina 3-rutinósido (en base seca), humedad, h° y C promedio de las muestras UF o UF-DF y secadas por atomización (SA).

Proceso	Rendimiento másico (%)	Densidad “bulk” (g/mL)	Antocianinas	Humedad (%)	h (°)	C*
UF	8,43 a	0,41 ± 0,01 a	143 ± 10 a	2,1 ± 0,4 a	13 ± 3 a	22 ± 1 a
UF-DF-SA	9,67 b	0,38 ± 0,08 a	184 ± 24 b	1,6 ± 0,6 b	11 ± 3 a	19,3 ± 0,9 b







Las letras diferentes, en la misma columna, implican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Los resultados de antocianinas están expresados como mg de cianidina 3- rutinósido en 100 g de muestra en base seca Los resultados son los promedios de las repeticiones \pm intervalo de confianza, con $n=3$ y un nivel de confianza de 5%.

Se puede observar en el **Cuadro IV** que el proceso de diafiltración tuvo un efecto en el aumento del rendimiento en la etapa de secado y estas diferencias, fueron significativas estadísticamente ($p=0,029$) (Ver el ANDEVA en **Cuadro A3** en anexos). El aumento en el rendimiento se debió, a que, al disminuir el contenido de azúcares en el extracto (principalmente fructosa como se discutió previamente), se redujeron los problemas de pegajosidad, que ocasionaron que gran parte de la muestra se quedara depositada en la cámara de secado producto de la baja temperatura de transición vítrea de los azúcares y ácidos (Keshani *et al.*, 2015). En otras investigaciones obtuvieron rendimientos entre un rango de 45 a 82%, sin embargo, emplearon concentraciones de 8 a 16% de maltodextrina, con diferentes DE (Fazaeli *et al.*, 2012).

Por otra parte, la adición de maltodextrina se ha visto que puede alterar la superficie pegajosa de las moléculas de bajo peso molecular y facilitar el proceso de secado (Young *et al.*, 2007). Es por esto, que la combinación del proceso de membranas y la adición de maltodextrina permitieron mejores resultados en la

calidad del polvo final, así como, un mayor rendimiento por menores pérdidas en el secador. Las fotografías de la cámara de secado presentes en el **Cuadro V** permiten observar, cómo al aplicar el proceso de secado del extracto ultrafiltrado y del extracto diafiltrado, las pérdidas de polvo en el secador fueron mayores en el extracto ultrafiltrado, resultando en menores rendimientos de la etapa de secado.

Cuadro V. Evaluación cualitativa del efecto del diafiltrado sobre el secado de un extracto de broza de café con tres repeticiones.

Repeticición	Ultrafiltrado	Diafiltrado
1	 A glass ultrafiltration chamber containing a thick, brown, turbid coffee extract. The chamber is mounted on a base with a yellow cable connected to the bottom.	 A glass diafiltration chamber containing a clear, colorless liquid. A white filter is visible inside the chamber. The chamber is mounted on a base with a yellow cable connected to the bottom.
2	 A glass ultrafiltration chamber containing a thick, brown, turbid coffee extract. The chamber is mounted on a base with a yellow cable connected to the bottom.	 A glass diafiltration chamber containing a clear, colorless liquid. A white filter is visible inside the chamber. The chamber is mounted on a base with a yellow cable connected to the bottom.
3	 A glass ultrafiltration chamber containing a thick, brown, turbid coffee extract. The chamber is mounted on a base with a yellow cable connected to the bottom.	 A glass diafiltration chamber containing a clear, colorless liquid. A white filter is visible inside the chamber. The chamber is mounted on a base with a yellow cable connected to the bottom.

Con respecto al contenido de antocianinas, se encontraron diferencias significativas ($p=0,002$) entre el polvo del extracto ultrafiltrado y el polvo del extracto diafiltrado, siendo mayor el contenido de antocianinas en el polvo previamente diafiltrado; lo cual era de esperar pues el extracto diafiltrado tenía un mayor contenido de antocianinas. Sin embargo, tal y como se muestra en la **Figura 18**, la retención de antocianinas fue mayor en el extracto previamente ultrafiltrado y diafiltrado; lo cual quiere decir que la reducción del contenido de azúcares favoreció la retención de antocianinas durante el secado. Esto se debe a que la presencia de azúcares o productos de la degradación de azúcares pudo acelerar la degradación de antocianinas. El furfural, derivado de las aldopentosas, así como el hidroximetilfurfural, derivado de las cetohexosas, son productos de la reacción de Maillard que condensan junto con las antocianinas dejando como resultado la formación de compuestos con coloración café, pero además la reducción de dichos pigmentos. Esta reacción es altamente dependiente de la temperatura, pero además es acelerada por la presencia de oxígeno (Tonon *et al.*, 2008).

Por otra parte, los porcentajes de retención de cianidina 3-rutinósido mayores al 90% se pueden deber a la adición de maltodextrina, ya que, se ha observado que dicho polímero tiene la capacidad de proteger compuestos sensibles a la temperatura, debido a que forma una fina capa protectora (Aguar *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Lao & Giusti (2017) se observó que el contenido de maltodextrina presentó un efecto significativo en la retención, llamado rendimiento por los autores, de cianidina 3- glucósido independientemente de la matriz, confirmando la tendencia observada en el presente estudio. En el estudio de Lao & Giusti (2017) se encontraron porcentajes de retención cerca del 90% al usar un 5% de maltodextrina, al emplear concentraciones mayores (8%) en el presente estudio se pudo alcanzar mayor preservación de antocianinas.

El contenido de humedad también presentó diferencias significativas ($p=0,030$) en el producto en polvo según el proceso de membranas aplicado previamente, siendo mayor en el producto no diafiltrado. Es decir, que el mayor contenido de moléculas de bajo peso molecular, como azúcares y ácidos, ocasiona polvos más húmedos, lo cual se puede deber a problemas del secado de las gotitas en vista de que estos compuestos de bajo peso molecular, al tener una baja temperatura de transición vítrea tienden a generar polvos con alta pegajosidad, así como, que pueden formar la corteza más lentamente y, por lo tanto, formar aglomeraciones al colisionar entre sí dificultando el secado. Además, una mayor concentración de sólidos favorece la formación de gotitas más grandes que, al tener una menor área superficial en contacto con el medio de calentamiento, ocasionan partículas más húmedas (Goula, 2015).

Con respecto a los parámetros de color se puede observar, en el **Cuadro IV**, que se encontraron diferencias para la cromaticidad o pureza (C) ($p=0,003$) siendo menor el valor C^* en el producto deshidratado previamente diafiltrado. Esto a pesar, de que se esperaba que este parámetro, que indica la pureza o saturación del color, fuera mayor en el polvo del extracto diafiltrado, pues presentó un menor contenido de sólidos de bajo peso molecular, y por lo tanto, era más puro.

Este comportamiento se puede deber a que la eliminación de compuestos de bajo peso molecular, ocasionó una variación en la composición de la matriz de forma tal, que la estabilidad de las antocianinas se ve afectada. Principalmente, por la reducción de ácido, que se dio con la etapa de diafiltración, y que como es bien sabido, influye directamente en la estabilidad y coloración de las antocianinas (Ariza, 2011; Quirós, 2014).

Además, con respecto al ángulo de tono (h^0) no se encontraron diferencias entre los extractos ultrafiltrados o diafiltrados secos, pero ambos valores se encuentran por debajo de 15, lo cual indica que eran polvos rojizos, debido a la alta concentración de antocianinas. En el estudio realizado por Pessanha *et al.* (2016), en un polvo de granada, se observaron mejores características de color

en aquellas muestras con mayor contenido de antocianinas. Además, encontraron valores de h^0 cercanos a 12, dichos autores consideran que el polvo contiene una coloración atractiva a pesar de no poseer un color rojizo profundo, y que puede ser empleado como sustituto de colorantes.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la densidad “bulk” producto del proceso membranario. Una mayor concentración de sólidos en el fluido alimentado en el secador ocasiona un incremento en el tamaño de partícula del producto en polvo (Goula, 2015), lo cual a su vez se espera que ocasione una reducción en la densidad “bulk”, de manera que se obtendría una menor densidad “bulk” en el extracto no diafiltrado. Sin embargo, los resultados obtenidos no siguieron dicha tendencia, lo cual se pudo deber a problemas de la medición, ya que, por el método empleado el producto tendía a pegarse en las paredes del recipiente dificultando la medición.

En la **Figura 18** se muestra un resumen de los diferentes procesos tanto de membranas como de secado por atomización con el fin de conocer los porcentajes de retención de antocianinas, fructosa, glucosa y sacarosa en la etapa de membranas y de antocianinas en el secado por atomización y, así ver el efecto global del proceso aplicado al extracto de broza de café.

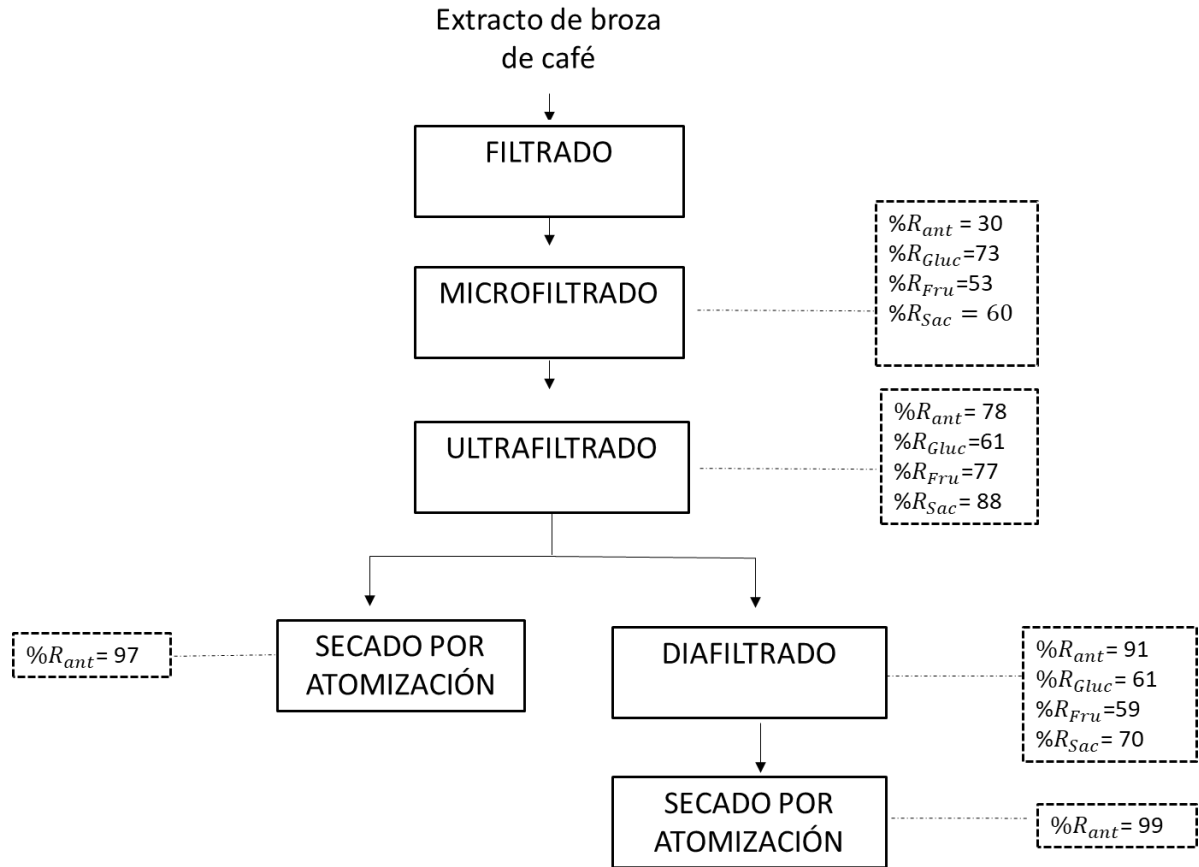


Figura 18. Porcentajes de retención de cianidina 3-rutinósido y azúcares de las diferentes etapas del proceso membranario y de secado por atomización en el retenido a través de las membranas y el producto seco.

En la **Figura 18** se puede observar que con respecto a los azúcares la sacarosa presentó la mayor retención tanto en la etapa de ultrafiltración como de diafiltración. Este comportamiento se puede deber a las diferencias en el peso molecular, así como, consideraciones estéricas. Por su parte, la retención de fructosa fue la menor en todas las etapas membranarias. Cabe rescatar, que la retención de azúcares en la etapa de diafiltración es menor que en la etapa de ultrafiltración, de manera que el uso de dicho proceso permite reducir el contenido de azúcares, tal como se deseaba.

Con respecto a la retención de antocianinas, se presentó el menor valor durante la microfiltración pues esta es una etapa de clarificación, donde se esperaba una baja retención. Durante la ultrafiltración y la diafiltración se da una alta retención de las mismas, siendo mayor en la etapa de diafiltración. Este

comportamiento se puede deber a un proceso de concentración que se pudo ver favorecido por una colmatación de la membrana, esto, porque las etapas de ultrafiltración y diafiltración se realizaron con la misma membrana, por lo que, los poros efectivos se pueden ver reducidos como parte del proceso, interacciones entre solutos, así como de los solutos con la membrana; de manera que se favorece la retención de antocianinas.

Durante el secado por atomización, la mayor retención se presentó en el polvo ultrafiltrado y diafiltrado, es decir, que la reducción de azúcares y otras moléculas de bajo peso molecular evitan la degradación de las antocianinas durante el secado tal y como se discutió previamente.

