



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**

“APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS Y SU EFECTO SOBRE LOS FACTORES ANTINUTRICIONALES PRESENTES EN LA SEMILLA DE MANGO (*Mangifera indica* L.)”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en
Ciencia y Tecnología de alimentos

PRESENTA

L. en A. Paulina Elizabeth Velázquez Jiménez

DIRIGIDA POR

Dra. Silvia L. Amaya Llano

Santiago de Querétaro, Querétaro, Diciembre de 2014.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS Y SU EFECTO SOBRE LOS
FACTORES ANTINUTRICIONALES PRESENTES EN LA SEMILLA DE MANGO
(*Mangifera indica* L.)”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

L. en A. Paulina Elizabeth Velázquez Jiménez

DIRIGIDA POR

Dra. Silvia L. Amaya Llano

Dra. Silvia L. Amaya Llano
Presidente

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Secretario

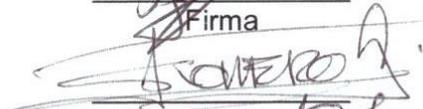
Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

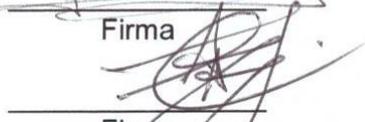
Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Suplente

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Suplente

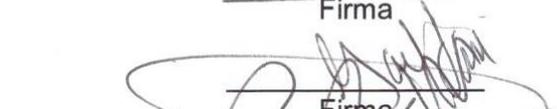
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la facultad

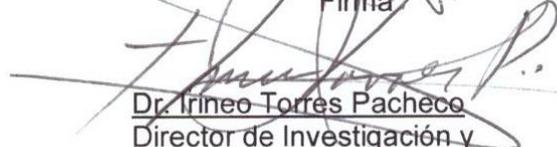

Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2014
México

*Queda prohibido llorar sin aprender,
levantarte un día sin saber qué hacer,
tener miedo a tus recuerdos.*

*Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños.*

*Queda prohibido no hacer las cosas por ti mismo,
no creer en Dios y hacer tu destino,
tener miedo a la vida y a sus compromisos,
no vivir cada día como si fuera un último suspiro.*

Pablo Neruda

RESUMEN

En los últimos años, la demanda de frutos tropicales ha ido en aumento. El mango (*Mangifera indica* L), es la principal variedad de frutas tropicales que se produce en todo el mundo. Su industrialización significa la producción de una gran cantidad de agroresiduos que son dispuestos al aire libre en vertederos o minimamente aprovechados en la alimentación animal, representando un serio problema ambiental. Múltiples investigaciones han demostrado que las semillas de mango son una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados, almidón, proteínas, aminoácidos, antioxidantes y compuestos antimicrobianos, entre otros. Estos beneficios se ven afectados por la presencia de factores antinutricionales (FANs) que generan daños al organismo cuando son consumidos. En el presente trabajo se aplicaron tecnologías alternativas (fermentación en medio sólido y fluidos supercríticos) para el tratamiento de la harina producida con la semilla de mango en la reducción de los FANs para facilitar la generación de un producto con altas posibilidades de ser empleada como ingrediente o suplemento en la industria de alimentos, siendo una fuente de nutrientes. La fermentación en medio sólido con *A. niger* resultó la tecnología que presenta una reducción significativa sobre los FANs estudiados (taninos, fitatos, oxalatos), hasta casi un 60% en algunos casos, la combinación de 30°C por 72 horas fue la condición que logró dichas disminuciones. Sin embargo para el contenido de HCN ocurrió el efecto contrario, habiendo un ascenso. El aumento del contenido proteico (15%) por la fermentación generó un producto de mayor nivel nutricional. Las concentraciones finales de cada componente antinutricional en la harina fermentada la hacen parcialmente segura para su uso en la alimentación humana, sin embargo es necesario la aplicación de métodos complementarios a fin de mejorar la seguridad de consumo, sobre todo en el contenido de ácido cianhídrico. La harina fermentada puede ser usada en productos como galletas, pasta, pan incluso como suplemento de proteínas en productos que involucran mezcla de cereales. El uso de fluidos supercríticos (CO₂) para la detoxificación presentó pocas ventajas de reducción (30%) con respecto a métodos tradicionales por lo cual son necesarios mayores estudios con este método.

Palabras clave: (mango, agro-residuos, aprovechamiento, factores antinutricionales, fermentación en medio sólido, fluidos supercríticos)

ABSTRACT

In recent years, demand of tropical fruits has been increased. Mango (*Mangifera indica* L.) is the most produced tropical fruit worldwide. Mango industrialization means production of large amount of agro-wastes that are simply dumped or are minimally used as animal feed, representing a seriously environmental problem. Several works have demonstrated that mango seed kernels are good source of polyunsaturated fatty acids, starch, proteins, amino acids, antioxidants and antimicrobial compounds, among others. These benefits have been hampered by the presence of anti-nutritional factors (ANFs) which generate damage to the organism when are consumed. In this work, alternatives technologies (solid state fermentation and supercritical fluids) were applied for the treatment of flour produced using mango seed kernel on reduction of ANFs to generate a product with high possibilities to be employed as ingredient or supplement in the food industry, being a source of nutrients. Solid state fermentation with *A. niger* was the technology which present a statistically significant decrease ($p < 0.05$) over ANFs studied (tannins, phytates, oxalates) until 60% in some cases. The combination of 30°C and 72 hours was the condition that allowed reduction. In contrary, an increase occurred in content of HCN. Protein content increase (15%) by fermentation, created a product with high nutritional level. The final concentrations of each antinutritional compounds in the fermented flour, make it partially safe for the human consumption use. However, complementary methods to enhanced security consumption are needed, especially in the hydrocyanic content. Ferment flour can be used in product like biscuit, pasta, bread even as a protein supplement in mix cereals products. The use of supercritical fluids (CO₂) for the detoxification presented few reductions advantages (30%) compared with traditional methods. Major research using this method is needed.

Keywords: (mango, agro-wastes, antinutritional factors, solid state fermentation, supercritical fluids)

Dedicatoria

A mi familia, quienes siempre están a mi lado para hacerme más fuerte ante la vida, en especial a mi madre a quien debo lo que soy.

Para Ustedes!!

Agradecimientos

Gracias,

A cada una de las personas que de manera directa o indirecta colaboraron para la culminación de este trabajo y de esta etapa profesional y personal. Que a través de su guía, consejos, ayuda, paciencia y amistad lograron hacer más fácil este proceso. De cada uno de ellos me llevo grandes enseñanzas y sobre todo buenos recuerdos. Mi más grande admiración para cada uno de ustedes.

A los amistades que se crearon a lo largo de estos años, su apoyo, cariño, comprensión y risas hicieron de esta aventura algo increíble, contarán conmigo siempre.

A mi familia, porque sin ellos todo esto jamás hubiera sido posible. Por su amor y palabras de aliento cuando mas las necesitaba. No bastará este “Gracias” para expresar mi verdadera gratitud hacia ustedes. Los amo.

A mi madre, quién con todo lo que es, es mi más grande ejemplo a seguir en la vida, a quién nunca podré terminar de agradecer todo lo que tengo y soy. Sin tú fortaleza no hubiera podido finalizar este ciclo de vida. Te amo mucho.

A Cervantes, por ese temple tuyo que me ayudó a no claudicar. Por esa alma tan noble que seguirá siendo mi gran apoyo.

Y a ti, mi Dios, porque me conoces tan bien que me brindaste la oportunidad de salir adelante, de hacerme valiente y fuerte, y sobre todo humilde. Sin tí definitivamente no lo hubiera logrado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Generalidades del mango.....	2
2.2 Importancia económica.....	3
2.2.1 Mundial.....	3
2.2.2 Nacional.....	4
2.3 Industrialización de mango.....	5
2.4 Subproductos generados por el procesamiento de mango.....	7
2.4.1 Composición y propiedades de los subproductos de mango.....	8
2.5 Factores antinutricionales.....	12
2.5.1 Principales FANs estudiados.....	14
2.6 Fermentación en estado sólido (FES).....	19
2.6.1 Criterios y especificaciones de la fermentación en medio sólido.....	20
2.6.2 Variables que condicionan los cultivos en estado sólido.....	22
2.6.3 Aplicaciones de la fermentación en estado sólido.....	24
2.7 Fluidos supercríticos (FSC).....	25
2.7.1 Proceso de extracción supercrítica.....	28
2.7.2 Aplicaciones a escala industrial.....	30
III. JUSTIFICACIÓN.....	32
IV. OBJETIVOS.....	33

4.1 General	33
4.2 Específicos.....	33
V. METODOLOGÍA.....	34
5.1 Materiales	34
5.1.1 Materia prima	34
5.1.2 Reactivos	34
5.2 Métodos	34
5.2.1 Preparación de harina de la semilla de mango (HSM).....	34
5.2.2 Evaluación de la harina obtenida.....	34
5.2.2.1 Composición química	34
5.2.3 Fermentación Fúngica.....	35
5.2.3.1 Microorganismo	35
5.2.3.2 Medio de cultivo	35
5.2.3.3 Soporte sólido	36
5.2.3.4 Condiciones de cultivo.....	36
5.2.3.5 Tratamiento de muestras.....	37
5.2.4 Extracción con CO ₂ supercrítico de la harina de semilla de mango.....	37
5.2.5 Determinación de factores antinutricionales	38
5.2.5.1 Taninos	38
5.2.5.2 Fitatos	39
5.2.5.3 Oxalatos	40
5.2.5.4 Ácido cianhídrico (HCN)	41
5.2.6 Determinación de proteína	42
5.3 Diseño experimental y análisis estadístico	42
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Caracterización química de la harina de semilla de mango	43

6.2 Efecto de la fermentación en estado sólido sobre los factores antinutricionales y contenido proteico de la harina de semilla de mango.....	45
6.2.1 Taninos	45
6.2.2 Fitatos	48
6.2.3 Oxalatos	51
6.2.4 Ácido cianhídrico	54
6.2.5 Contenido de proteína	56
6.3 Efecto de los fluidos supercríticos sobre los factores antinutricionales de la harina de semilla de mango	60
6.3.1 Taninos	61
6.3.2 Fitatos	63
6.3.3 Oxalatos	64
6.2.4 Ácido cianhídrico	66
VII. CONCLUSIONES	70
VIII. LITERATURA CITADA	72
IX. ANEXOS.....	92

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Análisis proximal a semilla y cáscara de mango	9
2	FANs clasificados teniendo en cuenta el tipo de metabolito con el que interactúan	13
3	Sustratos usados en la fermentación en estado sólido	19
4	Principales grupos de microorganismo involucrados en la fermentación en estado sólido	21
5	Aplicaciones de FES en diversos sectores económicos	24
6	Densidad, viscosidad y difusividad de diferentes fluidos	26
7	Solubilidad de ingredientes botánicos en CO ₂ -supercrítico	28
8	Composición del medio de cultivo Pontercorvo	36
9	Composición química de la harina de semilla de mango	43
10	Factores antinutricionales contenidos en la harina de semilla de mango	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales países productores de mango	4
2	Principales estados productores de mango en México	5
3	Transformación del mango	6
4	Estructura química de los factores antinutricionales estudiados	18
5	Diagrama de fases sólido/líquido/gas	26
6	Esquema básico de un extractor de fluidos supercríticos	29
7	Inoculación de harina de semilla de mango	37
8	Equipo de fluidos supercríticos	38
9	Efecto de la fermentación en estado sólido sobre el contenido de taninos totales solubles y taninos condensados de la harina de semilla de mango (HSM)	47
10	Comportamiento del contenido de fitatos de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido	48
11	Comportamiento del contenido de oxalatos de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido	53
12	Comportamiento del contenido de ácido cianhídrico de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido	56

13	Contenido de proteína de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido empleando <i>A.niger</i>	58
14	Efecto de fluidos supercríticos (CO ₂) sobre el contenido de taninos totales solubles y taninos condensados de la harina de semilla de mango (HSM)	61
15	Efecto de fluidos supercríticos (CO ₂) sobre el contenido de fitatos de la harina de semilla de mango (HSM)	63
16	Efecto de fluidos supercríticos (CO ₂) sobre el contenido de oxalatos de la harina de semilla de mango (HSM)	66
17	Efecto de fluidos supercríticos (CO ₂) sobre el contenido ácido cianhídrico de la harina de semilla de mango (HSM)	67
18	Crecimiento de <i>A.niger</i> sobre HSM con respecto a temperatura y tiempo de fermentación	99
19	Análisis térmico de la HSM sometida a fermentación sólida a 30°C	101
20	Análisis térmico de la HSM sometida a fermentación sólida a 40°C	102
21	Análisis térmico de HSM sin tratamiento y sometida a fluidos supercríticos (CO ₂ , 150 Bar-70°C)	103

I. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria y agrícola producen grandes volúmenes de desechos al año alrededor del mundo, causando graves dificultades en la eliminación de residuos, el problema se acrecenta sobre todo en países donde gran parte de la economía esta basada en la agricultura y las prácticas agrícolas son intensivas. Estos subproductos por lo general tienen como destino final la incineración o el vertido a depósitos de basura, generando serios problemas ambientales debido a su alta demanda química y bioquímica de oxígeno, a su fácil fermentación y a la presencia de fauna nociva, es por ello que la industria esta cada vez más forzada a encontrar un uso alternativo para su materia residual.

Uno de los agroresiduos que actualmente genera este tipo de inconvenientes son los provenientes de mango (*Mangifera indica* L.) que involucran la cáscara y semilla. Este fruto tropical es conocido por ser el tercer cultivo producido a nivel mundial y generador de una gran cantidad de residuos (estos representan el 20-25% del peso total del fruto) , diversos estudios han demostrado que los agroresiduos son una fuente rica de enzimas como proteasas, peroxidasas, polifenoloxidasas, carotenoides, vitaminas C y E e incluso de grasas comestibles, antioxidantes naturales, almidón, fibra dietaria, proteínas y aminoácidos esenciales , entre otros. Sin embargo la presencia de factores antinutricionales reduce su uso como una fuente alimenticia y de nutrientes, quedando limitada al simple desecho.

Es importante valorar este tipo de agroresiduos obtenidos del procesamiento industrial para poder promover el desarrollo de nuevos productos a través de las ventajas que representan sus componentes. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue la aplicación de procesos biosustentables que permitan la detoxificación de la harina producida con la semilla de mango conservando las ventajas nutricionales que ésta presenta para ser usada dentro de la dieta humana.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del mango

El mango es nativo del noroeste de la India, de las laderas del Himalaya. Hoy en día se cultiva ampliamente en todos los trópicos y subtrópicos del mundo. Los españoles introdujeron este cultivo a sus colonias tropicales del continente americano, por el tráfico entre las Filipinas y la costa oeste de México durante los siglos XV y XVI. Es considerado el fruto más antiguo cultivado por el hombre (Tharanathan *et al.*, 2006; Galán, 2009; CEMANGO, 2010;).

El mango (*Mangífera indica* L.) es el miembro más importante de la familia *Anacardiaceae* la cual posee 73 géneros, *Mangifera* es uno de ellos al cual se le han reconocido alrededor de 69 especies de las cuales solo 15 de ellas producen frutos comestibles, la especie *Indica* es la más común (Prieto *et al.*, 2005; Galán, 2009).

El mango típico constituye un árbol de tamaño mediano, de 10-30 m de altura. El tronco es más o menos recto, cilíndrico, de 75-100 cm de diámetro, cuya corteza de color gris - café tiene grietas longitudinales o surcos reticulados poco profundos. La copa es densa y ampliamente oval o globular. Los frutos clasificados como drupas varían en forma: redonda, oval u ovoide-oblongada, así como en tamaño y color en dependencia de la variedad. Los mangos pueden ser verdosos, amarillo-verdosos, amarillos, rojos, naranjas o púrpuras. El peso va desde unos pocos gramos hasta kilos (2.3 kg). La cáscara, lisa y correosa, rodea a la parte comestible, de color amarillo pálido a naranja oscuro. Los frutos poseen una sola semilla ovoide, oblonga, alargada, en forma de riñón recubierta por un endocarpo fibroso y por una membrana papirácea que posee una testa delgada café-oscuro. Aunque los frutos pueden madurar en los árboles, comercialmente se recolectan para su embarque cuando todavía están firmes. La media de la composición morfológica de las principales variedades comerciales de mango son de 56.39% de pulpa, 21.51% cáscara y 22.09% de semilla (Crane & Campbell, 1991; Prieto *et al.*, 2005; COVECA, 2011).

2.2 Importancia económica

2.2.1 Mundial

Se estima que el mango es el tercer fruto tropical a nivel mundial en cuanto a su producción e importación (después del plátano y la piña) y el quinto de todos los frutos que se comercializan alrededor del mundo. De acuerdo con estimaciones realizadas por la FAO, la producción mundial de fruta tropical (mango, piña, aguacate y papaya) alcanzará 82 millones de toneladas en 2014 representando un incremento anual del 1.7 % respecto al período base <2004>. El 90% de las frutas tropicales se producen en países en vías de desarrollo por lo que la producción de los mismos es de suma importancia para la generación de empleos, el aumento a la renta de los agricultores, a la seguridad alimentaria y a la reducción de los niveles de pobreza. Los principales países productores de mango son India, Tailandia y México, siendo este último uno de los mayores exportadores. La FAO estima que la cosecha de mango rondará los 28.8 millones de toneladas en el ejercicio 2014 representando el 35% de la producción mundial de frutas tropicales (FAOSTAT, 2011; FAO-Agronoticias, 2012).