Por otra parte, algunas variables respuesta no presentaron diferencias significativas en los procesos de UF/DF y secado por atomización, por lo que, se calculó la potencia del análisis realizado, las probabilidades y el número de muestras necesarias para encontrar diferencias, como se muestra en el **Cuadro A 4** (ver anexos).

Se puede observar en el **Cuadro A 4** (en anexos) que todas las variables respuestas que no presentaron diferencias significativas, tenían un número de potencia bajo. El número de potencia está asociado al error tipo II, el cual es la probabilidad de aceptar la hipótesis nula cuando es falsa, es decir, aceptar que no hay diferencias cuando realmente sí las hay (Montgomery, 2004). Lo ideal es contar con números de potencia altos, ya que, indican que la probabilidad de cometer dicho error es baja. Sin embargo, en el presente estudio los valores fueron bajos y fue por ello que se determinó el número de muestra necesario para encontrar diferencias, fijando un número de potencia de 0,8. En los anexos (**Cuadro A 4**) se observa que los números de muestra necesarios para encontrar diferencias significativas eran muy altos, especialmente para la cianidina 3-rutinósido, en el extracto diafiltrado que fue sometido al secado por atomización. Por lo tanto, los procesos necesarios para tratar de determinar diferencias hacen que sea insustentable. Es probable que los resultados se deban a problemas en la cuantificación y a las diferencias en las desviaciones estándar (Ver anexos

Cuadro A3 y Cuadro A5) entre los tratamientos. Por ejemplo en el caso de la densidad “bulk” la medición es muy empírica por lo que alguna diferencia en la medición puede ocasionar grandes diferencias en el resultado.

En la **Figura 19** se muestra una fotografía del extracto seco de broza de café diafiltrado reconstituido en agua (2 g en 25 mL de agua destilada), en la que se puede observar un color intenso, así como una completa solubilidad en agua. Lao & Giusti (2017) evaluaron el color de los productos ricos en antocianinas al diluirlos en agua, ya que, mencionan que un buen color del polvo no garantiza un color satisfactorio al disolver en agua, siendo muy importante la solubilidad del mismo. A pesar, de que en el presente estudio no se evaluó el color en las muestras rehidratadas, la **Figura 19** muestra el color rojo intenso indicando la capacidad de coloración del polvo obtenido.



Figura 19. Fotografía del polvo de extracto de broza de café, diafiltrado y secado por atomización, reconstituido en agua.

El WSI o índice de solubilidad en agua es un parámetro importante, ya que, describe el comportamiento de un producto en polvo en agua, y se relaciona con el hecho de que para los consumidores una rápida y completa reconstitución del producto es una de las principales características de calidad (Jafari *et al.*, 2017). Es por esta razón que fue un parámetro a determinar; sin embargo, al realizar la medición, los polvos se reconstituyeron completamente y no fue posible obtener un supernatante que se pudiera separar y secar. Por lo tanto, se

puede decir que el polvo obtenido tiene una solubilidad del 100% (ver **Figura 19**). En el estudio realizado por Jafari *et al.* (2017) se encontró que ni la temperatura ni los niveles de maltodextrina influyeron significativamente en la solubilidad de un polvo de granada real, y fue asociado a la alta solubilidad de la maltodextrina. Otros autores han asociados la solubilidad de los polvos con el tamaño de las partículas; el uso de altas temperaturas ocasiona partículas más grandes, ya que, la evaporación es más rápida. Las partículas grandes presentan más tendencia a hundirse mientras que si las partículas son pequeñas tienden más a flotar y, por lo tanto, no se hidratan (Fazaeli *et al.*, 2012).

En la **Figura 20** se muestra una fotografía del extracto seco reconstituido en agua que se intentó secar para determinar el índice de solubilidad en agua; es decir, el polvo se disolvió en agua y posteriormente dicha agua se evaporó para determinar cuánto sólido permanecía. Sin embargo, se puede observar, por el contenido de azúcares de la muestra, que ésta tendió a caramelizarse y no alcanzó masa constante en la estufa.



Figura 20. Polvo de extracto de broza de café luego del procedimiento para determinar WSI.

A pesar de que en la presente investigación no se evaluó la estabilidad del polvo a lo largo del tiempo, en el estudio realizado por Vergara *et al.* (2014) se

observó que el polvo del extracto de la fruta del cactus (*Opuntia ficus-indica*) que fue previamente ultrafiltrado, tuvo una mayor estabilidad a lo largo del tiempo. Esto fue asociado a que el mayor contenido de azúcares en la pulpa (sin ultrafiltrar) aumenta la higroscopicidad del polvo y, por lo tanto, puede aumentar durante el almacenamiento el agua disponible para reacciones. Por lo tanto, es de esperar que el polvo previamente ultrafiltrado y diafiltrado tenga una mayor estabilidad durante el almacenamiento. El A_w y otros parámetros relacionados con la estabilidad del producto en polvo obtenido no se cuantificaron, ya que, no formaban parte de los objetivos del proyecto.

Por otra parte, en el estudio realizado por Villalta (2016) sobre la estabilidad del extracto de broza de café deshidratado, se encontró que se formaban mohos y levaduras en el alimento al cual se agregaba el colorante, por lo que, se considera que en el presente estudio la estabilidad microbiológica pudo haber aumentado, ya que, los procesos de membranas, han sido asociados a la reducción microbiológica, ya que, los microorganismos pueden ser retenidos por la membrana. Sin embargo, el proceso no fue realizado asépticamente; por lo que pudo presentarse recontaminación, principalmente de mohos del ambiente, que pueden sobrevivir a bajas actividades de agua.

5.2 *Optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café sometidos a procesos membranarios*

5.2.1 *Resultados de la Superficie de Respuesta*

A continuación en el **Cuadro VI** se muestran los resultados de las variables respuesta medidas en polvos secados por atomización bajo diferentes condiciones, para estudiar el efecto de la temperatura de entrada al secador, la concentración de maltodextrina y el flujo de alimentación sobre la calidad del producto final.

Cuadro VI. Promedios de las variables respuesta, que definen la calidad del producto final, para la optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café

Variables Independientes				Variables respuesta				
Número de corrida	Temperatura (°C)	Conc maltodex-trina (%)	Flujo (mL/min)	Rendimiento (%)	Densidad "Bulk" (g/mL)	h ^o	Humedad (%)	Antocianinas*
1	(-1)	(-1)	(0)	8,75	0,28	10,16	2,5	164,4
2	(+1)	(-1)	(0)	0,70	0,30	49,86	2,0	32,4
3	(-1)	(+1)	(0)	10,17	0,45	13,06	2,6	176,5
4	(+1)	(+1)	(0)	9,89	0,39	14,23	1,2	168,5
5	(-1)	(0)	(-1)	7,67	0,43	12,26	1,0	166,3
6	(+1)	(0)	(-1)	5,27	0,32	25,19	0,9	144,6
7	(-1)	(0)	(+1)	7,78	0,37	10,51	1,2	168,6
8	(+1)	(0)	(+1)	6,36	0,31	12,52	0,9	161,3
9	(0)	(-1)	(-1)	2,16	0,27	48,49	1,8	29,1
10	(0)	(+1)	(-1)	7,02	0,42	16,15	0,6	161,7
11	(0)	(-1)	(+1)	3,22	0,30	12,41	2,6	155,4
12	(0)	(+1)	(+1)	8,14	0,40	10,87	1,5	169,9
13	(0)	(0)	(0)	7,92	0,34	11,53	2,3	162,9
14	(0)	(0)	(0)	7,52	0,34	11,56	2,3	157,8
15	(0)	(0)	(0)	7,39	0,39	11,66	1,8	160,6

*Los resultados de antocianinas están expresados como equivalentes de cianidina 3- rutinósido/ 100 g extracto en bs.

Se puede observar que algunas condiciones disminuyeron apreciablemente el rendimiento y el contenido de antocianinas, además de aumentar el ángulo de tono. La densidad "bulk" y la humedad no cambiaron apreciablemente.

5.2.2 Aplicación del modelo de superficie de respuesta

Para la optimización del proceso de secado de un extracto de broza de café se empleó la metodología de superficie de respuesta aplicando el diseño de Box- Behnken (DBB). Los parámetros de ajuste de los modelos generados para las variables respuesta fueron el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado ($R^2 - adj$), probabilidad del modelo, probabilidad del modelo cuadrático y probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y se muestran a continuación en el **Cuadro VII** .

Cuadro VII. Parámetros de ajuste (utilizando mínimos cuadrados) de los modelos generados mediante la superficie de respuesta asociada a la optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café.

Variable respuesta	R^2	$R^2 - adj$	p del modelo	p del modelo cuadrático	p falta de ajuste
Rendimiento	0,9725	0,9505	0,0022	0,0215	0,0787
Densidad "Bulk"	0,8998	0,8196	0,0458	0,9577	0,4883
h ^o	0,9268	0,8682	0,0224	0,1643	<0,001 ^o
L*	0,9290	0,8722	0,0209	0,1272	0,0565
C*	0,9272	0,8689	0,0221	0,3673	0,6045
Humedad	0,8399	0,7118	0,1257	0,0696	0,2269
Cianidina 3-rutinósido	0,8950	0,8110	0,0508	0,2538	0,0058 ^o

^o Variables que presentaron falta de ajuste ($p \leq 0,05$).

Un modelo es considerado satisfactorio cuando es significativo ($p \leq 0,05$) y la falta de ajuste es no significativa ($p > 0,05$); sin embargo, obtener un modelo significativo no necesariamente explica correctamente la variación en los datos. Por lo tanto, también es necesario evaluar los gráficos de residuos, el coeficiente de determinación y el coeficiente de determinación ajustado que representan la varianza explicada por el modelo (Vera *et al.*, 2014).

Algunas de las variables de mayor importancia, como el contenido de cianidina 3-rutinósido, presentaron falta de ajuste, la cual es una prueba importante ya que indica si las respuestas observadas y las predichas por el modelo se desvían mucho entre sí (Montgomery, 2004). La falta de ajuste, además, mide la dispersión de los datos del modelo ajustado; cuando un modelo no está ajustado el análisis mostrará una falta de ajuste significativo y eso indica que el modelo no es adecuado para tomar decisiones, es decir, para realizar predicciones (Chidiebere & Okon, 2016).

Se ha observado que la adición de términos no significativos en el modelo reduce la potencia del diseño; por lo tanto, la reducción del mismo ayuda a mejorar el modelo estimado y el ajuste (Chidiebere & Okon, 2016). De manera

que los valores de R^2 , $R^2 - adj$ y la probabilidad de falta de ajuste no se ven influenciados por aquellos parámetros no significativos en la ecuación. Lo anterior se debe a que el R^2 es una medida de la cantidad de reducción en la variabilidad y que se obtiene al utilizar las variables de regresión $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$ en el modelo; sin embargo, cada vez que se agrega una variable al modelo, el R^2 aumenta independientemente si es significativo o no. Por el contrario, el $R^2 - adj$ no se ve afectado si se agregan más variables al modelo, es más si se agregan términos innecesarios el valor disminuirá. Además, al agregar una variable no importante al modelo, se puede incrementar el cuadrado medio del error, reduciéndose así la utilidad del modelo (Montgomery, 2004).

En el **Cuadro VIII** se muestran los resultados de los parámetros estadísticos de las diferentes variables para el modelo reducido, utilizando una regresión por mínimos cuadrados.

Cuadro VIII. Parámetros de ajuste de los modelos generados mediante la superficie de respuesta asociada a la optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café, para el modelo reducido.

Variable respuesta	R^2	$R^2 - adj$	p del modelo	p falta de ajuste	Coficiente de variación (%)	Aleatoriedad (residuos)
Rendimiento	0,9702	0,9405	<0,0001	0,1185	9,99	Aleatorio
Densidad "Bulk"	0,8723	0,7767	0,0032	0,6314	7,66	Aleatorio
h ^o	0,8175	0,6351	0,0330	<0,0001 ^o	44,09	Aleatorio
L*+	0,8703	0,7730	0,0034	0,0612	4,50	Aleatorio
C* +	0,9017	0,8281	0,0012	0,7149	3,28	Aleatorio
Humedad+	0,8377	0,6754	0,0229	0,3446	23,29	Aleatorio
Cianidina 3-rutinósido	0,6839	0,5574	0,0140	0,8673	21,01	Aleatorio

+Variables que no se consideraron para la optimización. ° Variables que presentaron falta de ajuste ($p < 0,05$).

Se puede observar que al eliminar términos del modelo la falta de ajuste se vio mejorada ($p > 0,05$) a excepción de la variable h^o, la cual siguió presentando falta de ajuste. Por otra parte, los valores de R^2 y $R^2 - adj$ se encuentran muy

cercanos entre sí, y según lo mencionado previamente, es lo deseado ya que indica que no se incluyeron valores no significativos. Sin embargo, algunas variables presentan valores bajos (menores a 0,8), principalmente cianidina-3-rutinósido. Bas y Boyaci (2007) mencionan que el coeficiente de determinación (R^2) por sí solo, no es una medida de la exactitud del modelo, y un valor de R^2 elevado no necesariamente implica que el modelo de regresión es bueno. Por lo tanto, un modelo puede permitir buenas predicciones a pesar de no poseer un R^2 muy elevado, de ahí la importancia de realizar una evaluación o validación del modelo.

Otro aspecto importante que debe considerarse, en un modelo de superficie de respuesta, es la distribución residual donde se espera que presenten tanto aleatoriedad (no presentar patrones), así como una distribución normal, lo cual es una condición básica para la validez de un análisis de varianza (Vera *et al.*, 2014), ya que si un modelo está bien ajustado el gráfico de residuos presentará una distribución tipo normal (Almeida *et al.*, 2008). Como se puede observar en el **Cuadro VIII** todas las variables presentaron aleatoriedad en los residuos; en los anexos (**Cuadro A6**) se muestran los gráficos de residuos para las diferentes variables respuesta usadas para la optimización.

A continuación en la **Figura 21** se muestra un análisis de componentes principales el cual se realizó, para observar si era posible que la falta de ajuste y los bajos coeficientes de determinación se debieran a pocas diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos.

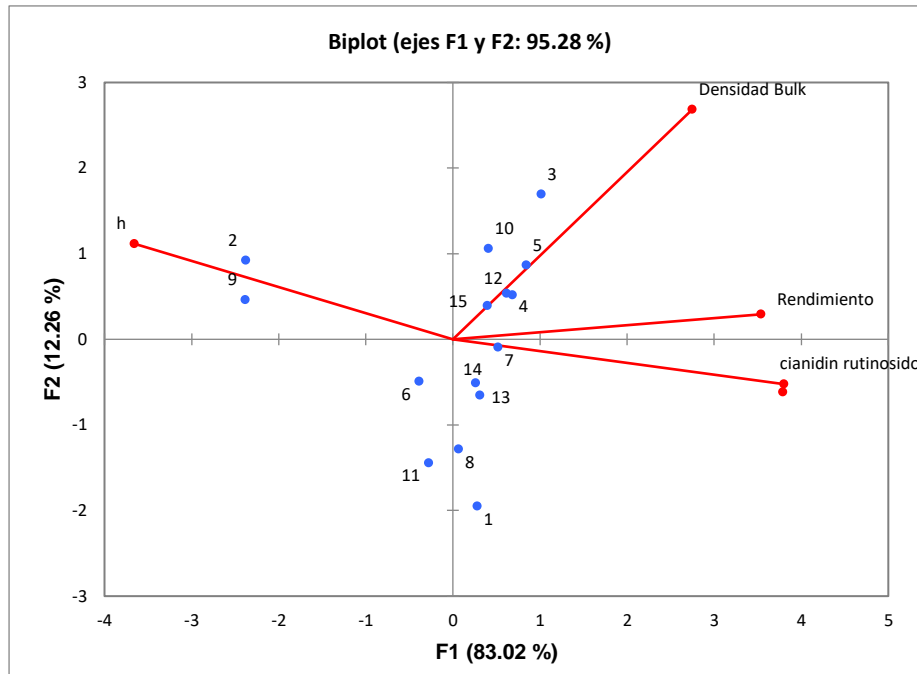


Figura 21. Análisis de componentes principales para evaluar la variabilidad (la discriminación) entre tratamientos con base en las variables respuesta en la superficie de respuesta. Las muestras 1 a 4 y de 13 a 15 usaron un flujo de 3,6 mL/min, de 5, 6, 9 y 10 un flujo de 1,5 mL/min las muestras 7, 8, 11 y 12 un flujo de 5,7 mL/min. Las muestras 1, 2, 9 y 11 se realizaron con un 3% de maltodextrina, las muestras 5 a 8 y 13 a 15 un 5,5% y las muestras 3, 4, 10 y 12 un 8% de maltodextrina. Las muestras 1, 3, 5 y 7 se secaron a 125 °C; las 2, 4, 6 y 8 a 160 °C y las 9 a 15 a 142 °C.

En la **Figura 21** se puede observar que los diferentes puntos (que representan los tratamientos de la superficie de respuesta) se encuentran poco distribuidos a lo largo del eje x, el cual es el componente principal que explica la mayor variabilidad. Dicha distribución indicó que existía poca variabilidad entre los resultados de las variables respuesta producto de los diferentes tratamientos. Los tratamientos 2 y 9 fueron los únicos que no se distribuyeron de igual manera que el resto de las muestras, pues en estos puntos se usó la menor concentración de maltodextrina (3%) y altas temperaturas (160 y 142 °C respectivamente), así como bajos flujos de alimentación (3,6 y 1,5 mL/min respectivamente), lo cual ocasionó que la muestra se pegara al secador generando rendimientos bajos, al igual que un menor contenido de antocianinas y mayor h^0 . Estos resultados se pueden observar en la **Figura 21** donde los vectores de h^0 y contenido de

cianidina 3-rutinósido se encuentran en cuadrantes opuestos, es decir, que al disminuir el contenido de antocianinas se dio un aumento del ángulo de tonalidad.

En los diseños de superficie de respuesta es importante la variabilidad y un amplio rango de circunstancias a apreciar, ya que, entre mayores condiciones sean evaluadas mejor es el modelo, es decir, se pueden realizar mejores predicciones, y con más confianza. La variable respuesta “densidad bulk” se encontró alineada al eje *y*, y fue a lo largo de este eje que se distribuyeron mejor las muestras. La variable h° se encontró opuesta al rendimiento y a la cianidina 3-rutinósido a lo largo del eje *x*. Las diferencias en las muestras fueron pequeñas y localizadas en el centro del mapa, a excepción de las muestras 2 y 9 distribuidas en la parte central, lo que indicó que los diferentes tratamientos aplicados permiten la obtención de polvos de color rojo y con mayor cantidad de antocianinas que los tratamientos 2 y 9.

En el presente estudio se empleó un rango de condiciones que permitían el secado del extracto con buenos resultados, principalmente en el caso del flujo y la temperatura. El máximo de temperatura utilizada fue de 160 °C, la cual se había utilizado en investigaciones previas por Quirós (2014) y Ariza (2011) y había sido elegida mediante revisión bibliográfica por presentar buenos resultados. Por ejemplo, en el estudio realizado por Ersus & Yurgadel (2007), se evaluaron tres temperaturas: 160, 180 y 200 °C y se observó que a 160 °C el contenido de antocianinas fue significativamente mayor.

Por lo tanto, las condiciones de temperaturas utilizadas no eran extremas y no representaron mayores diferencias en el contenido de cianidina 3-rutinósido ni otros parámetros de importancia como el color, excepto para la combinación de las temperaturas más altas con bajas concentraciones de maltodextrina, tal y como ya se mencionó. Por consiguiente las condiciones elegidas, en general, generaron productos similares, con excepción de las combinaciones de condiciones en las que el producto se quemó, ocasionando poca variabilidad y problemas en el ajuste del modelo.

A continuación, los modelos generados se presentan mediante las ecuaciones de la 12 a la 15, para las cuatro variables respuesta consideradas en la optimización. Para la elección de los términos de los modelos se mantuvieron los interceptos y se fueron eliminando o agregando términos, por medio de mínimos cuadrados, de manera que se mejorara el ajuste y los valores de R^2 y $R^2 - \text{ajustado}$ fueran lo más cercanos posible, así como que los residuos no presentaran patrones y siguieran una distribución normal. Se intentó aplicar el método de “stepwise” tipo “backward”, es decir, eliminar aquellos términos que no eran significativos; sin embargo, en algunos casos, los términos significativos eran muy pocos y los valores predichos se desviaban o suministraban valores sin sentido (negativos). Se escogieron los modelos que permitieron tener mayor probabilidad del modelo, R^2 y $R^2 - \text{ajustado}$ y que no tuvieran falta de ajuste. En los anexos (**Cuadro A7**) se encuentran los valores de las probabilidades de los diferentes coeficientes para cada variable respuesta.

$$Y_{\text{rendimiento}}: 88,7 - 1,0 * T - 3,7 * Cn \text{ mal} + 2,7 * F + 2,4 * 10^{-3} * T^2 - 0,1 * Cn \text{ mal}^2 - 0,3 * F^2 + 4,0 * 10^{-2} * T * Cn \text{ mal} \quad (12)$$

$$Y_{\text{Rutinósido}}: 668,16 - 5,09 * T - 36,50 * Cn \text{ mal} - 4,50 * Cn \text{ mal}^2 + 0,7 * T * Cn \text{ mal} \quad (13)$$

$$Y_{h^{\circ}}: -41,0 - 0,2 * T - 12,9 * Cn \text{ mal} - 6,33 * F + 4,9 * 10^{-3} * T^2 - 1,4 * Cn \text{ mal}^2 - 0,4 * F^2 \quad (14)$$

$$Y_{\text{Densidad}}: 0,40 - 3,8 * 10^{-3} * T - 0,1 * Cn \text{ mal} - 3,6 * 10^{-3} * F + 1,7 * 10^{-5} * T^2 - 8,9 * 10^{-4} * Cn \text{ mal}^2 - 4,6 * 10^{-4} * T * Cn \text{ mal} \quad (15)$$

5.2.3 Optimización del proceso de secado por atomización

A continuación, se muestran los gráficos tanto en tercera dimensión como de contorno de las diferentes variables respuestamconsideradas en la optimización del secado por atomización de un extracto de broza de café. Los gráficos se realizaron en función de la concentración de maltodextrina y de la temperatura de entrada al secado, sin considerar el flujo, ya que este parámetro no fue significativo para ninguna de las variables respuesta, lo cual fue asociado

principalmente a que las concentraciones de maltodextrina al ser relativamente bajas no interfirieron en la viscosidad de los extractos ni en el flujo de alimentación.

Con respecto al rendimiento, se puede observar en la **Figura 22** que los mayores rendimientos se alcanzaron a mayores concentraciones de maltodextrina; lo cual es de esperar, ya que, la maltodextrina aportó la mayor parte de la materia seca a la mezcla alimentada en el secador. De igual manera, se ha observado que los recubrimientos tienden a formar una capa protectora sobre las gotitas, así como, aumentar la temperatura de transición vítrea que, a su vez, reduce la pegajosidad del producto y, por lo tanto, disminuye la cantidad de polvo adherido a las paredes aumentando la cantidad de producto obtenido (Peng *et al.*, 2013). En el estudio realizado por Tonon *et al.* (2008) en Acai (*Euterpe oleracea Mart.*) , se observó que un aumento de maltodextrina ocasionó una reducción del rendimiento; debido a un aumento de la viscosidad del fluido alimentado, que puede afectar la formación de las gotas pero, además, un mayor contenido de sólidos en la mezcla aumenta la cantidad de sólidos disponibles al chocar con las paredes y pegarse. Sin embargo, en dicho estudio se emplearon concentraciones de maltodextrina entre 10-30%. En la presente investigación no se presentó ese efecto, posiblemente por usar concentraciones bajas de maltodextrina (3-8%).

En el estudio realizado por Young *et al.* (2007) se secó un extracto de sandía sin maltodextrina, obteniendo un producto sumamente pegajoso, el cual fue depositado en su mayoría en la cámara de secado. Por el contrario, al usar 3 y 5% de maltodextrina las pérdidas en el secador fueron menores, aumentando los rendimientos y reduciendo la pegajosidad.

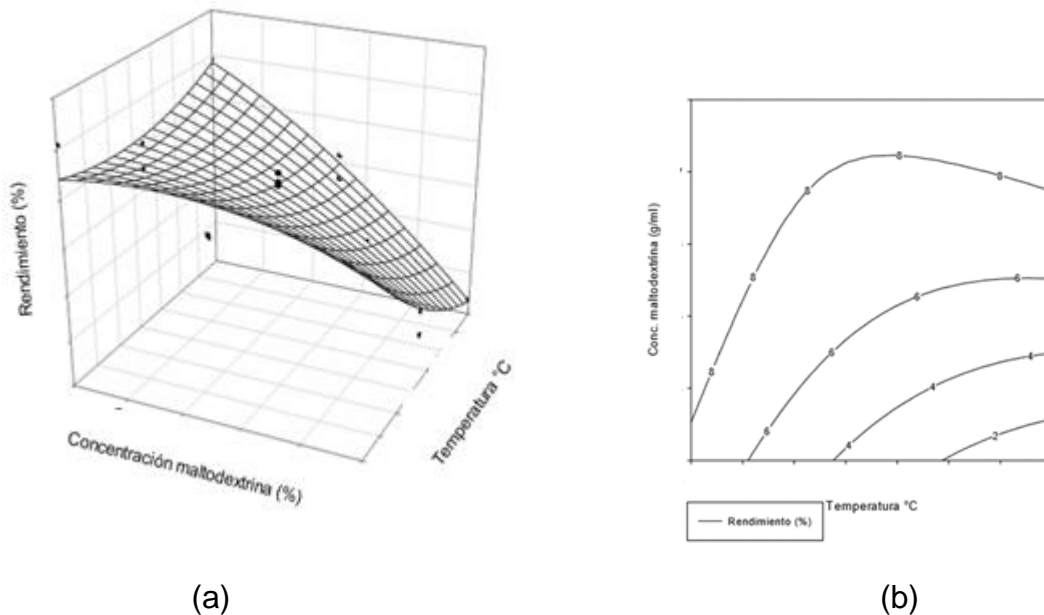


Figura 22. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) del rendimiento del polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.

Por otra parte, se puede observar que cuando la temperatura de entrada aumentaba se daba una reducción en el rendimiento principalmente a concentraciones bajas de maltodextrina (menos de 5%). Contrariamente en un estudio realizado por Fazaeli *et al.* (2012) en mora negra (*Morus nigra*) se encontró que el rendimiento aumentó al aumentar la temperatura, y fue atribuido a una mayor rapidez en la evaporación del agua, lo que evita que cuando las partículas choquen contra la pared del secador se adhieran a ella. Sin embargo, es posible que las diferencias en los resultados se deban a que concentraciones bajas de maltodextrina no permitieron un aumento tal de la temperatura de transición vítrea que evite la pegajosidad y adherencia a la cámara de secado en el presente estudio.

El flujo de alimentación no fue significativo en la variable rendimiento (ni en ninguna), sin embargo, en el estudio realizado por Tonon *et al.* (2008) un

mayor flujo ocasionó un menor rendimiento y se asoció a una transferencia de masa y de calor más lento.