Como productor de mango México se encuentra en el quinto lugar (Fig.1) generando 1.6 millones de toneladas (4.2% a nivel mundial), al mismo tiempo ocupa el segundo lugar como exportador (269 mil toneladas), abasteciendo más del 60% del mercado estadounidense, el principal importador de este fruto (SIAP-DISEMINA, 2012).

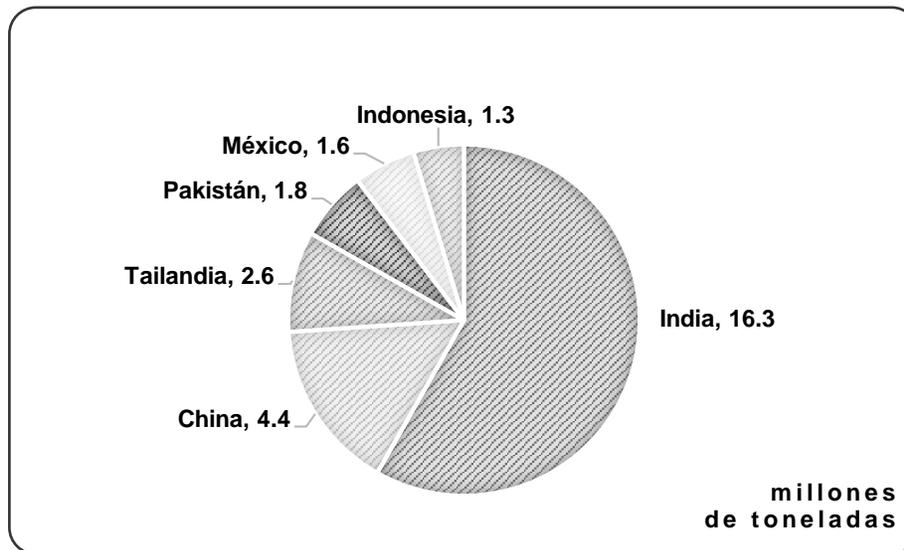


Figura 1. Principales países productores de mango (SIAP-DISEMINA, 2012)

2.2.2 Nacional

El mango se cultiva en 21 entidades, en un área de 180 mil hectáreas en donde Guerrero, Nayarit, Chiapas, Oaxaca, Sinaloa, Michoacán y Veracruz aportan en conjunto más de 1, 384, 000 toneladas (89% de la producción nacional). Actualmente, dentro de las 53 especies frutícolas que se cultivan en nuestro país, el mango ocupa el tercer lugar en superficie cosechada con el 16.5% del total nacional (detrás de la naranja y el plátano) y primer lugar durante los dos últimos años en lo que a productos frutícolas de exportación se refiere. El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), reportó una producción de mango de 1, 536,654.28 toneladas en 2011. Aproximadamente el 85.8% de la producción nacional se destina al consumo interno, mientras que el restante se destina a la exportación. La producción nacional de Mango en 2011 se concentró en los estados de Guerrero, Nayarit, Chiapas, Oaxaca, Sinaloa, Michoacán, Veracruz, Jalisco, Colima y Campeche (Fig.2) (SIAP, 2011).

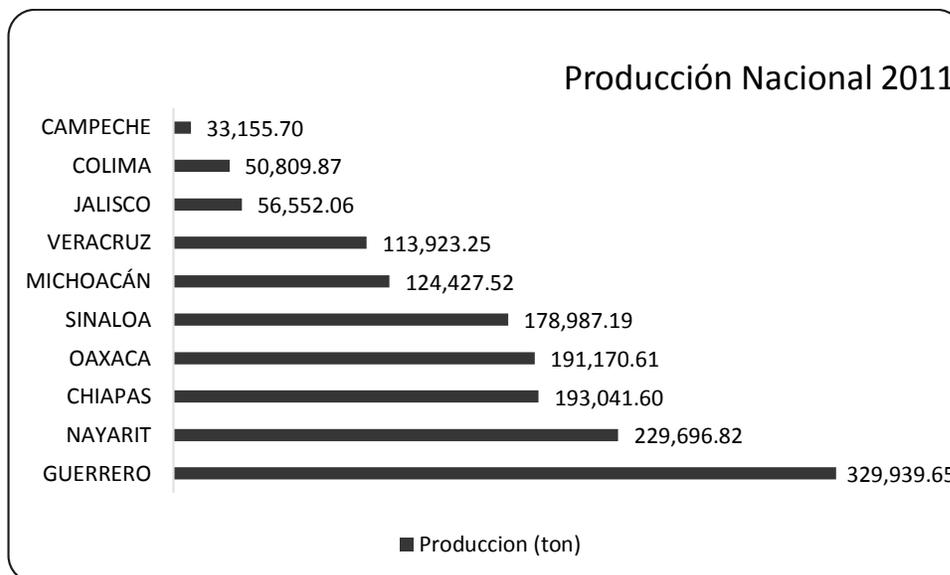


Figura 2. Principales estados productores de mango en México (SIAP, 2011)

2.3 Industrialización de mango

El mango es principalmente consumido en estado fresco y una alternativa de aprovechamiento debido a la producción es la industrialización, sin embargo es muy poca la cantidad de mango que se procesa en México y se limita a la elaboración de jugos, néctares y refrescos, en cantidades menores a mermeladas, jaleas, cubos congelados, conservas, helados, dulces y polvos de mango las cuales son consumidas en el mercado externo (SAGARPA-Sistema Producto Mango, 2013; Kittiphoom, 2012).

La Cadena Agroindustrial del Producto Mango en México está dirigida en dos terceras partes al sector primario como ventas en fresco y una tercera parte al sector secundario en la preparación o envasado de frutas, del cual el 80% se dirige a la producción de pulpas, jugos, y néctares (Fig.3) (INEGI, 2010).

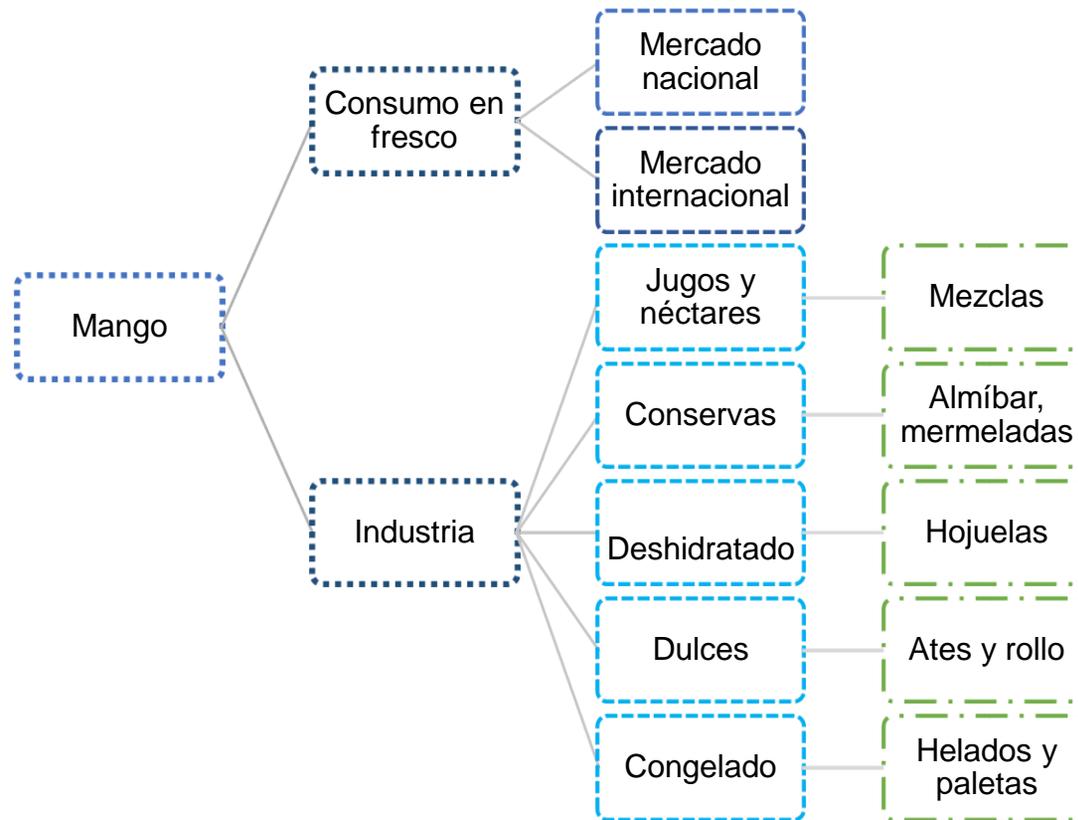


Figura 3. Transformación del mango (Elaboración propia en base a datos del Sistema Producto Mango)

El puré de mango es el producto más común obtenido a partir del fruto, puede ser usado en la preparación de gelatinas, bebidas (incluida el néctar) y varios productos lácteos o de panadería que contenga al mango como ingrediente. El mango es excelente para procesamiento como puré debido a su pulpa, buen sabor, olor y color aunque algunos cultivares son inadecuados para su consumo en fresco por ser fibrosos o suaves éstos son considerados viables para la industria del jugo de alta calidad. Actualmente se plantea la posibilidad de utilizar los desechos industriales para generar otros productos y generar con ello beneficios tanto al consumidor como al productor e industria (Bea *et al.*, 2005; Hui, 2007).

2.4 Subproductos generados por el procesamiento de mango

En el sector hortícola ha habido una creciente demanda en la producción agroindustrial para cumplir con la demanda alimentaria mundial. Esta intensidad de producción genera grandes cantidades de alimentos vegetales, estimándose alrededor de 800,000 toneladas/año de frutos frescos y vegetales. La utilización total de la producción hortícola es un requisito y a la vez una demanda que debe ser conocida alrededor del mundo para lograr implementar tecnologías que disminuyan los desechos agroindustriales producidos. En muchos casos el fruto no es consumido directamente, debido a que pasa por un procesamiento en donde se separa el producto de interés de las otras partes que lo constituyen, por lo que estas últimas son consideradas subproductos, ejemplo de este tipo de alimentos son la piña, papaya, taro y mango que son apreciados por su pulpa lo cual involucra una separación y remoción de la cáscara y semillas. En el caso del mango dependiendo de la variedad, el hueso (endocarpo) representa el 20 a 60% del peso total del fruto, la almendra o semilla comprende entre 45 a 75% del peso de todo el endocarpo y la cáscara representa el 7 a 24% del peso completo del fruto (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Heuzé *et al.*, 2013).

En nuestro país los subproductos agrícolas (cáscara, hueso, bagazo, frutas y vegetales dañados o con problemas de madurez y calidad) representan un

problema ambiental por su alta demanda química y bioquímica de oxígeno (53.28 g/L y 40.71 g/L, respectivamente) y al no contar con políticas adecuadas para su manejo son arrojadas a los depósitos de basura. Dichos subproductos son generados en grandes volúmenes y sólo una mínima parte es reutilizada en la producción de alimento animal de bajo valor agregado. En cada una de las etapas de la cadena productiva del mango se pueden generar mermas de esta fruta que se convertirán en desechos debido a las diversas problemáticas, por ejemplo; durante la producción existe la saturación del mercado por sobreproducción, problemas fitosanitarios y de calidad (Sumaya *et al.* 2012).

Un importante volumen de desechos se generan en las plantas procesadoras (deshidratadoras y despulpadoras) de mango; por ejemplo MexiFrutas S.A de C.V ubicada en Tepic, Nayarit procesa alrededor de 30, 000 toneladas de mango en un período de 4 meses durante el año, lo cual la hace la empresa despulpadora de mango más grande del estado. El procesamiento de esta empresa deja aproximadamente 60% de este fruto en forma de subproductos (semillas, cáscaras y pulpa adherida a éstos) el cual es subutilizado como fertilizante y alimento para animales. La disposición de los subproductos de mango es un problema creciente debido al aumento de la producción de este alimento (alrededor de 75,000 millones de toneladas a nivel mundial), desde la perspectiva ambiental es vital la reutilización de este tipo de biodesechos producidos por la agroindustria (Dorta *et al.*, 2012; Sumaya *et al.*, 2012).

2.4.1 Composición y propiedades de los subproductos de mango

Si bien la industria los considera como “desechos”, los subproductos obtenidos del mango representan una fuente importante de compuestos de interés alimentario y bioactivos; pectina de alta calidad, ciertos polifenoles y manguiferina se encuentran presentes en la cáscara, ácidos grasos poliinsaturados, almidón, compuestos de naturaleza fenólica con actividad antioxidante y antiinflamatoria en la semilla. Se ha reportado una importante actividad antimicrobiana en extractos de semilla de mango debido a la naturaleza de los compuestos polifenólicos que

contienen, incluso se ha señalado que las cáscaras de diferentes variedades de mango contienen fibra dietaria con un excelente equilibrio entre fibra soluble e insoluble por lo que puede ser un ingrediente en alimentos funcionales con actividad hipoglucemiante, hipocolesterolemica e hipotrigliceridemica (Ajila *et al.* 2007; 2013; Sumaya *et al.*,2012)

Omotubga *et al.* (2012) reportaron los análisis proximales realizados a semilla y cáscara de mango (Cuadro 1) destacando el contenido de fibra presente en los subproductos. Por otro lado García (2003) reportó que las cáscaras de mango criollo presentaron en promedio 4.8% de proteína cruda, 29% de fibra dietética soluble y 27% de fibra dietética insoluble, dicho balance entre los dos tipos de fibra son similar al de la avena.

Cuadro 1. Análisis proximal a semilla y cáscara de mango (Omotubga *et al.*, 2012)

Parámetros proximales	Cáscara (%)	Semilla (%)
Humedad	9.96	9.89
Cenizas	3.88	2.58
Lípidos	4.80	11.55
Proteína	4.32	6.02
Fibra cruda	16.50	10.60
Carbohidratos	57.92	59.34

De igual manera se ha reportado una importante concentración de polifenoles y compuestos antioxidantes en la cáscara de mango (flavonoles O- y xantonas C-glicósidos, galotaninos y derivados de benzofenona), así también es una buena fuente de compuestos bioactivos y enzimas como proteasas, peroxidases, polifenoloxidasas, carotenoides, vitamina C y E, fibra dietaria; en lo que respecta a muestras secas de semilla de mango se ha reportado un contenido entre 20.80-28.20% de carbohidratos y enzimas (Berardini *et al.*, 2005; Ajila *et al.*, 2008).

En la semilla de mango se encuentran altas cantidades de potasio, magnesio, fósforo, calcio y sodio (158, 22.34, 20, 10.21, 2.70 mg/100g respectivamente), siendo un buen aporte a la salud del consumidor puesto que el potasio se ve involucrado en la síntesis de aminoácidos y proteínas mientras que el calcio y magnesio juegan un rol significativo durante el metabolismo de carbohidratos y ácidos nucleicos. Compuestos fenólicos, taninos y flavonoides en dicho subproducto son los posibles responsables de las propiedades antimicrobianas que presenta y estarán en función del tipo de cultivar y estado de madurez que presente el fruto. Por otro lado las características del almidón presente en la semilla lo hacen una fuente alternativa para su obtención e inclusión en productos alimentarios, al mismo tiempo los lípidos contenidos son un buen sustituto de la manteca de cacao usado en los productos de confitería (Ayala-Zavala *et al.*, 2010; Kittiphoom, 2012; Hassan *et al.*, 2013).

Actualmente en la industria de transformados de frutas y vegetales los principales destinos de los residuos orgánicos generados en sus procesos son la alimentación animal o el desecho en vertederos, sin embargo, estos subproductos contienen sustancias como azúcares, ácidos orgánicos, colorantes, proteínas, aceites y vitaminas que pueden ser de interés en la industria alimentaria, farmacéutica, química o cosmética. Durante las últimas décadas han aumentado las investigaciones que permiten el aprovechamiento e industrialización de estos recursos; un claro ejemplo el uso de la cáscara de mango para la extracción de pectinas y enzimas así como la recuperación de fibra dietaria (FD) tomando la ventaja sobre sus características y propiedades fisicoquímicas para mejorar viscosidad, textura, atributos sensoriales entre otros, sin embargo la adición de este tipo de fibra a los alimentos debe ser cuidadosa para evitar cambios indeseables en las características organolépticas. La literatura científica tiene suficientes reportes acerca de la adición de fibra dietaria en productos como bebidas, confitería, productos lácteos, carnes, pastas, sopas, más común es la adición a productos de panadería para prolongar frescura gracias a su capacidad de retención de agua. Bajo esta perspectiva los subproductos provenientes de frutos exóticos pueden ser

tomados seriamente como fuentes importantes para la obtención de fibra dietaria y emplearla en la industria de alimentos y tener aplicaciones innovadoras en los productos (Ajila *et al.*, 2010; Elleuch *et al.*, 2011).

Los beneficios previamente citados que conllevan los subproductos de mango se ven disminuidos o bien son poco aprovechados debido a la presencia de compuestos que generan daño a la salud del consumidor y que en muchas ocasiones representan un serio inconveniente para su uso en el área de alimentos. Diversos estudios han demostrado que subproductos agroalimentarios como la semilla de aguacate, pulpa de café, semillas de papaya y la semilla de mango son fuentes potenciales de proteína y energía así como de compuestos funcionales para consumo humano o alimentación animal, sin embargo muchos de estos agroresiduos contienen cantidades importantes de anti nutrientes y componentes tóxicos como saponinas, lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina, ácido fítico (Ravindran & Sivakanesan, 1996; Zein *et al.*, 2005; Fowomola, 2010; Dakare *et al.*, 2012).