Por otra parte con respecto a la densidad “bulk” que varió de 0,27 a 0,45 g/mL se puede observar que la concentración de maltodextrina fue la que generó una mayor variación de dicha variable respuesta (Ver **Figura 23**); un aumento de la concentración de maltodextrina ocasionó un aumento de la densidad “bulk”. Resultados opuestos fueron hallados por Fazaeli *et al.* (2012) donde la densidad “bulk” presentó un rango de 0,35 a 0,55 g/mL y un aumento de la concentración de maltodextrina causó una reducción en la densidad bulk y fue asociado a una menor humedad inicial; ya que, al aumentar el contenido del acarreador en el fluido alimentado se liga más agua y, por lo tanto, el agua que debe de ser evaporada es menor.

Por otra parte, un aumento de la temperatura ocasionó una reducción de la densidad, y puede ser asociado a un mayor gradiente de temperatura entre el líquido alimentado y el medio de secado; convirtiendo la evaporación en un proceso más rápido, que a su vez, ocasiona que el producto final posea partículas más grandes por procesos de expansión, así como, más poroso y con una estructura más fragmentada por una menor contracción, aumentando la solubilidad (Tonon *et al.*, 2011; Fazaeli *et al.*, 2012).

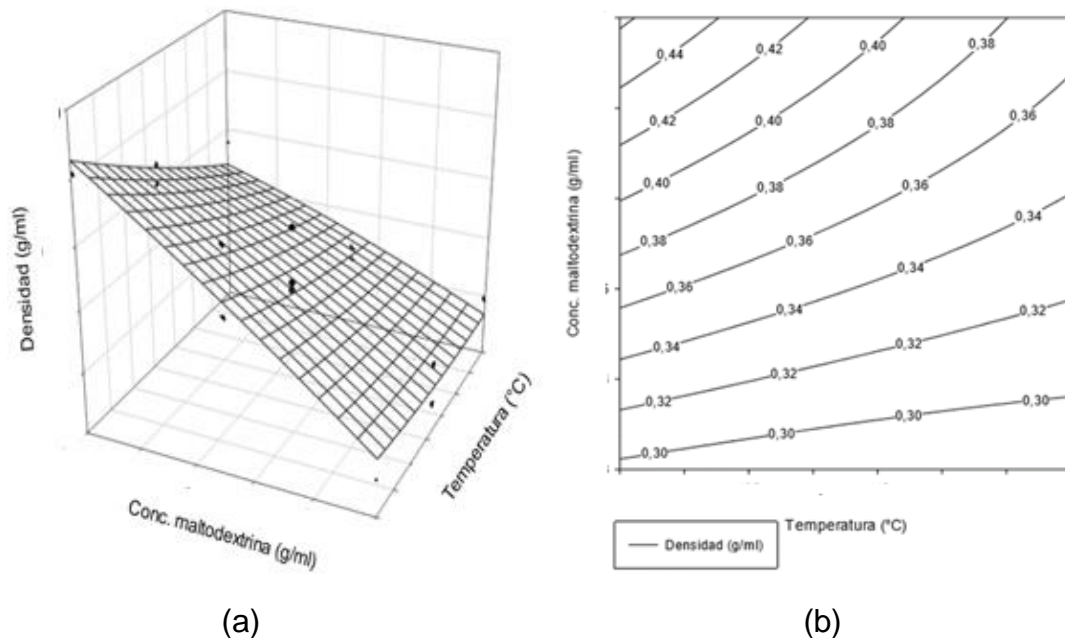


Figura 23. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) de la densidad "bulk" del polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.

Valores altos de densidad "bulk", que según los resultados obtenidos por Fazaeli *et al.* (2012) una densidad "bulk" de 0,55 g/mL puede ser considerada alta, han sido asociados con valores más altos de humedad ya que al tener más humedad las partículas son más pesadas. Una menor densidad "bulk", por su parte, implica más aire ocluido dentro de los polvos, y, por lo tanto, una mayor tendencia a la oxidación y menor estabilidad durante el almacenamiento (Ferrari *et al.*, 2012). Sin embargo, Fazaeli *et al.* (2012) en su estudio asociaron la baja densidad "bulk" con una alta solubilidad, ya que si las partículas son grandes presentan más espacio entre ellas y son más fácilmente penetradas por el agua. Ferrari *et al.* (2012) observaron que, si las partículas son más pequeñas de 50 μm , estas presentan una pobre reconstitución.

En el análisis del color el parámetro h^0 , el cual está relacionado con la tonalidad misma, se buscó un mínimo pues las tonalidades rojizas tienen valores de h^0 bajos (Pessanha *et al.*, 2016), y el objetivo de la investigación era conservar el color propio de la baya de café. Se puede observar en la **Figura 24** que las altas temperaturas favorecen la pérdida de compuestos rojizos, es decir, se da

un aumento del h° . Santhalakshmy *et al.* (2015), encontraron que en los polvos de jambul o jambilán (*Syzygium cumini*) secados con temperaturas de entrada entre 140-160 °C ocasionaron valores de h° más altos, lo cual asociaron a la degradación de antocianinas, pigmentos encargados de la coloración rojiza, por las altas temperaturas.

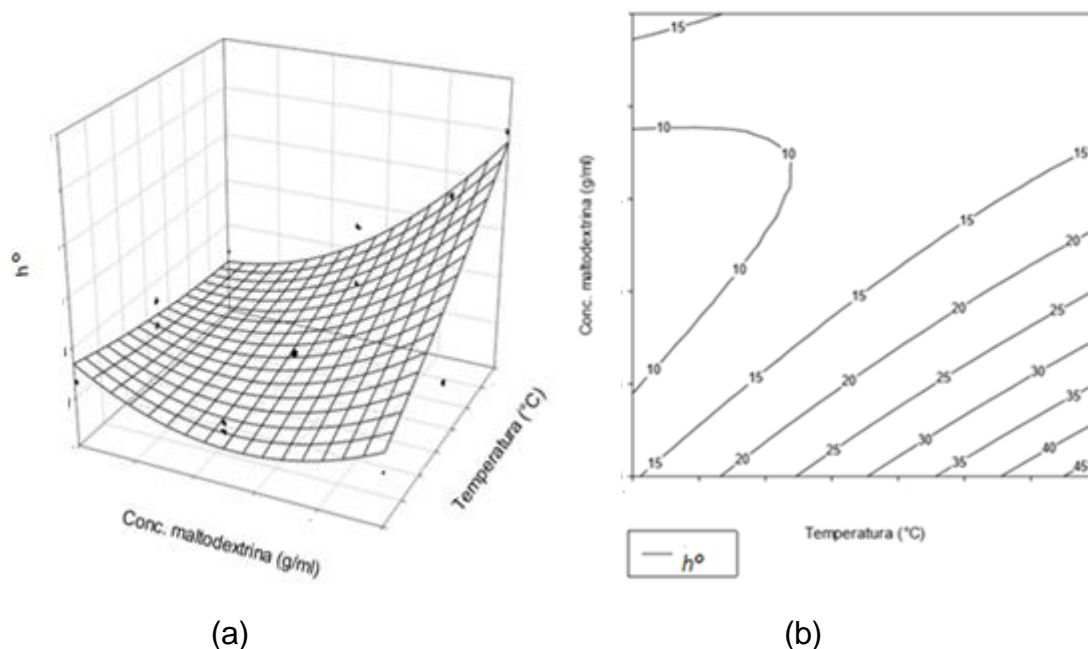


Figura 24. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) de la tonalidad (h°) del polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.

Con respecto al contenido de recubrimiento las concentraciones bajas (menos de 4) y altas (más de 8) de maltodextrina, también, favorecen altos valores de h° . Lo cual se puede deber, en el caso de las bajas concentraciones, a una mayor degradación debido a un menor efecto encapsulador, y en el caso de mayor contenido de maltodextrina a un efecto de dilución de los pigmentos (Pessana *et al.*, 2016). Se puede observar que cuando las concentraciones fueron mayores a 6% se conservó valores de tonalidad por debajo de un ángulo de 20.

Mishra *et al.* (2014) evaluaron concentraciones de maltodextrina de 3, 5, 7 y 9% y temperaturas de entrada de 125, 150, 175 y 200 °C en amla (*Emblica*

officinalis) y observaron que con mayor concentración de maltodextrina y mayor temperatura de entrada los valores de h^0 fueron mayores; debido a que el secado por atomización aumenta el área superficial ocasionando una rápida oxidación de los pigmentos, similares resultados fueron observados en la presente investigación donde las altas temperaturas y mayores concentraciones de maltodextrina ocasionaron mayor ángulo de tono. Por otra parte, en el estudio realizado por Lao & Giusti (2017) encontraron que ni la temperatura de entrada ni la concentración de maltodextrina tuvieron efecto sobre el valor h^0 en un polvo de maíz morado.

En la **Figura 25** se puede observar que cuando la concentración de maltodextrina fue baja (cerca de 4%) al aumentar la temperatura de entrada se dio una reducción en el contenido de cianidina-3-rutinósido más evidente. Sin embargo, cuando la concentración de maltodextrina fue mayor, el aumento de temperatura ocasionó pocos cambios, lo cual confirmó la importancia del acarreador en el proceso de encapsulación de las antocianinas, de manera tal que, un aumento de la temperatura no ocasiona degradación, pues los compuestos sensibles se encuentran encapsulados y protegidos. En el estudio que realizó Tonon *et al.* (2008) en açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) y Jafari *et al.* (2017) en granada (*Punica granatum L.*) observaron que al aumentar la temperatura de entrada en açai en un rango de 138-202 °C y en granada en un rango de 124-143 °C, también se da una mayor pérdida de antocianinas debido a la sensibilidad de las mismas a la temperatura, así como a reacciones de oxidación.

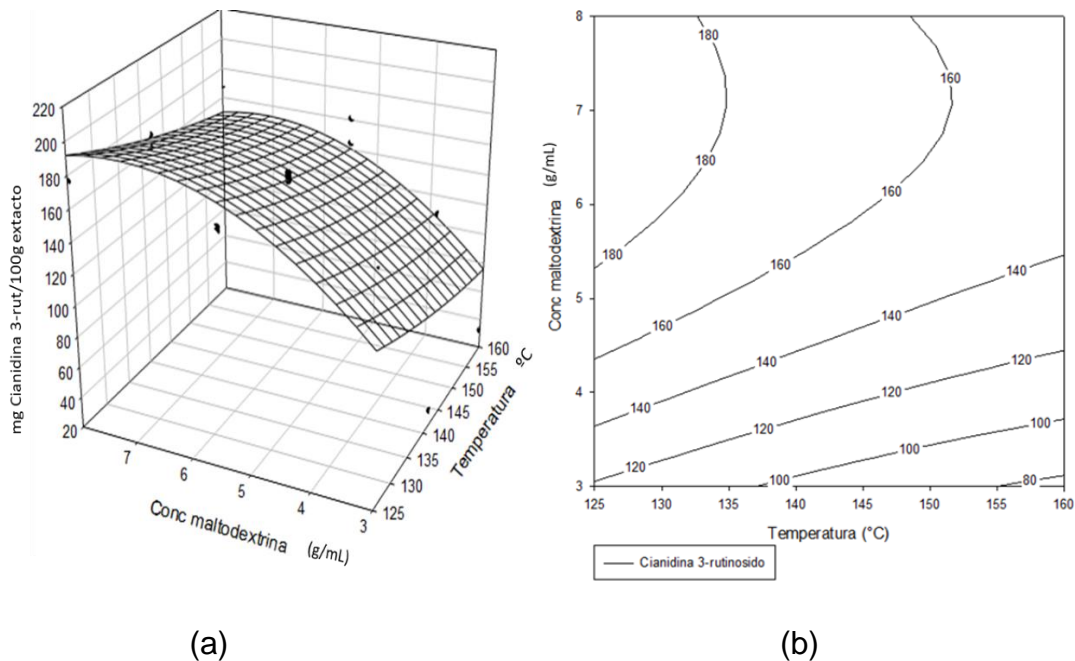


Figura 25. Superficie de respuesta tridimensional (a) y de contorno (b) de la concentración de cianidina 3- rutinósido en el polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina en el secado por atomización.

En general, se ha observado que las altas temperaturas en el secado por atomización indujeron a una mayor degradación de antocianinas; sin embargo, esta pérdida puede ser considerada baja comparada con otros tratamientos térmicos convencionales, ya que, los compuestos funcionales son expuestos solo por un período muy corto de tiempo en la cámara de secado (Pessana *et al.*, 2016). No obstante, se debe tener en consideración que si la temperatura de entrada es muy baja el contenido de humedad del polvo final puede ser mayor y, por lo tanto, la vida útil del producto puede verse comprometida durante el almacenamiento. Sin embargo, según los resultados del **Cuadro VI** se puede observar que la humedad no presentó mayores variaciones en las condiciones evaluadas.

Dentro de los principales resultados de la investigación se puede destacar que la concentración de maltodextrina presentó un mayor efecto en la preservación de antocianinas, concordando con los resultados encontrados por Jafari *et al.* (2017) en un jugo de granada y Lao & Giusti (2017) en un polvo de maíz morado. Estos autores evaluaron el efecto tanto de la temperatura de

entrada como de la concentración de maltodextrina y encontraron que la maltodextrina presentó el mayor efecto en la retención o rendimiento de antocianinas. Sin embargo, se ha reportado un efecto más pronunciado de la temperatura sobre los pigmentos; por ejemplo Tonon *et al.* (2008) hallaron que una mayor temperatura de entrada ocasionó una mayor pérdida de antocianinas en açai debido a la sensibilidad de éstas a la temperatura. Dichas diferencias se pueden deber a la aplicación de temperaturas mucho más altas a las empleadas en la presente investigación, las cuales sí permitieron ver mayor efecto en la reducción de antocianinas con el calor.