Arobg (1997) reportó que no hay efectos tóxicos adversos en la semilla de mango y que su uso como ingrediente alimentario tanto para humanos como para animales es seguro, sin embargo Dakare *et al.* (2012) identificaron en la semilla de mango cruda algunos componentes antinutricionales como taninos (0.409 %MS), oxalatos (1192.5 %MS), inhibidores de tripsina (27.5%MS), entre otros. Diarra (2014) identifica en mayor medida la presencia de taninos y glucosidos cianogénicos e indica que los oxalatos, saponinas, alcaloides se encuentran en cantidades traza. Estos factores pueden causar efectos adversos en la salud humana o animal, sin embargo pueden ser reducidos o eliminados ya sea por medio de remojo y temperatura, perdiendo con ello algunas propiedades fisicoquímicas y nutricionales aunque aumentando a su vez la digestibilidad de otras. Por todo lo anterior es importante su eliminación o reducción con el fin de poder aprovechar el potencial nutricional y nutracéutico de la semilla de mango. Estudios previos han demostrado que el uso de métodos como adición de hidróxido de calcio, calentamiento, remojo

y filtrado así como la aplicación de fermentación y tratamientos térmicos como la extrusión reducen significativamente los contenidos de dichos factores no nutritivos, sin embargo es de importancia considerar los tiempos de duración y temperatura aplicados para no perder los nutrientes de interés (Batista *et al.*, 2010, Dakare *et al.*, 2012, Ekundayo *et al.*, 2013).

2.5 Factores antinutricionales

El término antinutriente se utiliza para calificar a aquellos compuestos que afectan el valor nutricional de algunos alimentos, especialmente semillas, pues dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes que provienen de alimentos generalmente de origen vegetal (proteínas y minerales); su presencia no implica en general un problema de toxicidad aguda sin embargo dado que interfieren en la utilización y función de nutrientes esenciales, pueden ser consideradas como sustancias tóxicas naturales. Desde el punto de vista bioquímico estos factores son de naturaleza variada y pueden causar efectos fisiológicos poco deseables como flatulencia, distensión estomacal, afectaciones pancreáticas, aglutinación de glóbulos rojos, disminución en la asimilación de nutrientes, etc. Los factores antinutricionales (FAN) son sustancias naturales no fibrosas, generadas por el metabolismo secundario de las plantas como mecanismo de defensa a condiciones de crecimiento adversas o contra el ataque de herbívoros, mohos, bacterias, insectos y aves (Duffus & Slaughter, 1985; Abreu, 1995; D'Mello, 2005).

Así pues la denominación de “antinutricional” , dada a estos compuestos, es adoptada a partir del enfoque que los ve como recursos alimenticios para animales y humanos y no de las funciones que cumplen en los tejidos de los vegetales que los contienen, muchos de estos compuestos pueden ser etiquetados como antinutrientes en la dieta humana debido a su presencia en los alimentos frescos y procesados. El estudio de los FAN es complicado por la presencia de más de un compuesto tóxico en una sola fuente de alimento. Los niveles de estas sustancias varían con la parte de la planta o semilla, la especie, el cultivo, la variedad, las condiciones de crecimiento, las estaciones del año, el tratamiento

postcosecha (secado o lavado) y la germinación. Los FANs incluyen aquellos compuestos químicos generados por las plantas que, inhiben la digestión al afectar la actividad catalítica de algunas enzimas, producen efectos tóxicos y pueden limitar la absorción de los alimentos. Esta acción antinutritiva puede tener lugar a nivel del tracto gastrointestinal, en los tejidos y en algunos casos incluso fuera del organismo, en el mismo alimento (Paterson, 1993; Liener, 1997; Delgado, 1998; Midjavila, 1998; De Dios-Elizalde *et al.*, 2009)

Por su elevada diversidad no todos se encuentran bien estudiados, aunque existen algunos grupos como polifenoles, glucósidos cianogénicos, alcaloides, saponinas, fitohemaglutininas, triterpenos, aminoácidos tóxicos y el ácido oxálico que son los más conocidos, los factores antinutricionales constituyen un grupo muy variado de compuestos de compleja clasificación, pues en su estructura pueden encontrarse funciones fenólicas, proteínas, anillos heterocíclicos de naturaleza variada y glicósidos, donde la gran heterogeneidad de funciones químicas dificulta la unificación de grupos (Cuadro 2) (Delgado, 1998; García, 2004).

Cuadro 2. FANs clasificados teniendo en cuenta el tipo de metabolito con que interactúan (Delgado, 1998)

Factor	Metabolito
Factores que afectan la digestión o la utilización de las proteínas	Inhibidores de proteasa Lectinas Saponinas Taninos
Factores que afectan la digestión o la utilización de los carbohidratos	Inhibidores de amilasa Taninos Factores de flatulencia
Factores que afectan el aprovechamiento de los minerales	Ácido fítico Ácido oxálico Glucosinatos Gosipol
Factores que inactivan las vitaminas o causan el incremento de sus requerimientos	Antivitaminas

Aunque su presencia en la mayoría de los casos no constituye un riesgo inmediato para la salud, no deben ser ignorados, especialmente en dietas desequilibradas, basadas fundamentalmente en un único alimento, como ocurre en los países subdesarrollados, o en casos de individuos malnutridos o con deficiencias (Febles, 1998)

2.5.1 Principales FANs estudiados

a) Taninos

Son compuestos polifenólicos de un amplio peso molecular (500-3000 D) que contienen suficientes grupos hidroxifenólicos que permiten la formación de enlaces estables con las proteínas, estos compuestos suelen dejar una sensación astrigente seca en la boca. Se dividen en hidrolizables y condensados. Los primeros contienen un núcleo central formado por glucosa y un grupo hidroxil, el cual está parcialmente o totalmente esterificado con ácido gálico o elagitaninos, los taninos condensados son más complejos que los hidrolizados, su estructura completa aún no está determinada, son los productos polimerizados de flavan-3-oles y flavan-3-4-dioles o la mezcla de los dos. Los taninos forman complejos con el almidón, enzimas digestivas (tripsinas y amilasas) y hierro causando una reducción en los valores nutricionales de los alimentos e incluso pueden causar reacciones de pardeamiento a través de la acción de polifenoloxidasas afectando la aceptabilidad del producto. La capacidad de ligar proteínas por los taninos se ha considerado como un elemento importante para predecir sus efectos en sistemas biológicos (Deshpande *et al.*,1986; Smithard, 2002).

La mayoría de los reportes que contemplan a los taninos por su efecto antinutricional son realizados sobre el ácido tánico u otro tanino hidrolizable, sin embargo estos últimos están presentes en cantidades traza en los alimentos de consumo habitual, por lo que los taninos condensados son mas relacionados a los efectos no deseables, éstos se encuentran dispersos en frutos, vegetales y en ciertos granos. Las variedades pigmentadas de cereales y leguminosas contienen del 2 al 4% de taninos condensados. Los seres humanos consumen alimentos que

contienen cantidades considerables de dichos compuestos (sidra, té, cacao, vino tinto) conteniendo en ocasiones 1 g/L de taninos. La ingesta de estos compuestos puede ser de hasta 400 mg/ día en la dieta humana. Los taninos han estado implicados en carcinogénesis, diversos estudios sugieren la posible correlación entre un consumo inusual de materiales vegetales ricos en taninos condensados (particularmente con sorgo de concentraciones elevadas de taninos y bebidas alcohólicas preparadas a partir de ellos, té, vino tinto) con una frecuencia inusual de cáncer de boca y esófago. El mayor efecto en la dieta es debido a su interacción con proteínas de la dieta (Deshpande *et al.* 1986; Chung *et al.* 1998).

b) Oxalatos

La sal formada del ácido oxálico es conocida como oxalato, por ejemplo el oxalato de calcio, el cual se encuentra distribuido ampliamente en las plantas. Los oxalatos están conformados por dos moléculas de carbono y cuatro de oxígeno con una carga de -2, que lo hace atractivo a moléculas con cargas +2, especialmente calcio y magnesio. Forman enlaces fuertes entre el ácido oxálico y diversos minerales como el calcio, magnesio, sodio y potasio, esta combinación química da como resultado la formación de sales de oxalato. Algunas sales como la de sodio y potasio son solubles mientras que las de calcio son insolubles. El oxalato de calcio insoluble tiene la tendencia a precipitar o solidificar en los riñones o en el tracto urinario, formando cristales de oxalato de calcio cuando los niveles son altos. Estos cristales juegan un rol en la formación de cálculos renales en el tracto urinario cuando son excretados en la orina. El oxalato como antinutriente bajo condiciones normales está separado por diferentes compartimentos, sin embargo cuando es procesado o digerido entra en contacto con los nutrientes del tracto gastrointestinal, cuando el ácido oxálico es liberado se une a otros nutrientes (minerales) dejándolos inaccesibles al cuerpo. Incluso pueden causar debilidad muscular y parálisis al igual que irritación en el tracto gastrointestinal (Holmes, 2002; Soetan & Oyewole, 2009; Fekadu & Ratta, 2014).

La ingestión de 4-5 g de oxalatos es considerada la dosis mínima capaz de causar la muerte a un adulto, diversos estudios han indicado que 10-15 g es la cantidad usual para causar decesos (Noonan & Savage, 1999).

c) Ácido cianhídrico

La formación de ácido cianhídrico (HCN por sus siglas en inglés) se debe a la presencia de glucósidos cianogénicos, por lo que es importante hacer mención de ellos. Los glucósidos cianogénicos pueden ser definidos químicamente como glucósidos α -hidroxinitrilos pertenecientes a los metabolitos secundarios de las plantas; son derivados de aminoácidos constituyentes de los vegetales. Todos los glucósidos conocidos tienen enlace β , generalmente con D-glucosa. Existen alrededor de 2650 especies de plantas que producen glucósidos cianogénicos y usualmente la enzima hidrolítica, las cuales se encuentran juntas solo cuando algún depredador genera ruptura celular, por lo que se genera un rompimiento hacia un azúcar y una cianihidrina que rápidamente se descompone a ácido cianhídrico (HCN) y un aldehído o cetona. El HCN se libera a partir de la interacción entre un glucósido cianogénico (no tóxico) y una enzima hidrolítica (β -glucosidasa), en un proceso conocido como cianogénesis. Los glucósidos, cianihidrininas y ácido cianhídrico son conocidos como cianógenos. Existen aproximadamente 25 glucósidos cianogénicos conocidos y encontrados en las partes consumibles de plantas tales como: amigdalina (almendras), durrina (sorgo), linamarina (yuca, habas), prunasina (hueso o semilla de la fruta), la toxicidad de los cianógenos de las plantas depende del potencial de concentración de ácido cianhídrico formado una vez liberado tras su consumo, si el cianógeno de la planta es eliminado inadecuadamente durante el procesamiento o preparación del alimento, puede quedar como remanente y seguir activo. La dosis letal para un adulto depende el peso corporal y estado nutricional llevándose entre 30-210 mg de HCN/Kg (Francisco & Pimenta, 2000; Food Estándar Australia New Zealand, 2004).

Este compuesto formado es considerado como factor antinutricional debido a su toxicidad, el HCN tiene la habilidad de ligarse a metales como Fe^{++} , Mn^{++} y

Cu⁺⁺ que son grupos funcionales para diversas enzimas inhibiendo procesos como la reducción de oxígeno en la cadena respiratoria, en la actividad de la catalasa, oxidasa. Se produce un incremento en la glucosa sanguínea y los niveles de ácido láctico, además de un decremento en la proporción de ATP/ADP indicando un cambio del metabolismo aeróbico a anaeróbico y puede llegar a inhibir la glucólisis (Francisco & Pimenta, 2000).

d) Ácido fítico

El ácido fítico, mioninositol hexakisfosfato (IP6) y sus sales derivadas constituyen la mayor reserva de fósforo y mioninositol de las semillas de cereales y leguminosas. Los fitatos son las sales del ácido fítico, se encuentra en las plantas, animales y suelo. Se acumulan en la semilla durante su crecimiento y maduración son considerados la principal forma de almacenamiento del fosfato y el inositol en las semillas y granos. Los fitatos están cargados negativamente por lo que su presencia en la dieta representa un impacto en la disponibilidad de minerales iónicos (divalentes y trivalentes) como Zn²⁺, Fe^{2+/3+}, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ y Cu²⁺ disminuyendo además su absorción intestinal. Así también estos compuestos interaccionan con residuos básicos de proteínas formando complejos, como proteínas-fitato y proteínas-fitato-mineral, por lo que se paralizan muchas reacciones enzimáticas a nivel digestivo. En regiones del mundo donde las proteínas provenientes de cereales son el mayor factor dentro de la dieta, la asociación de fitatos se vuelve una prioridad (Wyatt & Triana, 1994; Zhou & Erdman, 1995; Martínez *et al.* 2002).

Por las características previamente descritas es de suma importancia el uso de procesos que permitan la remoción parcial o total de dichos compuestos no nutricionales para poder hacer uso de las ventajas que presenta este sub-producto agroindustrial y generar con ello nuevas fuentes alimentarias para el consumo humano sin que represente riesgo para la salud. Los métodos tradicionales (remojo, cocción, filtrado, tostado) generan reducciones significativas sobre dichos metabolitos, sin embargo se generan importantes pérdidas de nutrientes. Cabe señalar que el uso de tecnologías alternativas que ayuden al tratamiento de los

factores antinutricionales y que permitan el aprovechamiento de otro tipo de componentes propios del material de estudio es parte de la propuesta que plantea ésta investigación, al aplicarse la fermentación en medio sólido y fluidos supercríticos como medios de detoxificación sobre la semilla de mango.

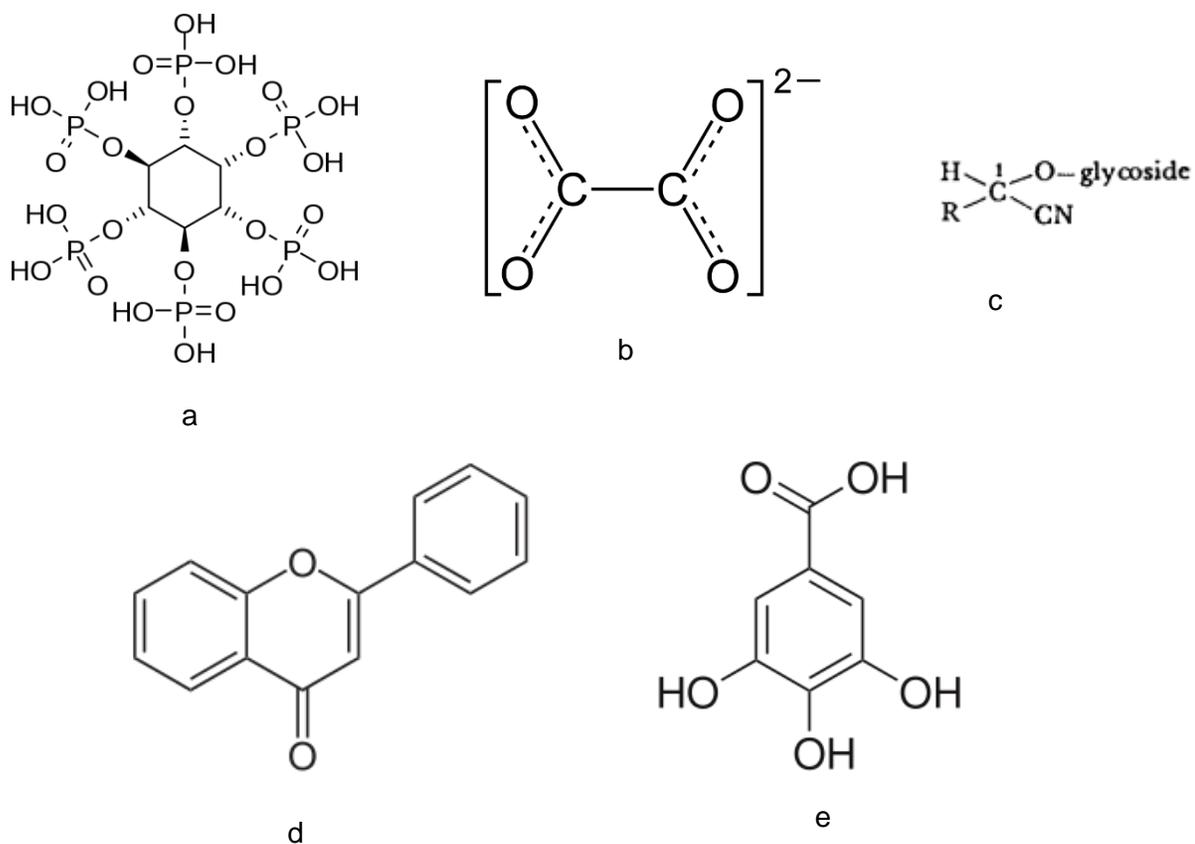


Figura 4. Estructura química de los factores antinutricionales estudiados; a) ácido fítico, b) oxalato, c) glucósido cianogénico con sustitución aromática, d) flavona (tanino condensado), e) ácido gálico (taninos hidrolizables) (King *et al.*, 1998; Noona & Savage, 1999; Vetter, 2000; Schlemmer *et al.*, 2009).