Lao & Giusti (2017) encontraron que cuando la concentración de maltodextrina fue de 2% la retención de antocianinas fue significativamente menor que con valores de 5 y 10%, lo cual refleja que una cierta cantidad de recubrimiento debe ser adicionado para mejorar la eficiencia del secado y el rendimiento de antocianinas.

La adición de maltodextrina, además, de ser importante por el efecto encapsulador de compuestos sensibles, también es un ayudante de secado. Esto dado que evita que el producto en polvo se pegue en las paredes del secador, aumentando los rendimientos, tal y como se discutió previamente.

5.2.4 Elección de las condiciones óptimas

Con el fin de elegir las condiciones óptimas para el proceso de secado por atomización se emplearon tanto el análisis canónico como los gráficos de contorno (ver **Cuadro A9** y **Figura 26**). Al ser un análisis multivariado se debió tomar en consideración todas las variables respuesta. Sin embargo, se prestó mayor importancia a las variables: concentración de cianidina 3-rutinósido y color (h^0), ya que, fueron las variables que estaban más relacionadas con la obtención de un polvo rico en antocianinas, que era el principal objetivo de la presente investigación. Además, se consideró un rendimiento aceptable (mayor a 10%) ya que un proceso con un rendimiento muy bajo es económicamente insustentable.

Para determinar las condiciones óptimas se tomó el análisis canónico, el cual permitió obtener los valores críticos, es decir, donde las variables eran

máximas o mínimas de acuerdo a lo requerido, como referencia, y posteriormente usando esto como una guía, se evaluó el comportamiento de cada variable respuesta en dichas condiciones. Como muestra el análisis canónico (ver **Cuadro A9** en anexos) los escenarios considerados como óptimos cambiaban mucho de una variable respuesta a otra, y al observar los gráficos de contorno las mejores condiciones para una variable respuesta no lo eran para otra. Por ello, se decidió dar prioridad a los gráficos de contorno y las tendencias mostradas.

También en el **Cuadro A9** (en anexos) se muestra que las variables respuesta presentaron una forma de punto crítico (o estacionario) de silla de montar, esto es un punto de inflexión entre un máximo relativo y un mínimo relativo. Si el propósito es obtener un máximo o un mínimo de la respuesta estudiada, según Almeida *et al.* (2008) las coordenadas de silla de montar no indican los valores óptimos, sin embargo, a través de una inspección visual de los gráficos se puede encontrar una región óptima.

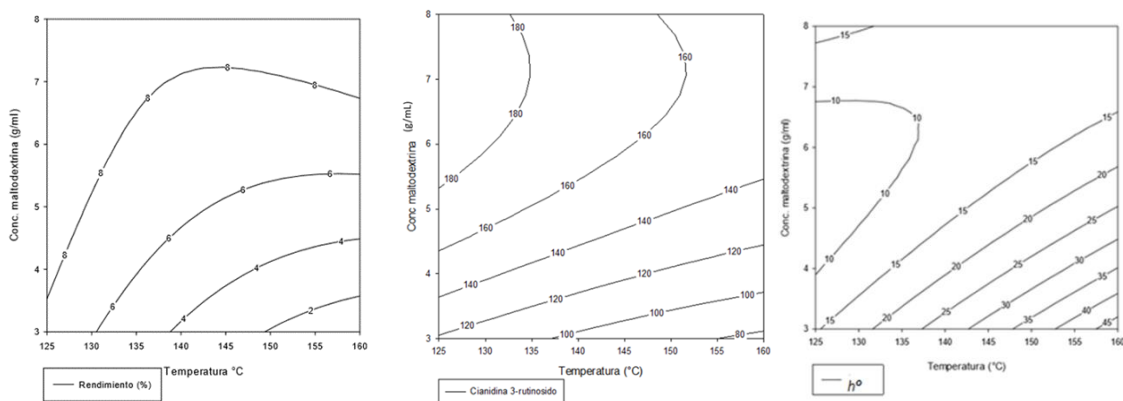


Figura 26. Gráfico de contorno de las superficies de respuesta del rendimiento, tonalidad (h°) y de la concentración de cianidina 3-rutinósido en el polvo en función de la temperatura de entrada y la concentración de maltodextrina.

Por lo tanto, de una forma visual se empleó los gráficos de contorno para elegir las condiciones óptimas, ya que, al observar la **Figura 26** la concentración de cianidina 3-rutinósido y de ángulo de tono (h°) existía un rango de condiciones de temperatura y concentración de maltodextrina en las cuales las variables respuesta tenían un resultado aceptable. Se tomó en cuenta las condiciones de

estudios previos (Ariza, 2011; Quirós, 2014) donde se usó una concentración de maltodextrina de 8% y una temperatura de entrada 160 °C y que ocasionaba dilución del color y posible degradación térmica por la sensibilidad de las antocianinas al calor, por lo que las condiciones seleccionadas serían menores a éstas usadas anteriormente.

Las condiciones consideradas como óptimas fueron: temperatura de entrada de x, concentración de maltodextrina de y y un flujo de alimentación de γ . En un estudio realizado por Young *et al.* (2007) la concentración de 5% de maltodextrina aportó las mejores características, resultados similares se obtuvieron en la presente investigación, en la cual un 5,5% de maltodextrina permitió obtener un polvo con un alto contenido de antocianinas (más de 150 mg cianidina 3-rutinósido), un buen color (h° menor a 15) y rendimiento aceptable (cercano a 10%).

En un estudio realizado por Santhalakshmy *et al.* (2015) encontraron que las mejores condiciones de secado en jambul o jambulán (*Syzygium cumini*) corresponde a una temperatura de 140 °C (siendo ésta la temperatura de secado evaluada más baja) y se observó que un aumento de temperatura favoreció la producción de un polvo más brillante y con una coloración menos púrpura. Es decir, que el uso de bajas temperaturas, al igual que en la presente investigación, favoreció la obtención de un polvo con una coloración más intensa.

5.2.5 Verificación de los modelos

Luego de elegir las condiciones óptimas se llevó a cabo tres repeticiones del secado del extracto de broza de café bajo dichas condiciones; esto con el fin de evaluar el modelo, es decir, comparar los valores predichos con respecto los obtenidos experimentalmente.

El secado se realizó en dos extractos codificados como: Turrialba-agosto 2016 y Zarcero-marzo 2016. Esto debido a que todos los tratamientos de la superficie de respuesta, y la respectiva validación se realizaron a partir de un único lote de broza de café durante el pico de la cosecha del inicio del 2016 en la zona de Alajuela, Zarcero. Se sabe que las antocianinas sufren reacciones de

degradación durante el almacenamiento y que, por lo tanto, lo ideal es almacenarlas a muy bajas temperaturas para disminuir la velocidad de reacción. Fue por esa razón que se almacenó el extracto a -80 °C. Sin embargo, en investigaciones anteriores se observó que luego de 2-3 meses de almacenamiento el extracto sufría degradaciones y variaciones de color. Por ello, se adquirió un lote de broza de café de la zona de Turrialba, ya que, no fue posible obtenerlo de la zona de Zarcero pues el café es un producto de temporada. Sin embargo, tanto por la zona geográfica como por la época del año, la broza recolectada era de una calidad menor y fue necesario hacer una selección exhaustiva de los granos rojos y en buen estado.

Existen dos tendencias con respecto a la validación, una indica que es recomendable utilizar la muestra que se usó para hacer el modelo de la superficie de respuesta en la validación y además, incluir otras muestras para ver cómo se comporta. La segunda tendencia indica que se recomienda realizar el proceso de validación únicamente con la misma muestra con la que se realizaron los ensayos del modelo de optimización, esto con el fin de disminuir las fuentes de error, así como, no introducir factores externos que puedan atribuir diferencias entre los valores predichos por el modelo y los obtenidos de forma experimental (Bas & Boyaci 2007, Abas,2008). Debido a estas razones se tomó la decisión de llevar a cabo la validación con ambos extractos, y poder comparar, así como evaluar, de una mejor manera el modelo.

A continuación en el **Cuadro IX** se muestran los resultados de las diferentes variables respuestas predichas por el modelo generado y las obtenidas experimentalmente en ambos extractos.

Cuadro IX. Resultados predichos por el modelo y obtenidos experimentalmente de las variables respuestas usadas en la optimización del secado de un extracto de broza de café para validar el modelo.

Variable	Valores predichos	Valores obtenidos	
		Zarcero- marzo 2016	Turrialba- agosto 2016
Rendimiento (%)	8,32	7,81 ($\pm 0,19$)*	7,36 ($\pm 0,19$)
Densidad "Bulk" (g/mL)	0,70	0,34 ($\pm 0,02$)	0,36 ($\pm 0,02$)
h ^o	7,83	9,34 ($\pm 1,33$)	20,87 ($\pm 0,33$)
Cianidina 3- rutinósido (mg/ 100g bs)	169	128 (± 8)	71 (± 8)

*Los valores entre paréntesis son los intervalos confianza. Para un n=3 y un nivel de confianza del 5%.

En general, como se muestra en el **Cuadro IX**, los valores obtenidos usando el extracto de Zarcero presentaron mayor similitud con lo predicho por el modelo; por lo tanto, haber utilizado la misma materia prima permitió llegar a una validación del proceso. El producto en polvo obtenido de la zona de Turrialba presentó valores cercanos a los predicho por el modelo en rendimiento y densidad "bulk", sin embargo, el contenido de cianidina 3-rutinósido y h^o difirieron con lo esperado. Sin embargo, el café al ser obtenido de una zona y calidad diferente puede contener menos antocianinas y, por lo tanto, generar un polvo con menos cianidina 3-rutinósido y mayor h^o. De esta forma, se validó que la calidad del café influye, estando más alejado de lo predicho el café de menor calidad, y que el modelo predice valores de café similar al que se usó para generarlo.

El contenido de cianidina 3-rutinósido fue mayor en el producto en polvo del extracto obtenido de la zona de Zarcero, que en el obtenido de la zona de Turrialba, por lo que es probable que el contenido de antocianinas difiera de una zona a otra, ya que se encuentran a alturas y condiciones climatológicas diferentes. A pesar de que no se han realizado estudios sobre las diferencias en el contenido de estos compuestos fenólicos en café, según Kammerer (2016) el contenido de antocianinas puede cambiar entre variedades de frutas o vegetales ya que se puede ver afectado por genes, irradiación solar, temperatura y factores

agronómicos. Además, cabe rescatar que visualmente el extracto de la broza de café de la zona de Turrialba era de una coloración menos rojiza que la de Zarcero.

Los resultados de antocianinas concuerdan con los resultados de tonalidad, ya que, se puede observar que el extracto de la zona de Zarcero presentó valores más bajos de h^0 , lo cual está asociado con coloraciones rojizas (Pessana *et al.*, 2016). Pero, además, también fue el polvo con un mayor contenido de antocianinas, esto es de esperarse, ya que las antocianinas son pigmentos solubles encargados de las coloraciones rojas (Prata & Oliveira, 2007). Similares resultados fueron encontrados por Jiménez *et al.* (2011) quienes asociaron directamente la coloración rojiza con el contenido de antocianinas en el secado de arándanos. Por otro lado, el contenido menor medido con respecto al predicho puede deberse a que realmente hubo pérdida de antocianinas, aunque en muy poca cantidad, durante el almacenamiento en congelación a -80°C por 5 meses.

Es interesante destacar que, a pesar de que los resultados del modelo de regresión generaron valores de R^2 y R^2 *ajustado* relativamente bajos (menos de 0,8) para la medición de antocianinas, la predicción de esta variable se puede considerar cercana a lo esperado. Esto confirma la observación de Bas y Boyaci (2007) quienes mencionan que el coeficiente de determinación (R^2) por sí solo, no es una medida de la exactitud del modelo, y un valor de R^2 elevado no necesariamente implica que el modelo de regresión es bueno.

La variable respuesta que presentó mayor variación, con lo que predijo el modelo, fue la densidad “bulk”; sin embargo el valor predicho fue más alto que todos los resultados obtenidos experimentalmente en los diferentes puntos de la superficie de respuesta. La medición de la densidad “bulk” es bastante empírica ya que depende de la forma que se compacte el polvo en la probeta. Los resultados por sí mismos son variables aun usando una misma muestra.

Por otra parte, los resultados de rendimientos también se encontraban por debajo de lo predicho por el modelo; sin embargo, fueron valores muy cercanos. Al realizar un experimento confirmatorio lo ideal es que los valores obtenidos se

encuentren dentro del intervalo de confianza, de manera que las predicciones realizadas con el modelo sean confiables. A pesar de que los valores obtenidos experimentalmente no se encontraban dentro del intervalo de confianza para ninguna de las variables respuesta, los valores fueron bastante cercanos a pesar de los valores relativamente bajos de R^2 y $R^2 - adj$, tal y como se mencionó anteriormente.