2.6 Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en estado sólido es caracterizada por el crecimiento de microorganismos sobre un material no soluble que actúa como un soporte físico y fuente de nutrientes, el cual tiene un bajo contenido de humedad (límite inferior ~12%) y ocurre en estado no aséptico y natural, en ausencia de agua libre. Las fermentaciones con estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua (Nigam & Singh, 1994; Pandey *et al.*, 1999).

La FES produce una alta concentración de producto con relativamente bajo requerimiento energético al emplearse fermentadores pequeños y microorganismos poco exigentes; por lo que este proceso ha sido explotado para la producción de alimentos, alimentos para animales, combustibles, enzimas, degradación de colorantes, ácidos orgánicos y antibióticos, entre otros. La FES puede ser llevada a cabo sobre una variedad de residuos agrícolas (Cuadro 3), tales como paja de trigo, cascarilla de arroz, tusa de maíz, bagazo de caña de azúcar, residuos de plátano, harina de yuca, cascarilla de trigo, paja de arroz (Mudgett *et al.*, 1992; Pandey *et al.*, 1999a; Robinson *et al.*, 2002).

Cuadro 3. Sustratos usados en la fermentación en estado sólido (Robinson *et al.*, 2002)

Producto	Microorganismo	Sustrato
Cefalosporina	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Cebada
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bagazo
Ácido giberélico	<i>Gibberlla fujikuroi</i>	Granos de trigo
Tetraciclinas	<i>Aspergillus</i>	Papa dulce

Al hacer una comparativa entre procesos fermentativos (líquida sumergida contra medio sólido), se pueden citar las ventajas que presenta la sólida; se logran obtener mejores rendimientos del compuesto de interés, se emplean medios de cultivo simples (subproductos agrícolas), la baja actividad de agua logra evitar contaminaciones de bacterias y levaduras, el proceso de recuperación es simple,

es posible utilizar los productos integralmente como alimento animal, productos para el control biológico, etc., es considerado como tecnología verde debido a los volúmenes de efluentes pequeños por lo que no generan contaminación, ya que se requiere poco volumen de disolventes para la extracción debido a la alta concentración del compuesto de interés (Sajo *et al.* 2011).

Sin embargo a pesar de las grandes ventajas que se presentan en medio sólido también se han reportado ciertas desventajas; la aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad, la extracción del calor metabólico representa un problema, sobre todo a gran escala y no hay control del proceso, debido a la naturaleza sólida del sustrato es difícil medir pH, temperatura, contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos, el tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento (Cannel & Moo-Young, 1980; Raimbault, 1998).

2.6.1 Criterios y especificaciones de la fermentación en medio sólido

a) Selección del microorganismo

No todos los microorganismos se encuentran capacitados para desarrollarse sobre un sustrato sólido. Las principales limitaciones son consecuencia de los requerimientos de actividad de agua de los diversos tipos de microorganismos y de su capacidad de anclaje y/o a la penetración en matrices más o menos porosas. En efecto de modo general las elevadas exigencias en cuanto a actividad de agua de las bacterias hace que prácticamente solo puedan crecer en una fase líquida. Las levaduras por el contrario, menos estrictas pueden ser utilizadas en fermentación en estado sólido. Algunos ejemplos de uso para cada categoría de microorganismo con respecto a la fermentación en estado sólido están listados en el cuadro 4, las bacterias se utilizan en la composta, ensilaje y algunos procesos alimentarios, mientras que las levaduras son empleadas para la producción de alcohol o de alimento animal (Pastrana, 1996).

Desde el punto de vista de la FES, los hongos filamentosos son los más importantes debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas. Presentan la facultad para utilizar mezclas de varios polisacáridos, poseen sistemas enzimáticos completos que les permiten utilizar indistintamente varias fuentes de carbono, tienen la capacidad de adherencia y penetración en las partículas del sustrato. Es claro que la estructura micelar de los hongos filamentosos les confiere en este sentido ventaja frente a otros microorganismos (Raimbult, 1998; Sajo *et al.* 2011).

Cuadro 4. Principales grupos de microorganismos involucrados en la fermentación en estado sólido (Sajo *et al.* 2011)

Microflora	Proceso FES
Bacteria	
<i>Clostridium sp.</i>	Ensilaje, alimentos
<i>Lactobacillus sp.</i>	Ensilaje, alimentos
<i>Streptococcus sp.</i>	Compostaje
<i>Pseudomonas sp.</i>	Compostaje
<i>Serratia sp.</i>	Compostaje
<i>Bacillus sp.</i>	Compostaje, amilasa
Hongos	
<i>Alternaria sp.</i>	Compostaje
<i>Penicillium notatum, roquefortii</i>	Penicilina, queso
<i>Pleorutus oestreatus, sajor-caju</i>	Champiñones
<i>Aspergillus niger</i>	Alimento animal, proteínas, ácido cítrico
<i>Trichoderma sp.</i>	Control biológico de compostaje, bioinsecticida
Levaduras	
<i>Endomicopsis burtonii</i>	Arroz, casava
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, amilasa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimentos, etanol

En este sentido, el hongo más empleado dentro de la fermentación en medio sólido es *Aspergillus niger*, el cual tiene un amplio uso dentro de la biotecnología, ha sido utilizado por décadas para la producción de productos extracelulares (enzimas), ácido cítrico, etc. Es considerado un microorganismo GRAS por la Food and Drug Administration, juega un papel importante en la biotransformación y el tratamiento de agroresiduos. *A. niger* se ha convertido en una fuente de diversas enzimas que son un auxiliar sobre el procesamiento de frutos, productos horneados y en la industria de almidón. Este microorganismo es un hongo filamentosos que crece aeróbicamente sobre materia orgánica. En la naturaleza es encontrado en el suelo, hojarasca, composta o en materiales vegetales en descomposición. Es capaz de crecer en un amplio rango de temperatura (6-47°C) con una temperatura óptima de 30-37°C. La actividad de agua es alrededor de 0.88, con un pH de crecimiento de 1.4-9.8 (Schuster *et al.* 2002).

b) Características del sustrato

En la mayor parte de las fermentaciones en estado sólido el soporte y el sustrato coinciden. Por ello es frecuente que la formulación de los medios de cultivo se base en materiales tales como granos de cereales (o alguna parte de ellos), semillas oleaginosas y residuos agrícolas o forestales. Con todo y dependiendo del producto de fermentación que se desee obtener, los sustratos deben ser insolubles en agua o en la solución de humectación para garantizar las condiciones del cultivo durante la fermentación, presentar un elevado contenido de carbohidratos y/o proteínas puesto que es la fuente de nutrientes del microorganismo, así como una adecuada estructura granular que posibilite la adhesión y penetración del mismo o en caso contrario facilidad de rotura para conseguir granulometrías adecuadas (Pastrana, 1996).

2.6.2 Variables que condicionan los cultivos en estado sólido

Al igual que en los cultivos sumergidos, una adecuada selección y control de las variables que influyen el proceso, condiciona el éxito de la fermentación en estado sólido:

1. Contenido de humedad del sustrato: El nivel adecuado es función de la naturaleza del sustrato, el tipo de producto final y los requerimientos del microorganismo. Se encuentra relacionado con la actividad de agua (A_w), los hongos filamentosos son los más adecuados en función de sus bajos requerimientos de A_w para desarrollarse sobre sistemas en estado sólido. Así un alto contenido de humedad del sustrato provoca en numerosas situaciones descensos de la porosidad y por consiguiente de la difusión del oxígeno, aumenta el riesgo de contaminación bacteriana, efectos que deben ser prevenidos en una FES (Viniegra *et al.* 2003; Pastrana, 1996).
2. Temperatura: Es frecuente que como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos, se produzca una elevación de la temperatura en los fermentadores, especialmente en las zonas internas del sustrato. Este incremento térmico afecta directamente al crecimiento, germinación de las esporas o a la formación del producto. Por ellos es conveniente dotar a los fermentadores de mecanismos que permitan disipar el calor, siendo los más frecuentes la circulación de aire en el interior del reactor, inmersión en baños de agua o su instalación en habitaciones de temperatura controlada. La temperatura además interacciona con otras variables como la actividad de agua, cuyos rangos óptimos para el crecimiento y la producción de metabolitos se ven modificados con las variaciones de la temperatura. Con el aumento de la temperatura se favorecen tres inconvenientes: la actividad microbiana se detiene o desacelera, se deshidrata el medio sólido y el metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación (Pastrana, 1996).
3. pH: Aunque al igual que los cultivos sumergidos el pH es uno de los factores críticos en un proceso de fermentación, en estado sólido su control se dificulta mucho, se puede ver afectado por la secreción de ácidos o algunos otros metabolitos durante el proceso. Sin embargo los sistemas FES pueden

poseer una relativa estabilidad frente al pH. Ello es debido a la elevada capacidad tampón de los sustratos usuales, por lo que mediante el ajuste inicial del pH del sustrato es posible eliminar la necesidad de su control (Viniestra *et al.* 2003; Pastrana, 1996).

2.6.3 Aplicaciones de la fermentación en estado sólido

La FES ofrece varias aplicaciones económicas de potencial significativo mejorando los requerimientos con una tecnología de bajo costo, diversos autores han realizado investigaciones que revelan las diferentes aplicaciones de la fermentación en estado sólido, la cual se asocia con la producción de alimentos fermentados tradicionales como “koji” o “ragi”. Por otro lado también ha sido usado para la producción de compuestos de valor agregado como enzimas, ácidos orgánicos, biopesticidas, biodiesel, colorantes y saborizantes, los cuales son de utilidad en las industrias alimenticia, química y farmacéutica (Cuadro 5). En los últimos años la FES ha tenido nuevas aplicaciones en la biorremediación y biodegradación de compuestos o en la detoxificación de residuos agroindustriales, la utilización de los residuos agroindustriales como sustratos en dicho proceso proporciona una alternativa de utilización a lo que parecía no tener alguna (Mitchell, 1992; Rodríguez & Sanromán, 2006; Sajo *et al.* 2011).

Cuadro 5. Aplicaciones de FES en diversos sectores económicos (Pérez *et al.* 2003).

Sector económico	Aplicación	Ejemplos
Fermentación industrial	Producción de enzimas	Amilasas, amiloglucosidasas, celulasas, proteasas, pectinasas, xylanases, glucoamilasas
	Productos bioactivos	Micotoxinas, giberelinas, alcaloides, antibióticos, hormonas

	Ácido orgánicos	Ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico
Industria agroalimentaria	Compuestos diversos	Pigmentos, biosurfactantes, vitaminas
	Biotransformación de residuos de cultivo	Alimentos tradicionales fermentados (Koji, sake, ragi), enriquecimiento de proteínas, producción de hongos comestibles
	Aditivos alimentarios	Compuestos aromáticos, colorantes, ácidos orgánicos y lípidos
Control ambiental	Biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos	Pesticidas, biofenil policlorados (PCBs)
	Detoxificación biológica de residuos agroindustriales	Pulpa de café, cascara de casava, cascara de café.

2.7 Fluidos supercríticos (FSC)

Se denomina fluido supercrítico a cualquier sustancia que es sometida a condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico. Sin embargo desde el punto de vista de extracción con fluidos supercríticos (EFS) una definición más específica es la de un gas pesado con poder de solvencia dependiente de la densidad y en el cual el estado líquido y gaseoso no se distinguen por lo que el poder solvente de un FSC es altamente dependiente de su temperatura y presión, considerándose un cuasi-estado (Cuadro 6) (Mendiola, 2008).

Cuadro 6. Densidad, viscosidad y difusividad de diferentes fluidos (Mendiola, 2008)

	Densidad (g/ml)	Viscosidad (g/cm*s)	Difusividad (cm ² /s)
Gas	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
Líquido	1	10 ⁻²	10 ⁻⁶
Fluido supercrítico	0.2-0.9	10 ⁻⁴	10 ⁻³

En un diagrama de fases clásico (Figura 5), las curvas de fusión, sublimación y vaporización muestran las zonas de coexistencia de dos fases. Se presenta un punto de coexistencia de tres estados, el llamado punto triple. El cambio de estado se asocia a un cambio brusco de densidad y para que se produzca es necesario un aporte extra de energía denominado entalpía de cambio de estado. Por encima del punto crítico este cambio de densidad no se produce por tanto se define a este punto como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar, por ende un fluido supercrítico es aquel que se encuentra por encima de dicho punto (Brunner, 2005; Velasco *et al.* 2007).

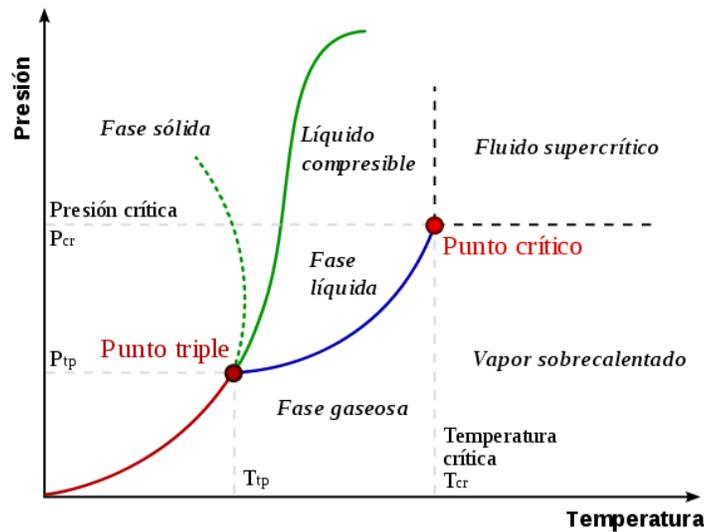


Figura 5. Diagrama de fases sólido/líquido/gas (Mendiola, 2008)

Como se mencionó anteriormente el estado de la sustancia es considerada supercrítica cuando la temperatura y la presión exceden los valores del punto crítico termodinámico. Este “fluido” toma propiedades de gas y líquido, debido a que los

dos estados desaparecen para formar una sola fase, es en esta región en donde la máxima capacidad disolvente y las grandes variaciones en las propiedades del solvente pueden ser alcanzadas aplicando pequeños cambios en la temperatura y presión. Esto ofrece atractivas características de extracción, debido a la favorable difusividad, viscosidad, tensión superficial y otras propiedades físicas. La difusividad del fluido supercrítico ha emplear es de mayor magnitud que otros líquidos, lo cual facilita la rápida transferencia de masa, la baja viscosidad y tensión superficial mejoran con facilidad la penetración de dicho fluido al material botánico del que se desea extraer el componente activo (Mukhopadhyay, 2000).

No todas las sustancias pueden ser empleadas para ser sometidas a condiciones supercríticas, por lo que debe cumplir con propiedades específicas que permitan su uso en la industria, especialmente la alimentaria (Palmer & Ting, 1995; Bruner, 2005; Mendiola, 2008) las cuales incluyen:

- Alta capacidad disolvente además de selectiva
- Nula o baja inflamabilidad
- Fácil de obtener en elevada pureza
- Bajo precio
- Baja o nula toxicidad
- No ser agresivo con el medio ambiente
- No corrosivo
- Condiciones críticas moderadas
- Gaseoso en condiciones de presión y temperatura ambiente

Múltiples estudios han demostrado que el CO₂ cumple con todas estas propiedades al ser inerte, de bajo costo, de fácil acceso, sin olor, sin sabor, amigable con el ambiente, reconocido por ser GRAS no deja residuos en el extracto, posterior al procesamiento bajo condiciones supercríticas este se vuelve gas en condiciones ambientales, además su punto crítico de temperatura cercano al ambiente (31.1°C) lo hace ideal para la extracción de productos termolábiles. Debido a su bajo calor latente de vaporización, la energía requerida es menor para realizar la separación

del extracto por lo que favorece las condiciones para que el compuesto de interés sea de un olor y sabor “más natural” (Mukhopadhyay, 2000).

Sin embargo el CO₂ tiene la limitante de su apolaridad que, en principio, restringe su poder solvente para sustancias polares (Cuadro 7). En este sentido la solubilidad y selectividad puede ser mejorada añadiendo co-solventes o modificadores en pequeñas cantidades ($\leq 10\%$) como el etanol o agua, que añadidas al CO₂ varían enormemente la polaridad del fluido extractante. Los modificadores no sólo sirven para aumentar la polaridad del CO₂ sino que se emplean con el objetivo de mejorar su capacidad solvente, por lo que también se emplean sustancias apolares. En general la extrahibilidad de los compuestos con CO₂-Supercrítico dependerá de la existencia de grupos funcionales individuales en los compuestos, del peso molecular y polaridad (Palmer & Ting, 1995; Mukhopadhyay, 2000; Beckman, 2004).

Cuadro 7. Solubilidad de ingredientes botánicos en CO₂-supercrítico (Moyler, 1993)

Muy solubles	Moderadamente solubles	Prácticamente insolubles
Compuestos apolares o poco polares de bajo peso molecular (<250g/mol), mono y sesquiterpenos, ácido acético, benzaldehído, hexano, glicerol o acetatos.	Compuestos de medio-alto peso molecular (<400g/mol), terpenos, agua, ácido oleico, lípidos saturados de longitud de cadena superior a c12.	Compuestos de pesos moleculares superiores a 400 g/mol, azúcares, proteínas, taninos, ceras, sales inorgánicas, clorofilas, plaguicidas.

2.7.1 Proceso de extracción supercrítica

Es importante comprender como funciona el sistema de extracción supercrítica para poder aprovechar las ventajas que ofrece (Figura 6). Este comienza con el CO₂ procedente de la botella (A) el cual es impulsado por la bomba (B), hasta la celda de extracción o carga (C), donde se encuentra la materia prima a extraer, ahí se alcanza la presión de trabajo la cual es controlada por la válvula

(D). La celda de extracción se encuentra termostata para poder operar en condición de temperatura controlada (superior a la T_c). Los componentes de la materia prima disueltos o arrastrados por el CO_2 precipitan en el separador (E) debido a la disminución del poder solvente del CO_2 al reducir la presión, en caso de que sea necesaria la adición de modificadores (F), estos suelen mezclarse con la corriente de dióxido de carbono a “baja presión” antes de la bomba de CO_2 (G). Dado que los alimentos suelen ser mezclas altamente complejas, es habitual que los extractos obtenidos también lo sean, por lo que se realiza el fraccionamiento de los mismos. El fraccionamiento en condiciones supercríticas consiste en una caída en cascada de la densidad con la consiguiente precipitación en gradiente de los compuestos extraídos, para poder realizar dicho fraccionamiento sería necesario añadir un segundo separador (H). Es posible la recirculación del CO_2 (I) (Mendiola, 2008)

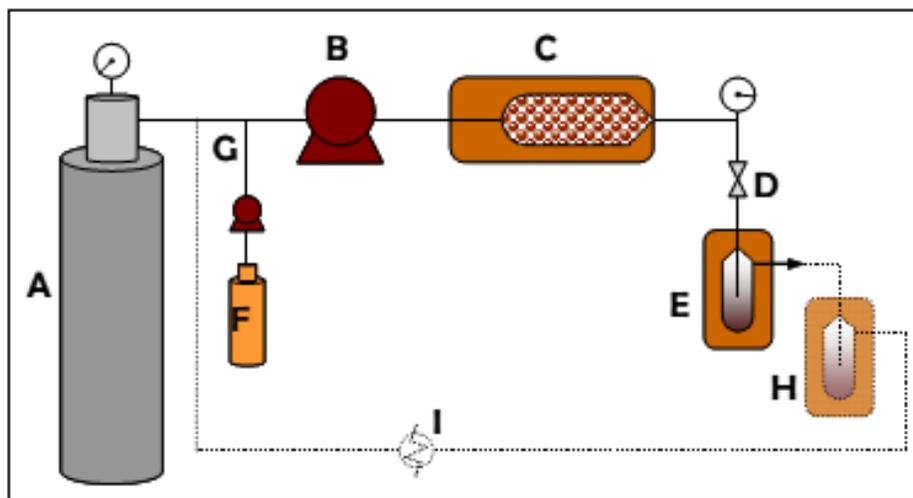


Figura 6. Esquema básico de un extractor de fluidos supercríticos (Mendiola, 2008)

Los procesos de extracción supercrítica se pueden realizar de manera discontinua o por cargas y continua o de flujo. En la primera se realiza en procesos de extracción sólido-fluido, en el cual el sólido es la materia prima para la extracción. El procesado de sólidos se puede realizar por cargas y descargas, sin posibilidad de flujo continuo. Este proceso se desarrolla en los extractores, donde se carga la materia prima y se introduce el fluido supercrítico en las condiciones de temperatura

y presión fijadas previamente, después de un tiempo de contacto se llega al equilibrio entre las fases y se abren las válvulas de salida y en el extractor queda la materia prima ya extraída, la mezcla del extracto deseado más el fluido supercrítico se conducen hacia el separador y mediante una descompensación se separan totalmente, ya que el fluido supercrítico pierde su poder disolvente. Por otro lado en la extracción continua o de flujo se realiza en procesos de extracción líquido-líquido, en el cual la materia prima que se ha de extraer está en fase líquida (Velasco *et al.* 2007).

2.7.2 Aplicaciones a escala industrial

Algunas aplicaciones comerciales de la extracción con FSC en la industria alimentaria incluyen el fraccionamiento y extracción de aceites y grasas, dirigida sobre todo hacia la obtención de aceites vegetales a partir de oleaginosas y la desacidificación de aceites con alto contenido de ácidos grasos. Por otro lado permite la extracción de antioxidantes naturales, donde se ha utilizado el CO₂ supercrítico para la obtención de tocoferoles a partir de soya y subproductos de aceite de oliva, la extracción de alcaloides, aromas y especias son aplicaciones clásicas de FSC particularmente sobre la descafeinación del café y recientemente sobre la extracción de compuestos responsables del sabor amargo y característico de la cerveza permitiendo conseguir un adecuado balance entre el aroma y el sabor en la cerveza. Como se observa el panorama de aplicación de los fluidos supercríticos como medio de extracción es muy prometedor, los subproductos que son obtenidos después de procesos industriales pueden aprovechar dicha tecnología con el fin de obtener productos de alto valor agregado, sin embargo aún faltan estudios que permitan optimizar su uso y con ello evitar problemas como por ejemplo la degradación térmica de ciertos compuestos durante la extracción (Bruner, 2005; Velasco *et al.*, 2007, Galanakis, 2012).

Se ha comprobado el efecto que tiene el empleo de este sistema para la separación de lípidos sobre los componentes restantes del material de extracción

dejando una concentración importante de almidón, proteínas y otros agregados en él, pudiendo ser utilizados para su posterior estudio y aplicación. Sin embargo poco se sabe del efecto que puede tener sobre los factores antinutricionales presentes en el material sólido usado para la extracción, por lo que esto podría generar una ventaja al obtener dos productos de valor agregado usando un solo sistema (Jahurul *et al.* 2014; Sibakov *et al.* 2011; Zaidul *et al.*, 2007)

III. JUSTIFICACIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los frutos tropicales más importantes en el mundo y durante su procesamiento genera grandes cantidades de subproductos tales como cáscaras y semillas que son considerados como un grave problema de eliminación y contaminación ambiental. La semilla de mango se caracteriza por presentar compuestos de importancia nutracéutica-nutricional y económica que no son totalmente aprovechadas debido a la presencia de factores antinutricionales que hacen que el empleo de este recurso se vea limitado por los problemas que pudiera generar su consumo al organismo humano, sin tratamiento alguno. El trabajo de investigación propuesto ofrece la aplicación de tecnologías alternativas como medio en la remoción de compuestos no nutritivos que permitan la generación de materia prima con altas posibilidades de ser empleada como ingrediente o suplemento en la industria de alimentos y conlleve su aprovechamiento como fuente de nutrientes.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Aprovechar la semilla de mango (*Mangifera indica* L.) para la obtención de harina de calidad nutricional que pueda ser usada en la industria empleando procesos tecnológicos alternativos (fermentación en medio sólido y fluidos supercríticos) que permitan la reducción o eliminación de factores antinutricionales presentes en ella.

4.2 Específicos

- Obtener harina a partir de la semilla de mango y determinar su composición química.
- Evaluar el efecto de la fermentación en estado sólido empleando *Aspergillus niger* sobre la reducción o eliminación de factores antinutricionales en la harina de semilla mango.
- Evaluar el efecto de CO₂ supercrítico sobre la reducción o eliminación de factores antinutricionales en la harina de semilla de mango.

V. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.1 Materia prima

Se recolectaron 13 kg de hueso (endocarpo) de mango Oro (*Mangifera indica* L.) desechados durante el procesado industrial de jugo.

5.1.2 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de harina de la semilla de mango (HSM)

Se realizó bajo la metodología descrita por Medina *et al.* (2010) con modificaciones; los huesos de mango fueron descascarados manualmente usando cuchillos de acero inoxidable mediante corte meridional del endocarpo para la separación de la semilla, éstas se cortaron en trozos pequeños menores a 1 cm³ y se colocaron en estufa de aire forzado (Binder F53, Alemania) a 40°C durante 28 horas, posteriormente fueron molidos en un procesador de alimentos doméstico (Osterizer 450-10, USA) y tamizados usando una malla #50 (0.297mm). La harina producida fue almacenada a temperatura ambiente en bolsas de polietileno para su posterior análisis.

5.2.2 Evaluación de la harina obtenida

5.2.2.1 Composición química

Se determinó la composición química de la harina de la semilla de mango de acuerdo a los métodos de la AOAC (2000) considerando humedad (14.004), cenizas (14.006), grasa total (31.4.02), fibra cruda (7.073) y proteína cruda

(microKjeldahl; 12.1.07) calculada como % nitrógeno multiplicado por el factor 6.25, mientras que carbohidratos fue calculado por diferencia.

5.2.3 Fermentación Fúngica

Se realizó bajo la metodología descrita por Martínez (2005), detallada en los siguientes puntos (5.2.3.1- 5.2.3.5):

5.2.3.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* N402, la propagación se realizó en matraces Erlenmeyer que contenían 25 mL de agar papa dextrosa (PDA) estéril a los cuales se les adicionó 0.3 g del hongo liofilizado, posterior se sometieron a incubación por 6 días a 30°C.

Transcurrido el tiempo de incubación se cosecharon las esporas agregando 25 mL de una solución estéril de Tween 20 al 0.1% (v/v) a cada matraz, posteriormente se homogenizó la suspensión mediante un agitador magnético estéril, se realizaron movimientos suaves para evitar romper el agar, una vez homogenizado se tomó 1 mL de la suspensión y se realizó una dilución 1:10 en matraz aforado de 25 mL con agua destilada para realizar el conteo de esporas. Las esporas se cuantificaron mediante una cámara de Neubauer.

5.2.3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue Pontecorvo, en el Cuadro 8 se muestra la composición y concentración del medio. Para preparar el medio de cultivo se disolvieron las sales (una por una) en 200 mL de agua destilada y finalmente los metales trazas. Se ajustó el pH a 5.5 para ser completado a un volumen final de 400 mL. A continuación se esterilizó (121°C por 20 minutos).

Cuadro 8. Composición del medio de cultivo Pontecorvo

Compuesto	g/l
NaNO ₃	20.4
KH ₂ PO ₄	18.7
KCl	5.4
MgSO ₄ -7H ₂ O	5.4
Metales traza	10 mL

5.2.3.3 Soporte sólido

Se utilizó la harina de la semilla de mango previamente preparada (ver 5.2.1)

5.2.3.4 Condiciones de cultivo

Para realizar las fermentaciones se emplearon bandejas de policarbonato de 2 ¼ de pulgada, en donde se colocaron 130 g de HSM estéril a la cual se le adicionó 128 mL del medio de cultivo Pontecorvo para proveer la humedad necesaria (50%) y 2 mL de la suspensión de esporas para obtener una concentración final de 2.7×10^7 de esporas/g de HSM, se realizó una completa homogenización procurando cubrir todo el material sólido con los componentes líquidos, a continuación se colocó una pequeña capa sobre la bandeja con un máximo de 2 cm de altura, se cubrió con una bolsa de polietileno alrededor de la bandeja dejando un pequeño espacio para la circulación del aire, el cual fue protegido con un pequeño trozo de algodón. Las bandejas inoculadas se dejaron en estufas de incubación (Binder F53, Alemania) a 30 y 40°C por 72 horas sobre recipientes que contenía agua destilada para preservar la humedad inicial en el material sólido.



Figura 7. Inoculación de harina de semilla de mango

5.2.3.5 Tratamiento de muestras

Se tomaron 32 g de muestra fermentada cada 0, 24, 48 y 72 horas, las cuales fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para detener la fermentación. Enseguida fueron secadas a 55°C por 24 horas y después molidas hasta la obtención de un polvo fino siendo almacenadas a 4°C para su posterior análisis (Fadahunsi, 2009)

5.2.4 Extracción con CO_2 supercrítico de la harina de semilla de mango

El procedimiento de extracción se realizó en un equipo de altas presiones MV-10 ASFE System (Waters, USA), el cual incluyó un recipiente de extracción (capacidad de 100 mL), con un horno termostático que controla la temperatura de extracción, dos bombas con un caudal máximo de 3 mL/min (uno para el dióxido de carbono y el otro para el co-disolvente), con una válvula reguladora trasera para controlar el sistema de presión y separador selectivo que permite la descarga del material extraído durante el proceso de extracción. Para todas las pruebas se

pesaron 11 g de muestra en el recipiente de extracción, el cual fue colocado en el horno termostático. Se trabajó bajo los siguientes parámetros de operación: Para la primera condición la presión fue de 150 Bar y temperatura de 70°C (Jahurul *et al.*, 2014) mientras que en la segunda condición la presión fue de 250 Bar y temperatura de 80°C (Datos experimentales no publicados), en ambas condiciones se adicionó 10% de etanol al 95% como cosolvente, con un flujo caudal de CO₂ de 1 mL/min y tiempo de extracción de 3 horas. El software ChromScope fue usado para controlar presión y temperatura. La harina sometida al tratamiento se recuperó y almacenó en bolsas de polietileno a 4°C para su análisis.



Figura 8. Equipo de fluidos supercríticos (MV-10 ASFE System, USA)

5.2.5 Determinación de factores antinutricionales

5.2.5.1 Taninos

Se empleó el método gravimétrico con acetato de cobre descrito por Joslyn (1970) para la cuantificar taninos totales solubles con modificaciones: Un gramo de harina de semilla de mango (HSM) fue hervido con 50 mL de agua destilada en matraces de 250 mL por 20 minutos. Posteriormente la solución fue filtrada con papel Whatman No. 1, el filtrado fue recuperado y el residuo fue descartado. Se adicionaron 10 mL de solución de acetato de cobre al 4% al filtrado caliente y se hirvió de nuevo por 10 minutos. La solución se filtró y el residuo sólido fue

recuperado con el papel filtro, éste se sometió a secado aproximadamente 2 horas a 60°C para eliminar todo remanente de cobre, el papel seco se colocó en un crisol previamente pesado, se registró el peso del crisol con la materia. Se incineró en una mufla a 600°C por 3 horas. A continuación se secó en un desecador y se pesó nuevamente. La diferencia de peso entre la muestra no incinerada y la muestra carbonizada representó a los taninos solubles totales.

$$\% \text{ Taninos solubles totales: } \frac{\text{Pérdida de peso después de incineración}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Dentro de la cuantificación de taninos, se contempló la determinación de taninos condensados para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se pesó un gramo de HSM y se colocó en un matraz de 50 mL y se adicionaron 10 mL de metanol. El matraz fue protegido de la luz y se mantuvo en agitación por 24 horas a 25°C. Una vez terminado el proceso anterior, las muestras fueron centrifugadas a 6000 RPM por 10 minutos, el sobrenadante recuperado se consideró como el extracto metanólico con el que se realizaron las cuantificaciones. Dicho método fue adaptado a micro placa para lo cual se tomaron 50 µL de extracto metanólico por triplicado y se adicionaron 200 µL del reactivo de vainillina 1%-HCl 8% (1:1). Los compuestos fueron cuantificados a una longitud de onda de 495 y 549 nm, se usó como referencia un estándar de (+) catequina. Se reportaron como miligramos equivalentes de (+) catequina por gramo de muestra. Una curva de calibración fue realizada previamente con estándar de (+) catequina (Desphande *et al.*, 1987).

5.2.5.2 Fitatos

Las determinaciones se realizaron bajo la metodología de Wheeler & Ferrel (1971) con modificaciones realizadas por Kayode *et al.* (2013). Dos gramos de HSM fueron sometidas a remojo en 50 mL de HCl al 2% por tres horas y posteriormente filtradas con papel Whatman No. 1. Se recuperaron 25 mL del filtrado al cual se le

adicionaron 5 mL de tiocianato de amonio 0.3% como indicador. Después se adicionaron 53.5 mL de agua destilada a la mezcla para generar la acidez adecuada. La mezcla fue titulada con una solución de cloruro de hierro (FeCl_3), la cual contenía 0.00195 g de hierro por mL. La titulación se detuvo hasta que un color café-amarillo apareció y persistió alrededor de 5 minutos.

$$\% \text{ Ácido fítico} = (y) (1.19)(100)$$

Donde (y) es la multiplicación del volumen de titulación por 0.00195 g.

5.2.5.3 Oxalatos

Se empleó la metodología propuesta por Ukpabi & Ejidoh (1989). El procedimiento involucra tres pasos: la digestión de la muestra a analizar, la precipitación del oxalato y la titulación con permanganato.

Digestión: Dos gramos de HSM se suspendieron en 190 mL de agua destilada previamente acidulada con 10 mL de HCl a 6 M la cual fue llevada a ebullición por una hora. La suspensión se enfrió y fue aforada a 250 mL con agua destilada para ser filtrada.

Precipitación del oxalato: Porciones duplicadas (125 mL) del filtrado obtenido en la digestión se colocaron en matraces a los cuales se les añadió por goteo NH_4OH concentrado hasta que la solución analizada cambió de un color amarillo claro a amarillo oro. Cada porción fue calentada a 90°C por 10 minutos aprox., se enfrió y filtró usando papel Whatman No. 1 para remover el precipitado café que contiene los iones ferrosos. El filtrado amarillo oro fue calentado a 90°C por 10 minutos aprox. y se le adicionó 10 mL de CaCl_2 5% mientras permaneció en agitación constante. La solución se enfrió y se mantuvo en reposo a 5°C por 12 horas, a continuación se centrifugó a 6000 RPM por 6 minutos. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se re suspendió en 20 mL de H_2SO_4 20% (v/v).