La investigación permitió obtener un producto en polvo a partir de broza de café con una buena solubilidad y coloración al disolver en agua. Es una propuesta atractiva para dar un uso a la broza de café, subproducto de la actividad cafetalera del país. Las tecnologías de membranas y de secado por atomización son factibles de aplicar en el país, y a pesar de poseer costos elevados de equipamiento presentan bajo costo de operación y permiten obtener un producto en polvo de buena calidad, que responde a las necesidades del consumidor a nivel mundial, sobre todo en la reducción del uso de colorantes artificiales. Con respecto a las investigaciones previas, los contenidos de antocianinas son mayores que los reportados en el estudio realizado por Ariza (2011), en el que, no fue aplicada la etapa de escaldado que favorece la retención de antocianinas, debido a la menor degradación por acción de las enzimas. Con respecto a Quirós (2014), los valores de h^0 son mayores a los encontrados por este autor, por lo tanto, los polvos son menos rojizos; sin embargo, están dentro del rango de rojo puro (-15^0 y 15^0). Los resultados diferentes se pueden deber a diferentes tiempos de congelación y almacenamiento del extracto y al café recolectado, que pudo ser más maduro que el usado en esta investigación y a que el tiempo que tardó el extracto sin secarse en la presente investigación produjo reducción de cianidina 3-rutinósido comparada con la investigación de Quirós (2014) en la cual el extracto era secado inmediatamente.

VI. Conclusiones

- La microfiltración preservó el contenido de cianidina 3-rutinósido, produjo reducción de sólidos y de acidez y un posible aumento de azúcares en base seca en el permeado que presentó purificación, así como un aumento del índice de oscurecimiento en el retenido que significó la retención de compuestos oscuros en dicha etapa.
- Durante el proceso de ultrafiltración el retenido presentó un aumento en el contenido de cianidina 3-rutinósido, de sólidos totales, de acidez, de fructosa y sacarosa, mientras que la glucosa se mantuvo constante; con respecto al extracto microfiltrado.
- La etapa de diafiltración permitió una purificación del extracto al reducir el contenido de fructosa y sacarosa, de ácidos y de sólidos, así, como retener las antocianinas.
- La etapa de diafiltración permitió la posterior obtención de un polvo rico en cianidina 3-rutinósido y con mayor rendimiento comparado con el polvo del extracto ultrafiltrado.
- El color no presentó una relación directa con el contenido de antocianinas, solamente la pureza presentó diferencias significativas, siendo mayor en el extracto ultrafiltrado en polvo.
- El producto en polvo presentó altos porcentajes de retención (mayores del 90%) de antocianinas durante el secado, independientemente del proceso membranario previo.
- Los productos en polvo presentaron una completa reconstitución en agua.
- El flujo de alimentación no presentó un efecto significativo para ninguna de las variables respuesta, debido probablemente a que se varió en un ámbito muy pequeño.
- A mayor concentración de maltodextrina mayor rendimiento, para una reducción de la pegajosidad, mientras que un aumento de la temperatura de entrada redujo el rendimiento, contrario a lo esperado.

- Las altas temperaturas de secado incrementaron las pérdidas de cianidina 3-rutinósido, así como de color (valores de h^0 mayores), principalmente cuando se empleaban concentraciones de 4% u 8% de maltodextrina.
- La concentración de maltodextrina presentó la mayor influencia en la preservación de cianidina 3-rutinósido, independientemente de la temperatura de entrada al secador y del flujo de alimentación, debido al efecto de encapsulación.
- Los modelos obtenidos mediante la metodología de la superficie de respuesta no permiten un buen ajuste de las variables respuesta, lo cual se debe a que los ensayos fueron realizados bajo condiciones poco extremas, principalmente de temperatura, por lo que se presentó poca variabilidad entre los resultados.
- Las condiciones de secado, que permiten obtener un polvo de broza de café rico en antocianinas, fueron una temperatura de entrada de 135 °C, una concentración de maltodextrina de 5,5% y un flujo de 4 mL/min.
- Los resultados de cianidina 3-rutinósido, color y rendimiento del extracto obtenido de la zona de Zarcero presentaron valores más cercanos a lo predicho por el modelo, sin embargo, no se encontraron dentro de los intervalos de confianza.

VII. Recomendaciones

- Realizar un ensayo tipo “screening” o tamizado el cual permite identificar las variables independientes, para seleccionar los niveles. Esta elección es de suma importancia, ya que, la aplicación de la superficie de respuesta estará directamente relacionada a la elección de estos niveles y si son elegidos erróneamente la optimización fracasará.
- Realizar los ensayos empleando condiciones extremas, principalmente de temperatura, por ejemplo de 220 °C que es la temperatura máxima del secador, con el fin de mejorar los parámetros de ajuste del modelo, tomando en consideración la posible degradación de las antocianinas por las altas temperaturas.
- Realizar los ensayos de validación con la misma materia prima con la cual se realizaron los diferentes tratamientos de la superficie de respuesta, sin que hayan sido almacenados por varios meses.
- Almacenar los extractos a -80 °C y por pocos meses para evitar reacciones de degradación de las antocianinas.
- Realizar el proceso de membranas en forma continua para evitar congelar y descongelar el producto, además emplear condiciones asépticas para asegurar una mayor vida útil del producto, y evitar una posterior recontaminación microbiológica.
- Evaluar y optimizar otras condiciones de proceso de ultrafiltración y diafiltración (variando temperatura, presión transmembranaria y velocidad tangencial) con el fin de estudiar el impacto sobre el contenido de antocianinas y parámetros de color en el extracto de broza de café.
- Realizar el proceso de ultrafiltración a mayor FRV para así obtener un extracto más concentrado.
- Realizar el proceso de diafiltración con mayores diavolumenes para obtener un extracto con mayor pureza con respecto a las antocianinas.
- Realizar un análisis de costos y la viabilidad económica del proceso.

- Evaluar la vida útil del polvo, así como su aplicación como colorante en diferentes alimentos.
- Evaluar la calidad microbiológica del producto.
- Valorar posibles usos de la usa broza generada en la etapa de filtración.

VIII. Bibliografía

- ABAS, A., KAUR, D., AHMED, I., SOGI, D. 2008. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. *LWT*. 41: 1514-1520.
- AGUIAR, J., ESTEVINHO, B., SANTOS, L. 2016. Microencapsulation of natural antioxidantes for food application- The specific case of coffee antioxidantes- A review. *Trends in Food Science & Technology*. 58: 21-39.
- ALMEIDA, M., ERTHAL, R., PADUA, E., SILVEIRA, L., AMÉLIA, L. 2008. Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977.
- AOAC. 2002. AOAC Official Method 920.151: Solids (total) in fruits and fruit Products. Official Methods of Analysis of AOAC International 17ed. Association of Official Analytical Chemists. Maryland.
- ARIZA, N. 2011. Extracción de pigmentos con actividad antioxidante a partir de la broza de café. Tesis de Maestría profesional en Química Industrial. Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- BAS, D., BOYACI, I. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response Surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 78: 836-845.
- BELITZ, H., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. 2009. Food chemistry. Springer. Germany.
- BELLEVILLE, M., VAILLANT, F. 2015. Chapter 8. Membrane technology for production of nutraceuticals. In SHI, J. Processing Technology. 2nd edition CRC Press. USA.
- BERK, Z. 2013. Chapter 10: Membrane process. In TAYLOR, S. Food Process Engineering and Technology. 2nd edition. Elsevier. USA.

- BRANDO, C., BRANDO, M. 2014. Chapter 10: Methods of coffee fermentation and drying. In SCHWAN, R., FLEET, G. 2014. Cocoa and coffee fermentations. CRC Press. USA.
- BUGLIONE, M., LOZANO, J. 2002. Nonenzymatic browning and chemical changes during grape juice storage. *Journal of Food Science*. 67: 1538–1543.
- BURNSIDE, E. 2014. Chapter 21: Hydrocolloids and gums as encapsulating agents. In GAONKAR, A., VASISHT, N., KHARE, A., SOBEL, R. *Microencapsulation in Food Industry*. Elsevier. USA.
- CASSANO, A., CONIDI, C., DRIOLO, E. 2010. Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination*. 250: 1101-1104.
- CHAPARRO, L., DHUIQUE-MAYER, C., CASTILLO, S., VAILLANT, F., SERVENT, A., DORNIER, M. 2016. Concentration and purification of lycopene from watermelon juice by integrated microfiltration-based processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 37: 153-160.
- CHHAYA, CH., RAI, P., MAJUMDAR, S., DASGUPTA, S., DE, S. 2008. Clarification on watermelon (*Citrullus lanatus*) juice by microfiltration. *Journal of Food Process Engineering*. 31: 768-782.
- CHIDIEBERE, C., OKON, E. 2016. Application of reduced second order response surface model of convex optimization in paper producing industries. *International Journal of Theoretical and Applied Mathematics*. 2(1): 13-23.
- CHIOU, D., LANGRISH, T. 2011. Chapter 8: Application of spray drying technology for nutraceuticals and functional food products. In YASWANT, P. *Handbook of nutraceuticals, Volume II*. CRC Press. USA.
- CISEÉ, M., VAILLANT F., PALLET, D., DORNIER, M. 2011. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa L.*). *Food Research International*. 44: 2607-2614.

- CONIDI, C., CASSANO, A., CAIAZZO, F., DRIOLO, E. 2017. Separation of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes. *Journal of Food Engineering*. 195: 1-13.
- COUTO, D., DORNIER, M., PALLET, D., REYNES, M., DIJOUX, D., FREITAS, S., CABRAL, L. 2011. Evaluation of nanofiltration for the retention of anthocyanins of açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice. *Desalination And Water Treatment*. 27:108-113.
- DE, S., MONDAL, S. 2012. Chapter 2: Fundamentals of Membrane Separation and Ultrafiltration. In DE, S., MONDAL, S. *Micellar enhanced ultrafiltration: fundamentals and applications*. CRC Press. USA.
- DEL POZO, D., BRENES, C., TALCOTT, S. 2004. Phytochemical and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea Mart.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004: 1539-1545.
- DEL POZO-INSAFRAN, D., DEL FOLLO-MARTINEZ, A., TALCOTT, S., BRENES, C. 2007. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*. 72(4): S247-S253.
- ECHAVARRÍA, A., FALGUERA, V., TORRAS, C., BERDÚN, C., PAGÁN, J., IBARZ, A. 2012. Ultrafiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of fruit juices at pilot plant scale. *LWT- Food Science and Technology*. 46: 189-195.
- ERSUS, S., YURDAGEL, U. 2007. Microencapsuaction of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. 80: 805-812.
- ESQUIVEL, P., JIMÉNEZ, V. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. 46: 488–495.
- EVERITT, B. 2009. Chapter 10: Principal Components. In EVERITT, B. *Analysis multivariate analysis for the behavioral sciences*. CRC. USA.

- FAZAEI, M., EMAM, Z., KALBASI, A., OMID, M. 2012. Effect of spray drying conditions and feed composition on physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioproducts Processing*. 90: 667-675.
- FERRARI, C., MARCONI, S., DUTRA, I., ZARATINI, F., DE AGUIRRE, J. 2012. Influence of carrier agents on the physicochemical properties of black powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*. 47: 1237- 1245.
- GIUSTI, M., WROLSTAD, R. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. *Current Protocols In Food Analytical Chemistry*. F.1.2.1-F.1.2.13.
- GOULA, A. 2015 Chapter 5: Dehydration: Spray drying- freeze drying. In VARZAKAS, T., TZIA, C. *Handbook of processing*. CRC Press. USA.
- GOULA, A., ADAMOPOULOS, K. 2005. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: The effect on powder properties. *Journal of Food Engineering*. 66(1):35-42.
- GRANATO, D., ARES, G. 2014. *Mathematical and statistical methods in food science and technology*. IFT Press. USA.
- ICAFFE (Instituto del café de Costa Rica), 2016. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. Internet: http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/informacion_mercado/informes_actividad/actual/InformeActividadCafetalera.pdf.pdf Visitada el 6 de marzo del 2017.
- IGNAT, I., VOLF, I., POPA, V. 2011. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126: 1821-1835.
- JAFARI, S., GHALEGI, M., DEHNAD, D. 2017. Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technology*. 311: 59-65.

- JAMPANI, C., NAIK, A., RAGHAVARAO, K. 2014. Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption. *Separation and Purification Technology*. 12: 170-178.
- JIMÉNEZ, D., ORTEGA, A., LOZADA, J., PÉREZ, M., VERNON, E., WELTI, J. 2011. Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as Wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 889-894.
- JIMENEZ, N., BOHUON, P., LIMA, J., DORNIER, M., VAILLANT, F., PEREZ, A. 2010. Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberry juice treated at high temperatures (100-180 °C). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2314–2322.
- KAMMERER, D. 2016 Chapter 3: Anthocyanins. In CARLE, R., SCHWEIGGERT, R. *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*. Elsevier. Germany.
- KENKEL, J. 2002. Chapter 5: Applications of Titrimetric Analysis. In KENKEL, J. *Analytical Chemistry for Technicians*. CRC Press. USA.
- KESHANI, S., WAN, W., NOUROUZI, M., NAMVAR, F., GHASEMI, M. 2015. Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *Journal of Food Engineering* 146: 152-162.
- KHURI, A., MUKHOPADHYAY, S. 2010. Response Surface methodology. *WIREs Computational Statistics*. 2: 128-149.
- KUEHL, R. 2000. *Design of experiments statistical principles of research design and analysis*. Second Edition. Duxbury.
- KUMAR, A. 2006. Chapter 8: Membrane separation technology in processing bioactive components. In SHI, J. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals*. CRC Press. USA.
- LAO, F., GIUSTI, M. 2017. The effect of pigment matrix, temperature and amount of carrier on the yield and final color properties of spray dried purple corn (*Zea mays* L.) cob anthocyanins powders. *Food Chemistry*. 227: 376-382.

- LAWLESS, H., HEYMANN, H. 2010. Sensory evaluation of food: principles and practices. Second edition. Springer. USA.
- LEE, J., SCHWARTZ, S. 2005. Chapter 14: Pigments in Plant Foods. In HUI, Y. Handbook of Food Science, Technology, and Engineering. 4 Vol. CRC Press. USA.
- LI, H., MUJUMDAR, A. 2009. Chapter 9: Spray drying and its application in food processing. In PASSOS, M., RIBEIRO, C. Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products. CRC Press. USA.
- MAHDAVI, S., JAFARI, S., ASSADPOOR, E., DEHNAD, D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. International Journal of Biological Macromolecules. 85: 379-385.
- MARTINS, N., LOBO, C., MORALES, P., BARROS, L., FERREIRA, I. 2016. Food Colorants: Challenges, opportunities and current desires of agroindustries to ensure consumer expectations and regulatory practices. Trends in Food Science & Technology 52: 1-15.
- MERCADANTE, A., BOBBIO, F. 2007. Chapter 4.3: Anthocyanins in food: Occurrence and physicochemical properties. In SOCACIU, C. Food colorants. CRC Press. USA.
- MILLER, F., SILVA, C. 2012. Chapter 15: Thermal treatment effects in fruits juices. In RODRIGUES, S., NARCISO, F. Advances in fruit processing technologies. CRC Press. USA.
- MIRANDA, A., PESSANHA, M., SCHULZ, D., PACHECO, S., OLIVEIRA, R., CORRÊA, L. 2012. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. Ciência Tecnologia Alimentaria. 32(1): 43-46.
- MIRSAEEDGHAZI, H., MOHAMMAD, S., EMAM, Z., REZAEI, K., AROUJALIAN, A., NAVIDBAKSH, M. 2010. Comparison between ultrafiltration and microfiltration

- in the clarification of pomegranate juice. *Journal of Food Process Engineering*. 45: 424-246.
- MISHRA, P., MISHRA, S., LATA, C. 2014. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*. 92(3): 252- 258.
- MONTGOMERY, D. 2004. *Diseño y análisis de experimentos 2da edición*. Limusa Wiley. México.
- MORAIS, C. 2014. Chapter 5: Membrane Technology in food Processing. In HAGHI, E., CARVAJAL, M. *Food composition and analysis*. Apple Academic Press. USA.
- MOSQUERA, L., MORAGA, G., MARTÍNEZ, N., CHIRALT, M. 2010. Isotermas de sorción y transición vítrea de la pulpa de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) *Nereis*. 3: 45-51.
- MURTHY, P., MADHAVA-NAIDU, M. 2012. Sustainable management of coffee industry by products and value addition-A review. *Resources, Conservation and Recycling* 66:45- 58.
- MURUGESAN, R., ORSAT, V. 2012. Spray drying for the Production of nutraceutical ingredients- A review. *Food Bioprocess Technol*. 5:3-14.
- MUTHUKUMARAPPAN, K., MARELLA, C. 2010. Chapter 28: Membrane. In FARID, M. *Mathematical modeling of food processing*. processing. CRC Press.USA.
- MYERS, W. 2012 Chapter: Response Surface Methodology. In CHOW, S. *Encyclopedia of biopharmaceutical statistics*. 3rd edition. CRC Press. USA.
- NICOLETTI, V., MARTÍNEZ, N. 2012. Chapter 8: Biopolymers used as drying aids in spray-drying and freeze-drying of fruit juices and pulps. In NICOLETTI, V. *Biopolymer Engineering in Food Processing*. CRC Press. USA.
- OLIVEIRA, C., GOMES. F., CONSTANT, L., SILVA, L., GODOY, R., TONON. R., CABRAL, L. 2016. Integrated membrane separation processes aiming to

- concentrate and purify lycopene from watermelon juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 38: 149-154.
- PACHECO, L., HAWKEN, P., TALCOTT, S. 2007. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea*) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. *Food Research International*. 40: 620-628.
- PENG, Z., LI, J., GUAN, Y., ZHAO, G. 2013. Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. *LWT-Food Science and Technology*. 51: 348-355.
- PESSANHA, M., NOGUEIRA, R., SOBREIRO, D., MIRANDA, A., DE OLIVEIRA, R., MARQUES, F., PACHECO, S., PEREIRA, S. 2016. Effects of encapsulating agents on anthocyanin retention in pomegranate powder obtained by spray drying process. *LWT. Food Science and Technology*. 73: 551-556.
- PINO, F., PEREZ, D. 1983. Análisis de elementos-traza por espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible. Universidad de Sevilla. Córdoba.
- PIRISINO, 1983. High performance liquid chromatographic determination of lactose, glucose and galactose in lactose- reduced milk. *Journal of Food Science*. 48: 742-744.
- PRATA, E., OLIVEIRA, L. 2007. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. *LWT*. 40: 1555-1560.
- QUIRÓS, M. 2014. Condiciones de extracción de un pigmento rojo a partir de la broza de café. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- RIBEIRO, D., RODRÍGUEZ, N., ZAMBRANO, D., LÓPEZ, J. 2014. Chapter 15: Management and utilization of wastes from coffee processing. In SCHWAN, R., FLEET, G. *Cocoa and coffee fermentations*. CRC Press. USA.
- SANTHALAKSHMY, S., JOHN, S., FRANCIS, S., SABEENA, M. 2015. Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruits powder. *Powder Technology*. 274:37-43.

- SOTO, M., ACOSTA, O., VAILLANT, F., PÉREZ, A. 2016. Effects of mechanical and enzymatic pretreatments on extraction of polyphenols from blackberry fruits. *Journal of Food Process Engineering*. 39:492-500.
- SOTO, M. 2014. Obtención de un extracto de polifenoles rico en elagitaninos mediante la aplicación de tecnologías de membranas a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora. Tesis de maestría, Posgrado en Ciencias de Alimentos, Universidad de Costa Rica.
- SULLIVAN, D., CARPENTER, D. 1993. Method of analysis for nutrition labeling. AOAC International, USA.
- THAKUR, V., KUMAR, D. 2006. Studies on the clarification and concentration of beetroot juice. *Journal of Processing and Preservation*. 30: 194-2007.
- TONON, E., BRABET, C., HUBINGER, M. 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 88: 411-418.
- TONON, R., BRABET, C., HUBINGER, M. 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agent. *Food Research International*. 43:907-914.
- TONON, R., FREITAS, S., HUBINGER, M. 2011. Spray drying of Acai (*Euterpe Olearaceae* Mart.) juice: effect of inlet air temperature and type of carrier agent. *Journal of Food Processing and Preservation*. 35: 691-700.
- VERA, L., DE ZAN, M., CÁMARA, S., GOICOECHEA., H. 2014. Experimental desing and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*.124: 123-128.
- VERGARA, C., SAAVEDRA, J., SÁENZ, C., GARCÍA, P., ROBERT. , P. 2014. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus- indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food Chemistry*.157: 246- 251.
- VILLALTA, K. 2016. Estudios de la estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza de café (*Coffea arabica*) para su aplicación como ingrediente colorante en

alimentos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

WILSKA, J. 2006. Chapter 9: Food Colorants. In SIKORSKI, Z. Chemical and functional properties of food components. 3rd edition. CRC Press. USA.

WROLSTAD, R., DURST, R., LEE, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. Trends in Food Science & Technology. 16: 423-428.

YAZDANSHENAS, M., TABATABAEENEZHAD, A., ROOSTAAZAD, R., KHOSHFETRAT, A. 2005. Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. Separation and Purification Technology. 47: 52-57.

YOON, S. 2015. Membrane Bioreactor Processes: Principles and applications. Chapter 2: Membrane process. CRC Press. USA.

YOUNG, S., KING, N., SWEDLUND, P. 2007. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. Chemical Engineering and Processing. 46: 386-392.

IX. Anexos

Cuadro A1. Análisis cuantitativo de los extractos ultrafiltrados (FRV=2) con diferentes tipos de membranas para seleccionar la membrana más apta para el proceso de ultrafiltración.

Membrana	Variable respuesta					
	(mg cianidina-3-rutinósido/L)	Fructosa (g/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Acidez (%)	Humedad (%)
NF270	94 ± 6	10,80 ± 0,08	10,4 ± 0,6	9,5 ± 0,5	1,9 ± 0,2	92,6 ± 0,5
Nadir NP010	70 ± 3	24,5 ± 0,8	24 ± 1	19 ± 2	1,37 ± 0,01	94 ± 1
Nadir NP030	-	-	-	-	-	-
GK	143 ± 5	14 ± 1	11 ± 1	17,3 ± 0,8	1,00 ± 0,01	96,2 ± 0,2

*Los resultados de azúcares y antocianinas están expresados en base seca.

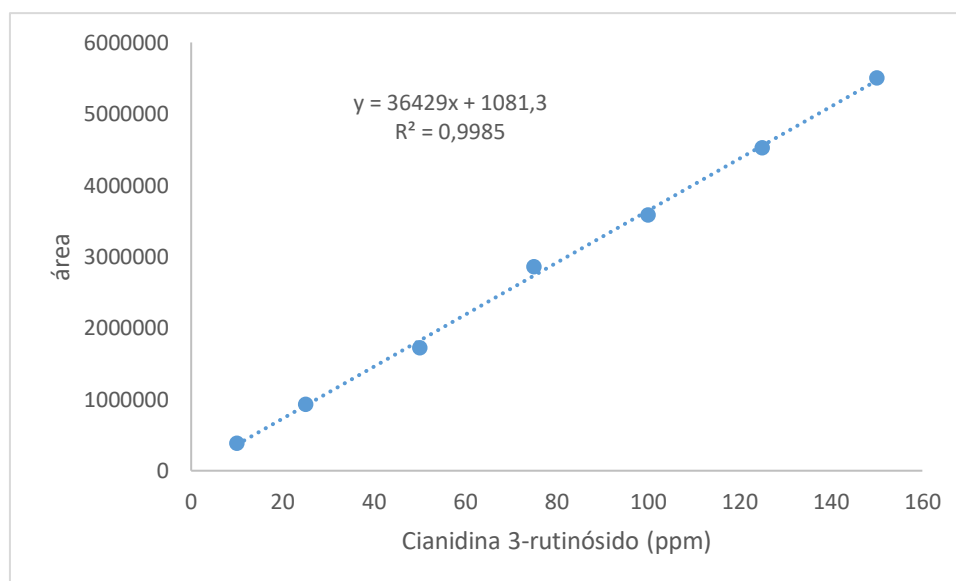


Figura A 1. Curva de calibración de la cianidina 3-rutinósido utilizada para la determinación por HPLC de esta antocianina en los extractos en polvo de la sección 1. Se utilizó 5 mL de muestra para inyectar en el HPLC.

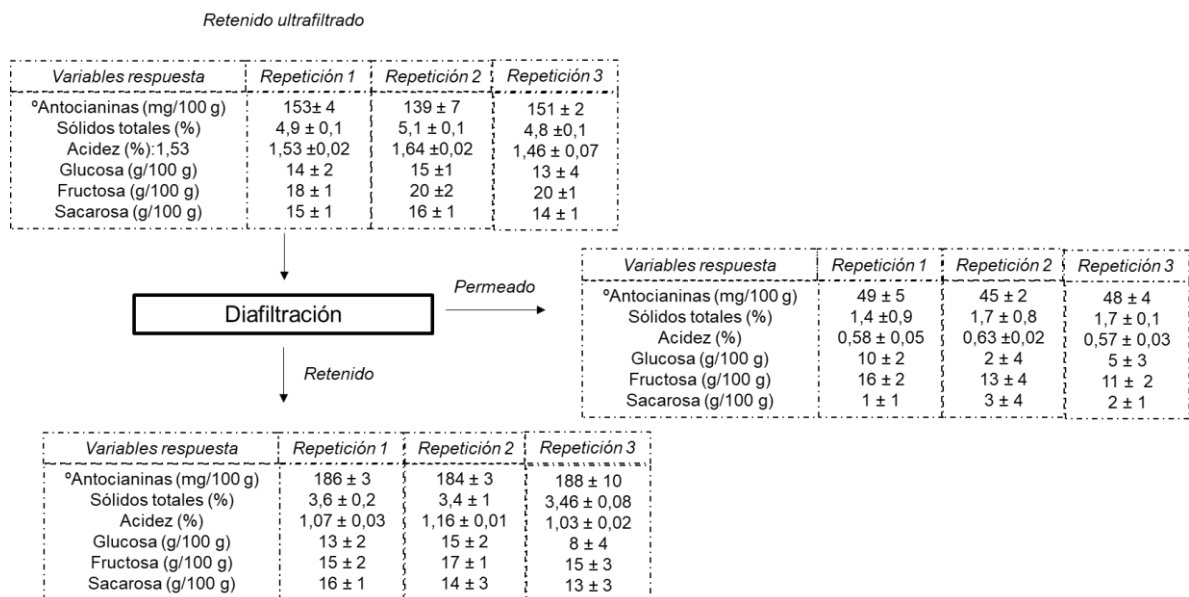


Figura A 2. Efecto de la diafiltración sobre el contenido de antocianinas, sólidos totales, azúcares totales y ácido cítrico del retenido de la ultrafiltración de un extracto de broza de café. *Los resultados de antocianinas están expresados como equivalentes de mg cianidina 3-rutinósido/100 g extracto. Los resultados de azúcares y antocianinas están expresados en base seca. Valores expresados como promedios ± intervalos de confianza, con n=3 y nivel de confianza del 5%.