Titulación con Permanganato: La solución final obtenida en los pasos anteriores fue titulada con una solución de KMnO_4 0.05 M hasta que la solución de interés obtuvo un color rosa pálido y que persistió aprox. 30 seg. Se registró el volumen gastado.

$$\text{Contenido de oxalato (mg/100g)} = \frac{T * [Vme] * DF * 2.4 * 10^2}{ME * Mf}$$

T= Volumen de titulación con KMnO_4

Vme= Volumen-masa (ej. 1mL de KMnO_4 0.05 M es equivalente a 0.00225 g de ácido oxálico anhidro)

DF= Factor de dilución (VT/A donde VT: Volumen total del filtrado, 300 mL; A: Alícuota, 125 mL)

ME= Peso equivalente de KMnO_4

Mf= Peso de la muestra.

5.2.5.4 Ácido cianhídrico (HCN)

Se empleó el método de titulación alcalino 915.03 (AOAC, 2000) con modificaciones, el cual consistió en: dos gramos de HSM se colocaron en tubo Kjeldhal de 800 mL y se adicionaron 50 mL de agua destilada dejándose en reposo por 2-4 horas. Se realizó un destilado con arrastre de vapor para recuperar la muestra en un destilador automático (RapidStill II, Labconco, USA). Se colectaron 40 mL del destilado en una solución de NaOH (0.5 g en 20 mL H_2O destilada), enseguida se adicionó agua destilada suficiente para completar a 100 mL totales. Se agregaron 8 mL de NH_4OH 6 M y 2 mL de KI 5%. Se tituló con una solución de AgNO_3 0.005 M usando una pipeta serológica. El punto final de la titulación fue una débil pero permanente turbidez fácilmente reconocible contra un fondo negro (color gris azulado pálido). Se tomó en consideración la fórmula original, realizando el equivalente a la solución de AgNO_3 modificada.

$$1 \text{ mL } \text{AgNO}_3 \text{ 0.02 M} = 1.08 \text{ mg HCN}$$

5.2.6 Determinación de proteína

Para estimar la proteína presente en la harina de semilla de mango una vez que se sometió a los tratamientos fue necesario la extracción de la misma, para lo cual se pesaron 50 mg de muestra en tubos eppendorf y se añadieron 1.25 mL de NaOH 0.5 N, los tubos se colocaron en baño de ebullición (100°C) por 15 minutos y se enfriaron con agua destilada. Enseguida se centrifugó a 6000 RPM por 5 minutos para lograr la separación recuperándose el sobrenadante, al cual se le aplicó el método de Bradford (1976) para cuantificar proteína, el cual se describe a continuación: A la muestra proteica extraída se le realizó una dilución 1:10, de ésta se tomaron 20 µL, a la cual se le adicionó 1 mL de reactivo de Bradford (Gel de Coomasie, etanol 95% y ácido fosfórico), se mantuvo en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente. Se leyó a una longitud de onda de 595 nm, el color es estable por una hora. Previamente una curva de calibración fue elaborada usando BSA (seroalbúmina bovina).

5.3 Diseño experimental y análisis estadístico

Para la fermentación en estado sólido se aplicó un diseño unifactorial completamente aleatorizado con dos niveles del factor (30 y 40°C) con mediciones repetidas en el tiempo, mientras que para el uso de fluidos supercríticos se empleó un diseño unifactorial con 3 niveles del factor, donde los niveles fueron 1.01 Bar-27°C (Control), 150 Bar-70°C y 250 Bar-80°C. Cada variable respuesta se midió por duplicado y triplicado según la disponibilidad de material, en el caso de la FES se aplicó la medición a 2 experimentos independientes. Los resultados se expresaron como la media \pm EE, los cuales fueron analizados usando regresión lineal o polinomial, comparación de medias por el método de Tukey y Dunnet utilizando el paquete estadístico JMP versión 8.0. (SAS Institute, USA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización química de la harina de semilla de mango

La composición química de la harina producida se determinó con la finalidad de conocer las limitantes y ventajas que dicho agroresiduo pudiera conferir a los tratamientos empleados. La grasa total (7.57%), proteína cruda (8.36%) y carbohidratos (74.37%) fueron los principales componentes de esta variedad (Cuadro 9). Kayode & Sani (2008) reportaron para la variedad Ori valores menores en cuanto a grasa total y carbohidratos (6.98% y 64.84%, respectivamente); sin embargo la cantidad de proteínas fue mayor (15.56%) que la encontrada en este estudio. Estas diferencias son atribuidas a la condiciones del cultivo, tratamiento poscosecha e incluso a la variedad empleada (Kayode *et al.*, 2013).

La cantidad de dichos nutrientes presentes en la HSM muestran un alto potencial como fuente energética para ser empleada dentro de la fermentación en estado sólido, aunque el contenido proteico presentado conllevó a enriquecer el medio de cultivo con nitrógeno proveniente de NaNO_3 , buscándose una relación 1:30 Carbono/Nitrógeno para evitar la supresión de crecimiento de *A. niger* por falta de nutrientes, puesto que una condición primordial para el uso de la FES es que el material sólido sea una fuente rica en carbohidratos y proteínas (Pastrana, 1996).

Cuadro 9. Composición química de la harina de semilla de mango

Componente (%)	Contenido
Materia seca	95.18±0.01
Grasa total	7.57±0.04
Cenizas	2.47±0.02
Proteína cruda	8.36±0.75
Fibra cruda	2.23 ± 0.06
Carbohidratos*	74.37

Los resultados son la media de determinaciones por triplicado expresados en base húmeda ± EE. *Por diferencia de peso

Dentro de esta misma caracterización, se cuantificaron los compuestos antinutricionales presentes en la HSM para conocer su contenido inicial, los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 10. La concentración de dichos componentes evitan el aprovechamiento de los nutrientes que presenta la harina obtenida, precisamente por las interacciones que ocurren entre ellos, disminuyendo su valor nutrimental y al mismo tiempo generando efectos nocivos a la salud. Cabe destacar que el contenido de taninos totales solubles presente en la variedad de estudio (Oro) es menor que la reportada por Kayode *et al.* (2013) la cual fue de 15.73 g/100g. Fowomola (2010) reportó la nula existencia de ácido cianhídrico en la semilla de mango caso contrario a lo encontrado en este trabajo reportándose un contenido de 12.48 mg/100g, siendo menor al encontrado por Dakare *et al.* (2012) de 14.1 mg/100 g. Los efectos dañinos generados por cada factor antinutricional han sido descritos previamente, por lo que su presencia hace necesario emplear métodos que permitan su detoxificación para poder aprovechar los beneficios que este material ofrece como fuente nutritiva.

Cuadro 10. Factores antinutricionales contenidos en la harina de semilla de mango

Factor antinutricional	Contenido
Taninos totales solubles (g/100g)	6.24±0.09
Taninos condensados (mg/g)*	4.50±0.02
Fitatos (%)	0.97±0.05
Oxalatos (mg/100g)	1.03±0.01
Ácido cianhídrico (mg/100g)	12.48±0.06

Los resultados son la media de determinaciones por triplicado ± EE

*Expresados como mg de (+) catequina/g muestra

6.2 Efecto de la fermentación en estado sólido sobre los factores antinutricionales y contenido proteico de la harina de semilla de mango

6.2.1 Taninos

El efecto producido por las temperaturas empleadas en la fermentación en estado sólido como método de detoxificación sobre el contenido de taninos se aprecia en la figura 9. El comportamiento de los datos analizados refleja que un modelo polinomial de segundo y tercer orden son significativos ($p < 0.0001$) para 30 y 40°C, respectivamente, ajustándose adecuadamente a este conjunto de mediciones. A través de ello se pudo observar un incremento en dicho compuesto antinutricional a las 24 horas de tratamiento para ambas temperaturas (6.23 ± 0.09 g/100g), siendo significativamente mayor a 40°C, en donde a partir de las 48 horas se apreció un descenso en la concentración del componente evaluado consiguiendo una mejor reducción al incrementar el tiempo de fermentación (72 h, 3.09 ± 0.01 g/100g), caso contrario ocurrió a los 30°C, en donde el efecto de reducción al finalizar el tratamiento de detoxificación fue imperceptible. En este mismo sentido la concentración de taninos condensados se vió afectada a las 72 horas de fermentación a 40°C, observándose un incremento significativo ($p \leq 0.05$) con respecto al tiempo inicial, pasando de 4.49 ± 0.05 a 4.96 ± 0.14 mg de (+) catequina/g muestra. Osman (2011) reportó un comportamiento similar al ver un aumento significativo del contenido de taninos del mijo perla a las 8 y 16 horas (0.036 ± 0.02 y 0.0041 ± 0.001 mg de (+) catequina/g muestra, respectivamente) del período de fermentación con respecto a la concentración inicial, pasadas las 20 horas ocurrió un descenso significativo comparado con la cantidad obtenida a las 16 horas. Este incremento fue atribuido a la hidrólisis de taninos complejos mientras que el descenso ocurrió por la unión de los taninos al endosperma del cotiledón pudiendo ser insoluble en el solvente usado para la cuantificación.

La fermentación reduce los enlaces de los compuestos fenólicos e incrementa de manera libre estos compuestos, el aumento del contenido de taninos señala el rompimiento de los enlaces fuertes formados con las proteínas, almidón,

hierro y carbohidratos por acción de enzimática, desacomplejando dicho factor no nutritivo pudiendo con ello ser fácilmente cuantificado. Diversos estudios han demostrado que *A. niger* es capaz de producir enzimas durante la fase vegetativa y de reproducción del hongo que permiten la degradación de taninos por lo que se observan niveles de reducción en el material que haya sido estudiado, siendo la enzima tanasa la posible responsable de la reducción de taninos en la harina de semilla de mango. (Owenzulo & Nwabugwu, 2009; Ekundayo et al, 2013; Ayuk et al., 2014; Sharath et al., 2014).

Smail et al. (1995) observó que *A. niger* posee un sistema enzimático capaz de producir tanasa que le proporciona una ventaja competitiva frente a otros microorganismos, esta enzima puede romper los enlaces de taninos hidrolizables, ácido tánico, metilgalato, entre otros. Su producción puede ocurrir incluso en la ausencia de ácido tánico sin embargo el material de soporte debe ser rico en taninos para su óptima actividad. Belmares et al. (2004) concluyeron que la enzima de interés es producida por algunas cepas de *Aspergillus* y que trabajan a temperaturas óptimas de 35 a 40°C y a un pH de 5 a 6. Por lo que esto pudo conllevar a la reducción significativa dada a 40°C en este trabajo de investigación, los resultados obtenidos demostraron que la cepa empleada degradó los compuestos fenólicos y los monómeros obtenidos por la hidrólisis fueron consumidos por el hongo a partir de las 48 horas de la fermentación.

No obstante el efecto que pudo haber producido la enzima tanasa sobre la reducción no se ve reflejada en la concentración de taninos condensados, en donde resulta un aumento del 10% durante la fermentación. Un incremento de 42 y 86% en los taninos condensados de la hoja de gobernadora y hoja ancha sometidos a fermentación con *A. niger* PSH a mayor tiempo de fermentación (72 horas) fue reportado por Ventura et al. (2008), quienes indican que los productos de la hidrólisis de los compuestos fenólicos son acumulados y no son degradados por la enzima generándose el incremento. De igual manera numerosas investigaciones han indicado que la tanasa actúa sobre galotananinos, elagitaninos y taninos

complejos pero solo rompe enlaces éster sin afectar las uniones carbono-carbono, por lo cual no actúa sobre los taninos condensados, quienes se componen de dichos enlaces. Dichos compuestos son más resistentes a la hidrólisis enzimática requiriendo mayor tiempo de tratamiento o bien forma compuestos indigestibles por las enzimas (Rodríguez *et al.*, 2010, Kumari & Jain, 2012; Medugu *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que el consumo de alimentos que contienen taninos es de 1 g/día en EE.UU, así como la ingesta diaria de catequinas y dímeros de taninos condensados se estima alrededor de 18-50 mg/día, encontrados en productos como té, chocolate, manzanas, uvas, vino tinto, durazno, frutos secos, entre otros. Así también se ha reportado que un consumo diario de alrededor de 560 mg de ácido tánico procedente de alimentos es aceptable, por lo que la concentración obtenida sobre taninos condensados después de la FES en la HSM permitiría su consumo, incluso se reporta que dosis controladas de dichos compuestos pueden presentar efectos anticancerígenos, antimicrobianos y antimutagénicos (King *et al.*, 1998; Arts *et al.*, 2000; Kumari & Jain, 2012).

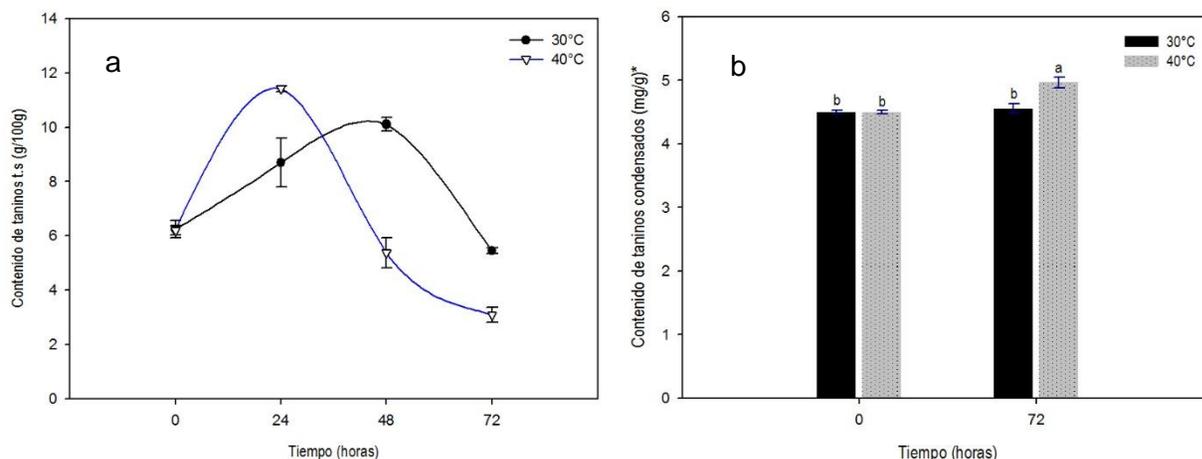


Figura 9. Efecto de la fermentación en estado sólido sobre el contenido de taninos totales solubles y taninos condensados de la harina de semilla de mango (HSM).

a) Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado de dos experimentos independientes \pm EE. b) Resultados expresados como la media de determinaciones por triplicado \pm EE. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). * Expresados como mg de (+) catequina/g de HSM.

6.2.2 Fitatos

Dentro de los factores antinutricionales evaluados se encuentran los fitatos, para este compuesto un modelo de regresión lineal se ajustó a los datos encontrados para ambas temperaturas ($p=0.0004$) explicando la tendencia observada a través del tiempo, en donde a mayor tiempo de fermentación la concentración de fitatos disminuyó, siendo más pronunciada a 30°C. Bajo este tratamiento se observó a las 72 horas una reducción del 60%, llegando a $0.40 \pm 0.1\%$ partiendo de un contenido inicial de $0.98 \pm 0.08\%$, aunque el comportamiento de reducción es similar a 40°C solo se alcanzó el 30% de disminución ($0.66 \pm 0.02\%$) (Figura 10).

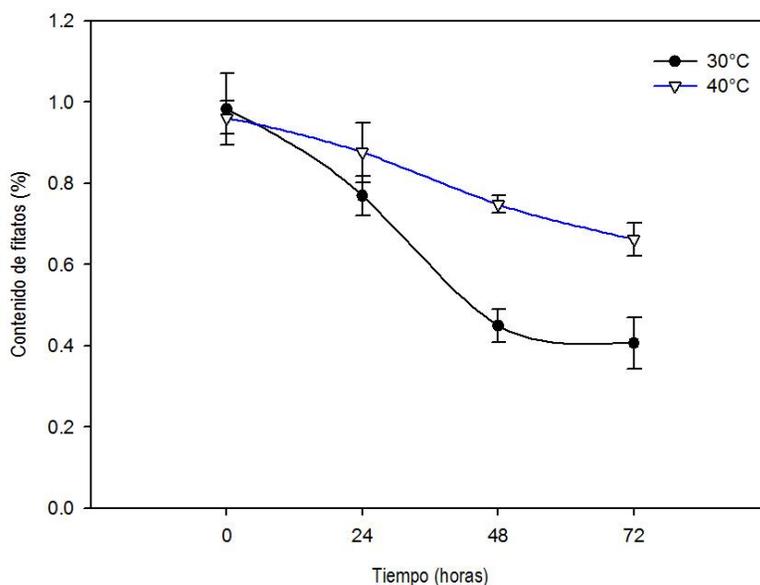


Figura 10. Comportamiento del contenido de fitatos de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido. Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado de dos experimentos independientes \pm EE. % de ácido fítico.

En un estudio realizado por Gao *et al.* (2013) se encontró que la fermentación en estado sólido empleando *A. oryzae* y usando como soporte harina de soya incubadas a 28°C por 120 horas produjo una reducción en el contenido de ácido fítico de 9.4 a 6.4 mg/g materia seca, considerado ese descenso como resultado de la generación de la enzima fitasa secretada por el hongo usado. Así mismo la fermentación realizada a 30°C por 24 horas del mijo perla presentó una

disminución significativa de dicho factor no nutritivo de 51.9%, concordando con la tendencia obtenida en este trabajo. De la misma forma se atribuyó el descenso a la fitasa producida por la fermentación e incremento en la cantidad de fósforo libre (Osman, 2011).

Como se mencionó anteriormente, de los datos obtenidos en este trabajo se encontró que al usar 40°C como tratamiento el efecto de reducción es menor, caso contrario ocurrió en un estudio cuando fue usada harina de trigo como soporte adicionada de suero de leche empleando temperaturas de 30, 35 y 40°C de incubación por 6, 12, 18, 24 y 48 h en donde se observó la máxima disminución en los niveles del compuesto antinutricional a 40°C a las 48 horas. Estos resultados sugieren que el material usado como medio sólido en la fermentación, impacta en el comportamiento de la enzima fitasa para la degradación del componente no nutritivo (Nadeem *et al.*, 2010).

Se conoce que el ácido fítico y sus sales son un fuerte agente quelante y es la principal forma de almacenamiento del fósforo y otros minerales en varios tejidos vegetales, la estructura única del fitato, con 12 protones reemplazables y su alta densidad de grupos fosfatos cargados negativamente permite formar un complejo estable con cationes multivalentes (Ca, Mg, Fe, Mn) así como a proteínas y aminoácidos. Por consiguiente todo lo que esté unido a este compuesto no estará biodisponible, para corregir la problemática que los fitatos ocasionan se busca que la actividad enzimática fitásica permita remediar este inconveniente de una forma económica y sin alteraciones a las características nutricionales del producto (Neira *et al.*, 2013; Ayuk *et al.*, 2014)

La fitasa es una fosfohidrolasa ácida, que reducen la forma hexámera del ácido fítico (IP6-mioinositol 1,2,3,4,5,6,-hexaquiوسفato) a formas más pequeñas como IP5, IP4, IP3, IP2, IP1 y mioinositol, que son formas donde se presenta baja capacidad para quelar metales. Esta enzima cataliza la hidrólisis del ácido fítico a fosfato inorgánico y derivados de mioinositol a través del rompimiento de los enlaces

fosfomonoéster liberando el fósforo inorgánico. Las fuentes naturales de fitasas incluyen algunas variedades de plantas (cereales, legumbres, tubérculos), así como los producidos por acción de microorganismos tales como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *levaduras* destacando el género *Aspergillus* como un fuerte productor de la enzima de interés. Se ha reportado que *A. niger* es identificado como el hongo que mejor produce fitasa de manera exógena, reduciendo el problema de suplementación de fósforo inorgánico en alimentos y piensos. La enzima es sintetizada durante la fermentación encontrando condiciones favorables de producción entre los 25 y 37°C a un pH de 5-7, estas características coinciden con el intervalo de parámetros que fueron establecidas en este estudio, pudiendo atribuir a ello el efecto de reducción por acción de la fitasa cuando se evaluó a 30°C, es muy posible que la reducción del componente no nutricio también hubiera generado un incremento en los minerales y fósforo orgánico al liberarlos de los complejos formados (Mohamed *et al.*, 2007; Coulibaly *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2012; Neira *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2013).

Los estudios sistemáticos acerca del consumo diario del ácido fítico en los humanos son muy escasos, la información disponible ha sido reportada en base a la ingesta por países y lo aportado por cada alimento obteniéndose valores estimados. En los países industrializados se ingieren alrededor de 200-800 mg mientras que en los que se encuentran en vías desarrollo el consumo estimado es de 2 g. Los aportes están proveídos por cereales, oleaginosas, nueces, entre otros, siendo los máximos permitidos de 1.14, 5.36, 1.97 % respectivamente. Estos resultados reportados sugieren que la cantidad de 0.40% de ácido fítico proveniente de la HSM fermentada por *A. niger* puede ser usada dentro de la alimentación humana siendo similar a lo que se consume a través de las lentejas (0.50%). Cabe señalar que al igual que los taninos, un consumo controlado y balanceado de los fitatos puede contribuir a la salud, ya que investigaciones han revelado sus propiedades para prevenir la calcificación patológica, la eliminación de metales tóxicos, antioxidantes y aquellas relacionadas con la disminución de los lípidos y glucosa en sangre (Reddy *et al.*, 2002; Bohn *et al.*, 2004; Schlemmer *et al.*, 2009).

6.2.3 Oxalatos

Otro de los compuestos antinutricionales estudiados en este trabajo fueron los oxalatos, los datos analizados sugirieron que un modelo polinomial cuadrático (orden 2) se ajustó adecuadamente al conjunto de observaciones. A través de ello se observó una tendencia de incremento en el contenido de oxalatos a las 24 h del tratamiento de fermentación oscilando entre $1.16-1.33\pm 0.03$ mg/100g con respecto al contenido inicial de la HSM (0.97 ± 0.04 mg/100g), no obstante una reducción sobre el contenido de dicho compuesto se observó hasta finalizado el tiempo de fermentación a temperatura de 30°C , llegando a una cantidad de 0.65 ± 0.03 mg/100g, lo que representó una reducción del 33%, esta fue mayor comparado con el 13% de disminución obtenido a 40°C (Figura 11).

La importancia de *Aspergillus niger* dentro de la biotecnología alimentaria radica en la producción de numerosas enzimas y de ácidos orgánicos de importancia comercial, uno de ellos es el ácido oxálico. Esta sustancia se encuentra distribuida en animales y plantas, siendo estas últimas las que contienen mayores cantidades. El ácido oxálico tiene la habilidad de formar fuertes enlaces con varios minerales y sales, como sodio, potasio, magnesio y calcio, una vez que esto ocurre los compuestos formados son llamados sales de oxalato u “oxalatos”. Dentro de la naturaleza los oxalatos se encuentran más como ácido oxálico libre o como oxalato sódico o cálcico. Ahora bien, la producción de ácido oxálico también puede ser proporcionada por hongos como *A. niger*, *Penicillium*, *Mucor*, *Boletus sulphureus*, entre otros. *A. niger* ha sido reportado como el más eficiente para sintetizar dicho compuesto (4-5 g/100g de materia seca sobre forraje). La biosíntesis del ácido oxálico se ve encuadrada por la estrategia del microorganismo para acidificar su ambiente vía extracelular por medio de la secreción de ácidos orgánicos que se acumulan intracelularmente. Van de Merbel *et al.* (1994) reportaron una producción de 13 g ácido oxálico/L usando *A. niger* durante 45 horas de fermentación empleando 20 g azúcar/L, así mismo se indicó que un pH de 5-8 es óptimo para la obtención del ácido orgánico de interés. Todo lo anterior ayuda a elucidar el incremento presentado a las 24 horas de tratamiento en la HSM fermentada (Van

de Merbel *et al.* 1994; Noonan, 1999; Ruijter *et al.* 1999; Caliskan, 2000; Liebman & Al- Wahsh, 2011).

Bajo la premisa anterior Kayode & Sani (2008), observaron el incremento en los valores de oxalatos contenido en la semilla de mango sometidos a fermentación usando una mezcla de hongos aislados de manera natural por 168 horas, destacando *A. niger* como el microorganismo que generó dicho aumento del factor antinutricional en las muestras fermentadas (77.41 mg/100g) comparándolas con las muestras sin tratamiento (70.05 mg/100g). En este sentido el trabajo de investigación aquí expuesto muestra un descenso sobre la concentración de oxalatos a las 72 horas de fermentación, ocurriendo lo contrario a lo que se esperaría en el comportamiento del hongo empleado.

En un breve estudio realizado por Muchoki *et al.* 2010 con la hoja del frijol chino se observó que la aplicación de la fermentación por 21 días redujo mínimamente el contenido de oxalatos presentes, indicando que los oxalatos pueden cambiar de forma durante el procesamiento de la materia prima. Wadamori *et al.* (2014) sugiere que los oxalatos se encuentran tanto en forma soluble como insoluble y que pueden ser afectadas por el pH del medio. A un pH menor a 6, la proporción de los iones de oxalato divalentes totalmente desprotonados ($C_2O_4^{2-}$) disminuyen notablemente y esto reduce la capacidad para unirse a compuestos divalentes (Ca^{2+}) por lo que produce agregados insolubles, esto pudo haber dificultado la cuantificación por el método aquí empleado subestimando los datos por lo que la aparente reducción es observada. Es probable que la disminución representativa a 30°C se debiera al cambio de pH producido por el crecimiento del hongo, ya que esa temperatura es la óptima para su desarrollo.

Si bien es cierto que múltiples investigaciones han indicado que el empleo de la fermentación ayuda en la reducción de oxalatos presentes en la muestra de estudio, estos van acompañados de la aplicación de tratamientos previos (remojo, tostado, hervido, secado al sol) para mejorar la disminución de los compuestos no

nutricios, el hervido por ejemplo puede causar una considerable ruptura celular y facilitar el escape de oxalatos solubles hacia el agua de cocción. Por lo que en este apartado se sugiere la aplicación de un pretratamiento de esta índole para lograr mejores resultados para complementar a la fermentación en medio sólido (Ajeibe *et al.*, 2012; Igbabul *et al.*, 2014).

Dentro de la alimentación las principales fuentes de oxalatos están dadas por betabel, espinacas, cacahuates, chocolates y productos de cacao, entre otros siendo los valores reportados de 600, 600, 187, 117 mg/100 g de alimento, respectivamente. Se conoce que la ingesta total de oxalatos no debe exceder los 50- 60 mg por día, aunque se ha reportado que el consumo diario de un adulto oscila entre los 80-120 mg/día y en individuos que llevan una dieta típica del Occidente se encuentra en 44-1000 mg/día. La ingestión de 4-5 g de oxalato es capaz de causar severos daños al organismo. La concentración final una vez aplicada la fermentación revela que la HSM no es una fuente potencial de oxalatos y que su uso es seguro para ser empleado dentro de la alimentación humana (Noonan, 1999; Fekadu *et al.*, 2013, Shaw, 2014)

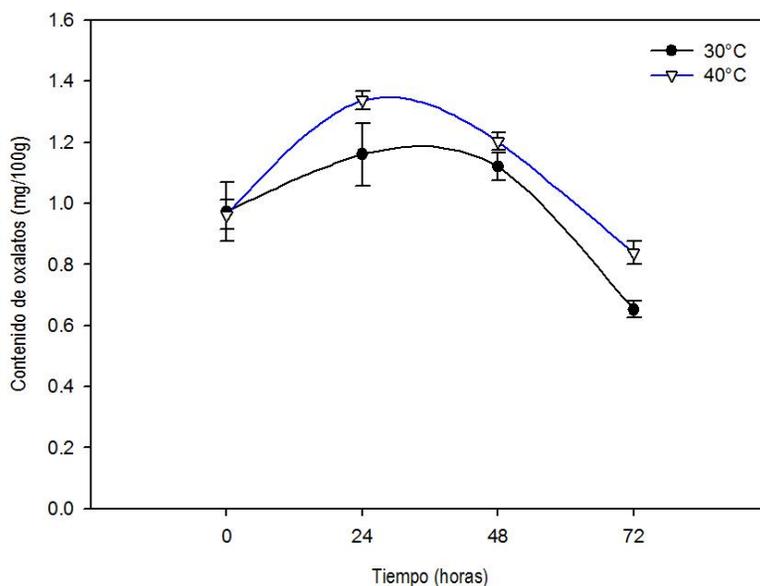


Figura 11. Comportamiento del contenido de oxalatos de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido. Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado de dos experimentos independientes \pm EE.

6.2.4 Ácido cianhídrico

La mayoría de las semillas de frutas producen ácido cianhídrico, la importancia de su cuantificación radica en el potencial tóxico de éste. Los datos obtenidos permitieron ajustarse a un modelo lineal para el caso de 30°C y a un modelo polinomial cuadrático para 40°C, el comportamiento observado a través de estos ajustes permitió distinguir que al ser aplicada la fermentación en estado sólido sobre la harina elaborada no se presentó el efecto de reducción esperado, siendo contraria la tendencia en el tratamiento a 30°C, donde un incremento en el contenido de HCN se observó al avanzar el tiempo de fermentación. Al aplicar 40°C el incremento fue perceptible a las 24 h, teniendo un valor de 15.59 ± 0.03 mg/100g en comparación al tiempo inicial (12.39 ± 0.16 mg/100g), posterior a ello el efecto del tratamiento no impactó de manera significativa al material de estudio como se aprecia en la figura 12.

Igbabul *et al.* (2014) reportó que la harina de taro fermentada presentó un descenso significativo de 0.743 mg/g a 0.01 mg/g al incrementar el tiempo de fermentación hasta 72 horas concordando con lo observado por Difo *et al.* (2014) sobre el frijol chino también fermentado, el cual tuvo una reducción promedio del 28%, estos resultados contrastan con lo aquí encontrado.

Como se mencionó en capítulos anteriores el ácido cianhídrico es producido por la acción de la enzima β -glucosidasa sobre los glucósidos cianogénicos naturales presentes en el material vegetal, liberando también una o más moléculas de glucosa, un aldehído o cetona. En este sentido Baraldo *et al.* (2014) demostraron la producción de β -glucosidasa por *A. niger* bajo fermentación en estado sólido empleando salvado de trigo como soporte, indicando la temperatura y pH óptimo en 40-65°C y 4.5-5.5 respectivamente. Por lo que esto pudiera explicar el incremento ocurrido a 40°C sobre la HSM fermentada, al haber producción de la enzima responsable de la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos y por consiguiente la formación de HCN. Considerando que lo que se busca es que la harina de semilla de mango no cause daño al organismo una vez consumida, es

válido rescatar el efecto a los 30°C en donde el incremento en la concentración fue menor con respecto a 40°C, aunque no se consiguiera la reducción esperada. En este sentido la sola aplicación de la fermentación genera una cantidad final de HCN en la HSM fermentada (14.78-15.08 mg/100g) que no permite su consumo como ingrediente único o suplemento alimentario, la Food Standard Australia-New Zealand (2004) indica que dosis entre 30-210 mg/Kg de HCN causan toxicidad, quedando los valores encontrados dentro de este rango no permisible.

Cabe señalar que al igual que en el caso de los oxalatos, la reducción del ácido cianhídrico se ve beneficiada al recibir un pretratamiento que incluya alguna cocción, remojo o secado solar parcial. Soetan & Oyewole (2009) mencionaron que la combinación de cocción y fermentación mejora la calidad de los nutrientes presentes en las semillas de sorgo y reducen drásticamente los compuestos antinutricionales, en especial el HCN a niveles seguros en comparación con el secado o tostado, además menciona que el hervido y remojo mejoran los niveles de dicho compuesto sobre la papa dulce, por lo que se propone que métodos de este tipo sean aplicados antes de someter la HSM a fermentación sólida controlado tanto el tiempo como la temperatura de exposición a los pretratamientos para lograr mejores efectos sobre el ácido cianhídrico pudiendo incluso contribuir a una mayor reducción del resto de los factores analizados en este estudio.

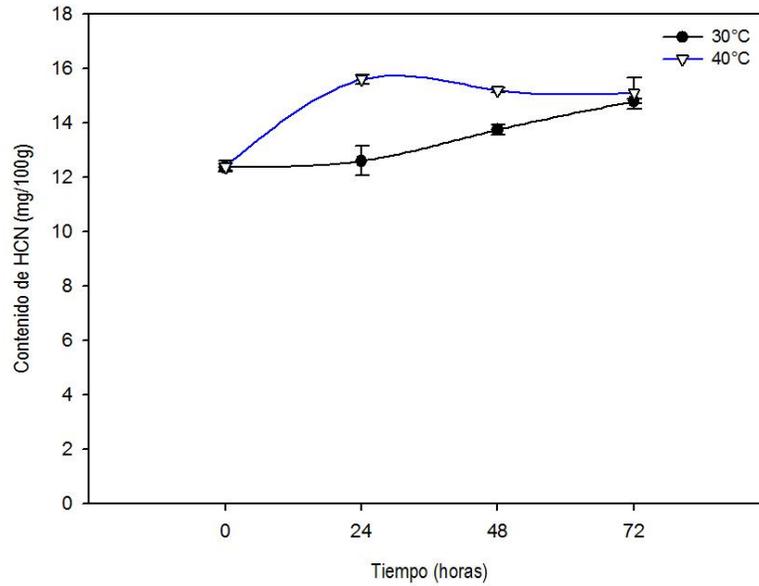


Figura 12. Comportamiento del contenido de ácido cianhídrico de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido. Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado de dos experimentos independientes \pm EE.

6.2.5 Contenido de proteína

La fermentación en estado sólido representa una alternativa tecnológica para el procesamiento de grandes variedades de leguminosas, cereales y semillas para mejorar su calidad nutricional y obtener productos con buenas características, destacando sobre todo el contenido proteico. Dentro de los resultados obtenidos en esta investigación se observó que un modelo polinomial cuadrático se ajustó a los datos ($p=0.0008$), lo que permitió observar un aumento en la cantidad de proteína en la HSM fermentada, en ambos casos el incremento significativo se registró a partir de las 24 horas siendo de 12.7% y 14% para 30 y 40°C respectivamente comparándolas con su contenido inicial del 12%, observándose un mayor incremento a 40°C (Figura 13).

Ayuk *et al.* (2014) observaron un aumento en el contenido de proteína del 9.22% a los 7 días de tratamiento para *Enterolobium cyclocarpum* usando fermentación en medio sólido por *A. niger* siendo una concentración menor a lo

reportado en este trabajo. Adjudicaron este incremento a la adición de proteína microbiana durante el proceso de fermentación así también indican que durante la fermentación las enzimas liberan aminoácidos para la síntesis de nuevas proteínas y rompen los enlaces con los factores antinutricionales unidos a proteínas haciéndolas disponibles. Un comportamiento similar es reportado por Ojokoh (2011) al someter a fermentación una mezcla de residuos de cacahuate y palomitas de maíz obteniéndose un incremento en el contenido proteico de 24% a 27%, estableciendo que el aumento se debió a la actividad de las cepas que pudieron haber secretado enzimas extracelulares (proteínas) durante el tratamiento.