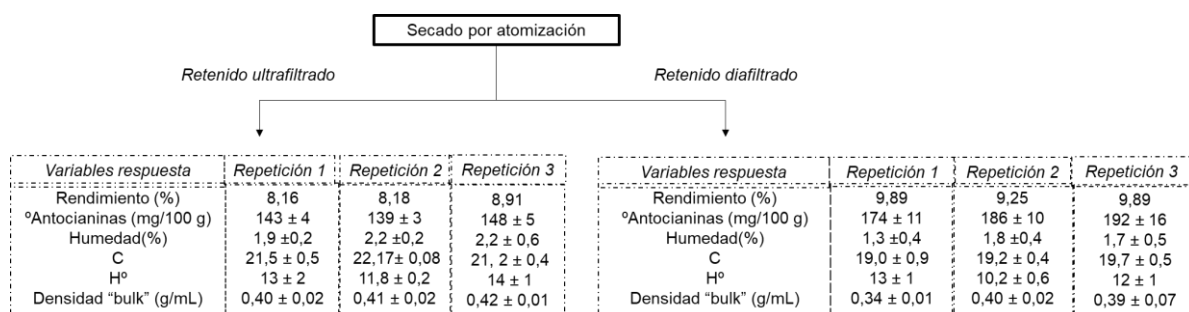


Figura A 3. Características físico-químicas de los polvos obtenidos después del secado para evaluar el efecto del proceso ultrafiltración y diafiltración en la calidad del producto final. *Los resultados de antocianinas están expresados como equivalentes de mg cianidina 3-rutinósido/100 g extracto en base seca. Valores expresados como promedios ± intervalos de confianza, con n=3 y nivel de confianza del 5%.

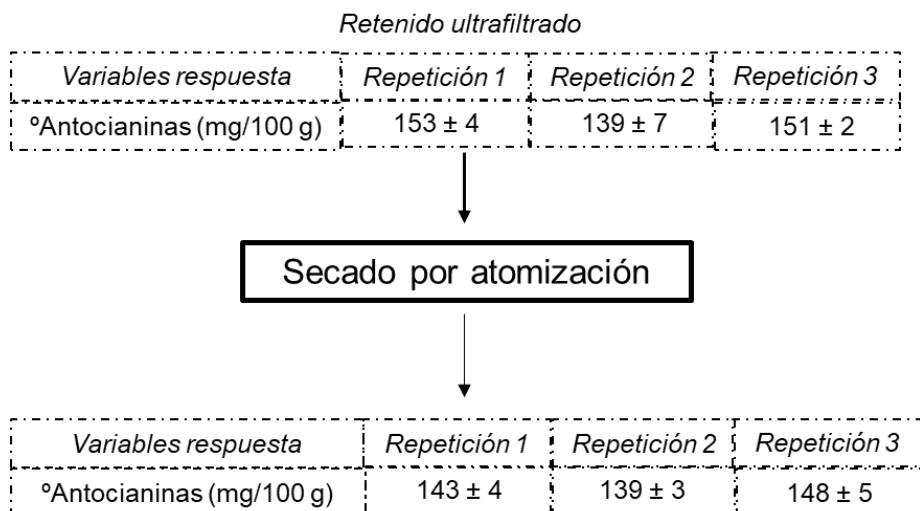


Figura A 4. Resultados del extracto ultrafiltrado antes y después del proceso de secado para evaluar el efecto sobre las antocianinas. *Los resultados de antocianinas están expresados como equivalentes de mg cianidina 3-rutinósido/100 g extracto en base seca.

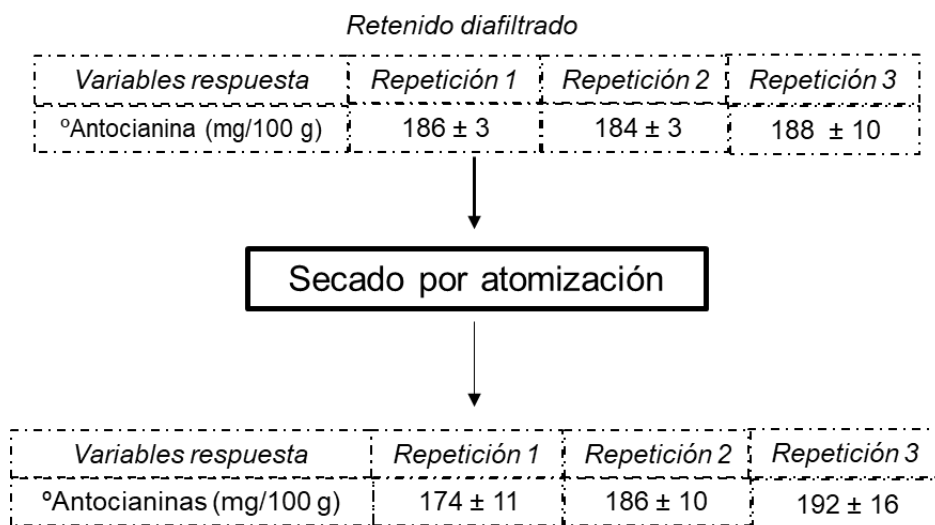


Figura A 5. Resultados del extracto diafiltrado antes y después del proceso de secado para evaluar el efecto sobre las antocianinas. *Los resultados de antocianinas están expresados como mg cianidina 3-rutinósido/100 g extracto en base seca.

Cuadro A2. Media, desviación estándar, grados de libertad y valor de t producto de la comparación de medias entre los extractos ultrafiltrados y diafiltrados.

Variable	Media	Desv. Estándar	GL	t		p
				Observado	Crítico	
fructosa diafiltrado	15,667	1,155		-3,889	2,776	0,018
fructosa ultrafiltrado	19,333	1,155	4			
glucosa diafiltrado	12,000	3,606		-0,926	2,776	0,407
glucosa ultrafiltrado	14,000	1,000	4			
sacarosa diafiltrado	14,333	1,528		-0,632	2,776	0,561
sacarosa ultrafiltrado	15,000	1,000	4			
antocianinas diafiltrado	186,000	2,000		8,478	2,776	0,001
antocianinas ultrafiltrado	147,667	7,572	4			
humedad diafiltrado	96,493	0,117		14,223	2,776	0,000
humedad ultrafiltrado	95,037	0,133	4			
acidez diafiltrado	1,090	0,072		-6,459	2,776	0,003
acidez ultrafiltrado	1,533	0,095	4			

Cuadro A3. Media, desviación estándar, grados de libertad y valor de t producto de la comparación de medias entre los polvos de extractos previamente ultrafiltrados y diafiltrados.

Variable	Media	Desv. típica	GL	t		p
				Observado	Crítico	
rendimiento diafiltrado	9,667	0,404	4	3,738	2,776	0,020
rendimiento ultrafiltrado	8,433	0,404				
densidad bulk diafiltrado	0,380	0,031	4	-1,608	2,776	0,183
densidad bulk ultrafiltrado	0,409	0,005				
antocianinas diafiltrado	183,983	9,472	4	6,806	2,776	0,002
antocianinas ultrafiltrado	143,321	4,168				
humedad diafiltrado	1,587	0,239	4	-3,287	2,776	0,030
humedad ultrafiltrado	2,131	0,158				
h° diafiltrado	12,739	0,535	4	-0,506	2,776	0,639
h° ultrafiltrado	13,136	1,247				
c diafiltrado	19,300	0,377	4	-6,454	2,776	0,003
c ultrafiltrado	21,624	0,497				

Cuadro A 4. Probabilidades de cometer el error tipo I, potencia y número de muestra para las variables respuesta que no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) en los procesos de membranas y de secado.

Proceso	Variable respuesta	Probabilidad	Potencia	Número de muestra *
UF vrs DF	Glucosa	0,407	0,105	17
UF vrs DF	Sacarosa	0,561	0,063	48
Polvo UF vrs Polvo DF	Densidad "Bulk"	0,183	0,188	7
Polvo UF vrs Polvo DF	h	0,639	0,062	77
UF vrs Polvo	Cianidina 3-rutinósido	0,442	0,082	26
DF vrs Polvo	Cianidina 3-rutinósido	0,731	0,066	120

*Para determinar el número de muestra se usó una potencia de 80%.

Cuadro A5. Media, desviación estándar, grados de libertad y valor de t producto de la comparación de medias entre el contenido de cianidina 3-rutinósido de los extractos ultrafiltrados y diafiltrados y sus respectivos productos secos.

Variable	Media	Desv. típica	GL	T (observado)
SECO	143,333	4,509	4	-0,852
UF	147,667	7,572		
SECO	186,00	9,165	4	0,369
DF	184,00	2,00		

Cuadro A6. Gráficos de residuos de las variables respuesta empleadas en la optimización del secado de un extracto de broza de café.

Variable	Gráfico de residuos	Normalidad de los residuos
Rendimiento		
Densidad "Bulk"		
h^0		
Cianidina 3-rutinósido		

Cuadro A7. Probabilidad de los coeficientes de regresión para los modelos reducidos generados en la superficie de respuesta para las diferentes variables respuesta.

Variable respuesta	p de los coeficientes de regresión							
	<i>intercepto</i>	<i>Temp</i>	<i>Conc</i>	<i>flujo</i>	<i>Temp²</i>	<i>Conc²</i>	<i>Flujo</i>	<i>Temp* conc</i>
Rendimiento	0,008	0,016	0,022	0,00	0,069	0,031	0,00	<0,001
				2			3	
Densidad “bulk”	0,691	0,781	0,084	0,45	0,723	0,702	-	0,1794
				7				
Cianidina 3- rutinósido	0,052	0,033	0,547	-	-	0,114	-	0,076
h⁰	0,890	0,957	0,414	0,38	0,729	0,078	0,66	0,046
				8			9	

Cuadro A8. Análisis de varianza para el modelo generado mediante la aplicación de la superficie respuesta para la optimización del secado de un extracto de broza de café.

Variable	Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Densidad Bulk	Modelo	6	0,04027	0,00671	9,12	0,0032
	Error	8	0,00589	0,00073613		
	Falta de ajuste	6	0,00422	0,00070373	0,84	0,6314
	Error puro	2	0,00167	0,00083333		
	Total corregido	14	0,04616			
h°	Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
	Modelo	7	1982,19953	283,17136	4,48	0,0330
	Error	7	442,37997	63,19714		
	Falta de ajuste	5	442,37070	88,47414	19095,1	<,0001
	Error puro	2	0,00927	0,00463		
Total corregido	14	2424,57949				
Rendimiento	Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
	Modelo	7	101,10041	14,44292	32,59	<,0001
	Error	7	3,10235	0,44319		
	Falta de ajuste	5	2,94975	0,58995	7,73	0,1185
	Error puro	2	0,15260	0,07630		
Total corregido	14	104,20276				
Cianidina 3-Rutinósido	Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
	Modelo	4	21224	5306,11331	5,41	0,0140
	Error	10	9811,23592	981,12359		
	Falta de ajuste	4	1640,45295	410,11324	0,30	0,8673
	Error puro	6	8170,78297	1361,79716		
Total corregido	14	31036				

Cuadro A9. Análisis canónico de las diferentes variables respuesta empleadas para la optimización del secado de un extracto de broza de café.

Variable respuesta	Punto estacionario	Valores críticos		
		Temperatura (°C)	Concentración de maltodextrina (%)	Flujo (mL/min)
Rendimiento	Silla de montar	136,6	8,1	3,8
Densidad “Bulk”	Silla de montar	176,6	6,8	6,7
h°	Silla de montar	172	7,8	6,1
Cianidina 3-rutinósido	Silla de montar	146,4	7,0	4,0

Muestra de Cálculo

Para la determinación de la materia seca proveniente del extracto de las muestras en polvo después del secado por atomización:

- 1) En primer lugar se determinó la materia seca del extracto, de la maltodextrina y del polvo después del secado.
- 2) Luego se realizó un balance de masa para conocer la materia seca teórica del polvo

$$m_e(1 - f_{He}) + m_{mal}(1 - f_{Hmal}) = m_{polvo\ teórica}$$

Donde:

Me: masa del extracto adicionado al secador.

fHe: fracción de humedad del extracto.

Mmal: masa de maltodextrina agregada al secador.

fHmal: fracción de humedad de la maltodextrina.

Ms: materia seca del polvo teórica.

- 3) Después se determinó la materia seca experimental (esta difiere de la teórica debido a las pérdidas que se dan dentro del secador).

$$m_{polvo}(1 - f_{Hpolvo}) = m_s\ polvo\ experimental$$

Donde:

Mp: masa de polvo obtenida del secador.

fHe: fracción de humedad del polvo.

Ms: materia seca del polvo experimental.

- 4) Luego se realizó una relación, para conocer cuánto de la materia seca del polvo experimental corresponde a materia seca del extracto.

$$\frac{ms\ extracto\ t}{ms\ polvo\ t} = \frac{ms\ extracto\ exp}{ms\ polvo\ exp}$$

Donde:

Ms extracto t: masa seca del extracto teórico ($me(1 - fHe)$).

Ms polvo t: materia seca del polvo teórico (obtenida de punto 2).

Ms extracto exp: materia seca del extracto experimental (presente en el polvo).

Ms polvo exp: materia seca del polvo experimental.

- 5) Luego se determinó cuanta materia seca de extracto habría en 100g de polvo.

$$\frac{ms\ extracto\ exp}{m\ polvo\ exp} = \frac{ms\ extracto}{100g\ polvo}$$

Donde:

Ms extracto exp: materia seca del extracto experimental (obtenida en el punto 4).

Ms polvo exp: materia seca del polvo experimental.

Ms: materia seca del extracto.

- 6) Seguidamente se determinó el contenido de antocianinas (en base seca) presentes en una en 100g de extracto.

$$\frac{mg\ cianidin - 3 - rutinósido}{ms\ extracto} = \frac{mg\ ciadidin - 3 - rutinósido}{100g\ extracto}$$

Donde:

Ms de extracto: es la materia seca del extracto presente en 100g de polvo (obtenida en el punto 5).

De esta forma se obtiene el contenido de ciadinina 3-rutinósido presente en 100g de extracto, de manera que se puede comparar con el contenido de antocianinas (en base seca) antes del secado.