Por otra parte, un aumento en el contenido de proteínas durante la fermentación puede estar atribuido a la eficiente bioconversión de carbohidratos altamente polimerizados a proteínas microbianas, así también a la producción de diferentes tipos de enzimas que son de naturaleza proteica, se ha señalado que *Aspergillus niger* puede producir más de 19 enzimas de dicha naturaleza. Igualmente se ha señalado que este hongo filamentoso produce proteínas unicelulares al emplear como sustrato salvado de arroz a través de FES, utilizando el nitrógeno disponible para su crecimiento para poder sintetizar nuevas proteínas al consumir el sustrato, por lo que una adecuada suplementación con fuentes de nitrógeno es necesario para un óptimo crecimiento, en donde el aumento de biomasa representa un incremento en la proteína total (Anupama & Pogaku, 2001; Imelda *et al.*, 2008).

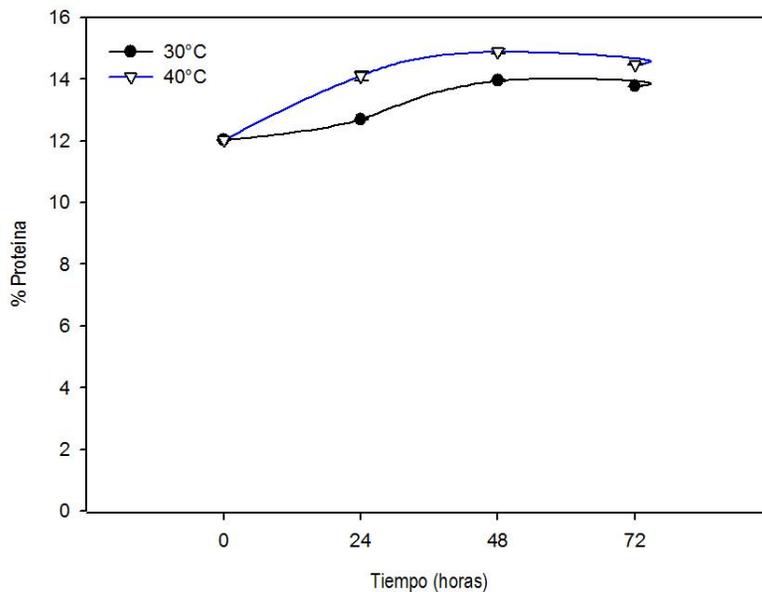


Figura 13. Contenido de proteína de la harina de semilla de mango (HSM) sometida a fermentación en estado sólido empleando *A. niger*. Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado \pm EE.

De los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, es importante hacer mención a un factor que pasa desapercibido en muchos casos pero que incide en los efectos que puede ofrecer la fermentación en medio sólido sobre los factores antinutricionales y el contenido nutricional, en particular de las proteínas, siendo ese elemento el tamaño de partícula. Durante la FES, la disponibilidad de la superficie juega un papel importante en la fijación microbiana, transferencia de masa, crecimiento del microorganismo y producción metabólica, todo esto asociado al tamaño de partícula del sustrato. Los bajos efectos de *A. niger* sobre los factores antinutricionales comparados con estudios previos sugieren la dificultad del microorganismo para penetrar adecuadamente el material. En general, partículas más grandes con menos superficie de contacto causan una tendencia hacia una pobre accesibilidad del microorganismo, sin embargo la porosidad intra-particular del material es mucho mejor, mientras que partículas muy pequeñas con grandes superficies de contacto presentan una porosidad intra-particular menor, las partículas demasiado pequeñas pueden disminuir la transferencia de calor, de O₂ y CO₂ debido a la compactación del medio. Un estudio realizado con vainas de

algarrobo fermentadas con *A. niger* indicaron que un tamaño de partícula de 2.5 mm incrementaba la proteína cruda a 20%, cuatro veces más comparado con el contenido inicial, observando que partículas más pequeñas (1.25 mm) presentaban bajo crecimiento del microorganismo restringiendo la disponibilidad de oxígeno y afectando el contenido de proteína (Smail *et al.*, 1995; Prakasham *et al.*, 2006; Ayuk *et al.*, 2014). Aunque en este trabajo el tamaño de partícula no fue objeto de estudio, es válido hacer mención de los efectos de reducción producidos en la HSM por la fermentación aplicada, puesto que nuestro tamaño de partícula fue mucho menor a 1 mm, señalando que para estudios posteriores es un factor que se debe considerar.

6.3 Efecto de los fluidos supercríticos sobre los factores antinutricionales de la harina de semilla de mango

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica novedosa que ha sido estudiada debido al interés de la industria química, petroquímica y alimentaria, su importancia radica en los beneficios que ofrece como medio de extracción ya que permite recuperar de manera segura y sin mezcla con los componentes de extracción, del analito de interés pudiendo ser usado en materiales termosensibles y sobre todo este sistema tiene la ventaja de no generar residuos de solventes siendo considerada como una tecnología verde. Extractos de alimentos como el café y té descafeinados, zumos de frutas con potenciadores del aroma, bebidas alcohólicas, colorantes, antioxidantes, aromas, lípidos etc. han sido obtenidos por medio de fluidos supercríticos. Sin embargo, poco se ha estudiado con respecto al material de extracción remanente; aquel que se utiliza como materia prima para la separación de metabolitos de interés, puesto que la mayoría de los estudios son realizados a los extractos recuperados (Braga *et al.*, 2006)

Por lo que en este apartado se considera el análisis de la HSM remanente del proceso de deslipidación utilizando FSC sobre el contenido de factores antinutricionales, y evaluar el efecto producido por el sistema de extracción. Bajo esta misma premisa la discusión de los resultados obtenidos se hizo con respecto a las técnicas convencionales de tratamiento de FANs, puesto que hasta la fecha no hay información suficiente que permitiera realizar la comparativa, ya que este tipo de sistema no ha sido empleado para el propósito aquí propuesto.

6.3.1 Taninos

Dentro de los efectos producidos por la extracción supercrítica sobre la concentración de los taninos solubles totales, se observó que la aplicación de la condición de 150 Bar-70°C produjo una disminución significativa con respecto al control (HSM a condición ambiente) pasando de 6.24 ± 0.13 g/100g a 3.55 ± 0.23 g/100g, representando el 43% de reducción. Sin embargo bajo la condición de 250 Bar-80°C la concentración del compuesto no se vio afectada. En el caso de taninos condensados se presentó un aumento en la cantidad de estos compuestos comparado con el control, una vez sometidos al tratamiento independientemente de la condición ya que en ambas situaciones ocurrió el incremento, siendo aproximadamente de 5.58 ± 0.17 para las dos condiciones con respecto a 4.49 ± 0.14 mg de (+) catequina/g muestra para el grupo control (Figura 14).

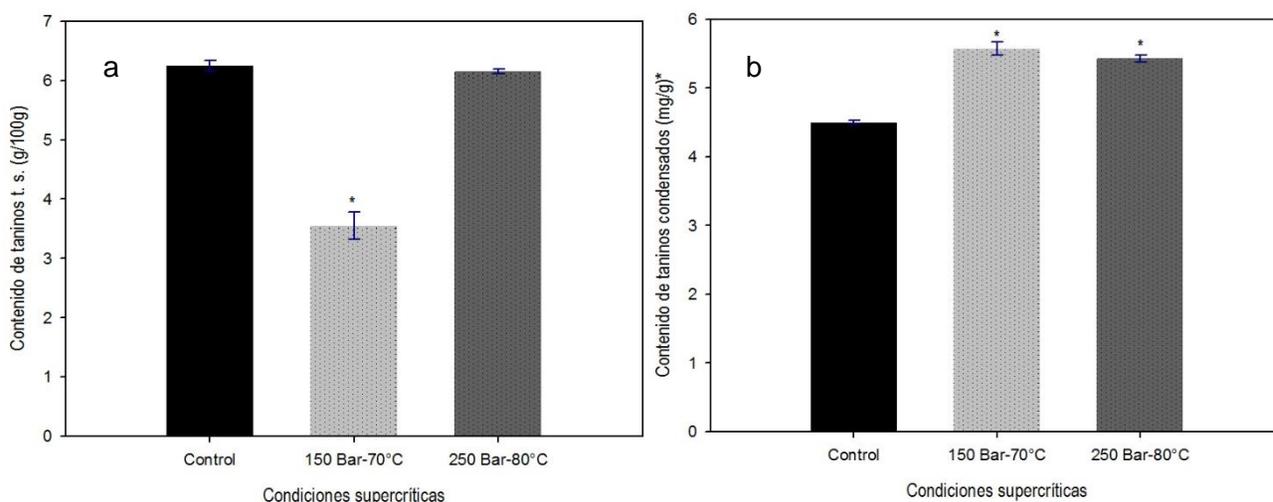


Figura 14. Efecto de fluidos supercríticos (CO₂) sobre el contenido de taninos totales solubles y taninos condensados de la harina de semilla de mango (HSM).

a) Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado \pm EE. Valores con asterisco expresan diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo control por la prueba de Dunnet ($p \leq 0.05$). b) Resultados expresados como la media de determinaciones por triplicado \pm EE. Valores con asterisco expresan diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo control por la prueba de Dunnet ($p \leq 0.05$).

Embaby (2011) observó el efecto producido sobre cacahuate y semillas de ajonjolí sometidas a presión de autoclave (121°C, 15 psi equivalente a 1.03 Bar) durante 20 minutos sobre los taninos presentes, encontrando una reducción del 68.65% del contenido inicial, adjudicando estas reducciones a la degradación por calor del componente no nutritivo o bien a la interacción con las proteínas que forman complejos insolubles no cuantificables. Ibrahim *et al.* (2002) reportó resultados similares al usar presión de autoclave sobre frijol chino (49%), señalando la formación de complejos insolubles con otros compuestos propios del frijol. Las reducciones encontradas en este trabajo son mucho menores que las reportadas en diversos estudios incluso comparadas con la fermentación en estado sólido aquí presentada (50%).

Es posible que la reducción registrada en este trabajo se deba a la migración de los taninos hacia el extracto generado, ya que este método de extracción es empleado para la recuperación de compuestos fenólicos. Markom *et al.* (2007) extrajeron los taninos hidrolizables de *Phyllanthus niruri* encontrando que al aplicar 60°C como temperatura de extracción y 100 Bar como presión del sistema y el uso del 50% de etanol como co-solvente, se lograba recuperar el 18% de los compuestos presentes en el material vegetal, a medida que la cantidad de co-solvente incrementó mayor fue la recuperación. Por lo que esta capacidad de extracción del sistema supercrítico pudiera reducir parcialmente lo contenido en la harina de semilla de mango para ser concentrado en el extracto lipídico. Caso similar pudiera estar ocurriendo con los taninos condensados donde el volumen usado de co-solvente (etanol 10%) no permite su recuperación, Da Porto *et al.* (2014) reportaron que la combinación de 100 Bar a 41°C con 15% de etanol permiten la extracción de taninos condensados provenientes del orujo de uva (38.8 g/Kg), donde el porcentaje de etanol está por encima de lo empleado en la recuperación de estos compuestos (<10%).

6.3.2 Fitatos

Dentro de la cuantificación de fitatos se observó que las condiciones establecidas en el sistema de fluidos supercríticos no ejercieron efecto alguno sobre su contenido en la HSM, ya que la concentración inicial ($0.97 \pm 0.05\%$) no mostró disminución al variar la temperatura o presión obteniéndose valores entre 0.90 y 0.94% (Figura 15).

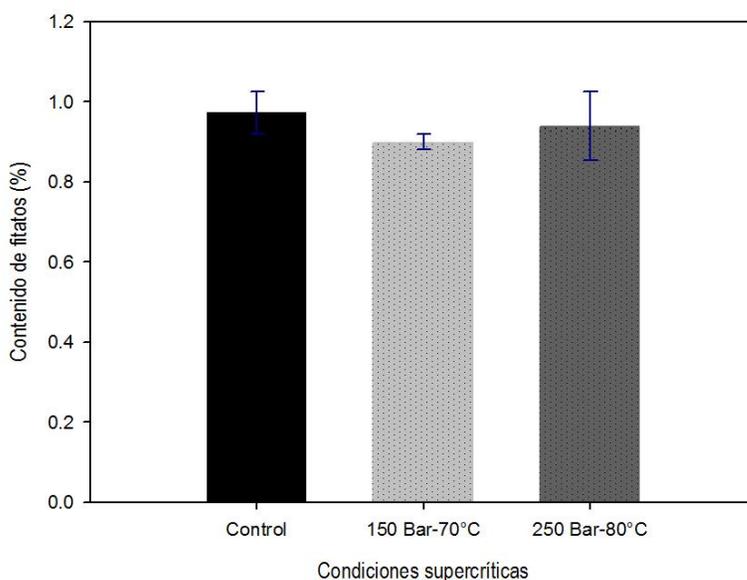


Figura 15. Efecto de fluidos supercríticos (CO_2) sobre el contenido de fitatos de la harina de semilla de mango (HSM). Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado \pm EE. Valores con asterisco expresan diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo control por la prueba de Dunnet ($p \leq 0.05$). % de ácido fítico.

Algunos de los métodos empleados para la reducción del ácido fítico son la presión de cocción y el hervido, cuando éstos fueron usados sobre la vaina de frijol chino se obtuvieron reducciones de 44 y 21% respectivamente, demostrando que el descenso era mejor al aumentar el tiempo de tratamiento. El aparente descenso de los fitatos durante el tratamiento térmico fue atribuido a la formación de complejos insolubles entre las proteínas o bien entre fitato-proteína-mineral o fueron hidrolizados a formas penta y tetrafosfato (Deol & Bains, 2010).

De igual forma se observó el descenso en el contenido de ácido fítico durante el procesado de soya usando métodos como remojo, hervido y presión de autoclave, mostrando reducciones del 20%, 36% y 40% respectivamente, siendo este último el que mejor resultado mostró (Ramadan, 2012)

Linsberger *et al.* (2013) estudió el efecto de las altas presiones y cocción sobre guisantes y frijoles blancos, en donde se registró un descenso del 36% sobre el contenido de ácido fítico sobre los guisantes al incrementar la presión, temperatura y tiempo (600 MPa, 60 minutos, 60°C) no afectando al frijol blanco. Sin embargo la cocción logró mejores efectos de reducción en ambos materiales vegetales al disminuir hasta 48%, siendo posible que el factor antinutricional haya sido liberado en el agua de cocción. Los autores declararon que debido a que no existen trabajos reportados acerca del uso de las altas presiones hidrostáticas sobre los factores antinutricionales no pueden indicar que fue lo que provocó ese descenso.

Por lo tanto es de importancia resaltar que el uso de métodos más sencillos permiten la remoción de fitatos hasta en 50%, contrario al nulo efecto provocado por el CO₂ supercrítico para la HSM, incluso la FES aplicada a la misma materia prima presentó mejores niveles de reducción (60%) que usando este sistema de extracción.

6.3.3 Oxalatos

En el caso de este componente, se observó un efecto contrario en cada condición evaluada en el sistema supercrítico, ya que el efecto de reducción se apreció a los 150 Bar-70°C con valor de 0.12 ± 0.005 mg/100g comparado con el control 1.03 ± 0.01 mg/100g, por otro lado una tendencia contraria ocurrió cuando la harina producida se sometió a 250 Bar-80°C, en la cual se generó un aumento en el contenido de oxalatos (1.63 ± 0.005 mg/100g), observándose el resultado en la figura 16.

La presencia de oxalatos en diversas fuentes alimentarias ha llevado al uso de métodos que permitan su eliminación o reducción a fin de evitar el daño que estos componentes inducen en el organismo. Productos como el taro, soya y almendras fueron sometidos a múltiples tratamientos de destoxificación como remojo, cocción a 65°C, escaldado, presión de cocción y la mezcla de ellos para lograr mejores resultados, en donde encontraron que la disminución de oxalatos al 50% se lograba al combinar métodos, para el taro la combinación de presión de cocción por 7 minutos más escaldado por 1 hora fue la ideal, para la almendra el remojo por 8 horas y cocción a 65°C redujeron un mayor porcentaje de los oxalatos y por último la mezcla de remojo en agua caliente y la presión de cocción por 9 minutos presentó los mejores resultados para la soya (Sekhar & Gurumoorthi, 2011).

Shimi & Haron (2014), señalaron que al someter los vegetales a hervido, la concentración total de oxalatos se redujo aproximadamente al 87% particularmente debido a la pérdida de oxalatos solubles. La cantidad de oxalatos encontrados en el agua de cocción correspondió a la pérdida producida, indicando que este método fue más efectivo que la presión de cocción y el horneado. Resultados similares fueron reportados en un estudio realizado por Raj & Kuwabata (2006) en el cual usaron tres métodos de cocción: hervido, presión de cocción (1.03 Bar) y horneado en el ñame silvestre, sus resultados indicaron que los métodos evaluados fueron efectivos para la reducción, no obstante el hervido fue el mejor tratamiento con una disminución del 45%, debido a la solubilidad del componente en agua caliente, comprendiendo fracciones solubles e insolubles, los autores atribuyen al tratamiento térmico la ruptura en el tejido y la liberación del oxalato soluble hacia el agua de cocción.

El descenso de 88% del contenido de oxalatos en la HSM al aplicar fluidos supercríticos (CO₂), fue mucho mayor al descenso obtenido por la fermentación en medio sólido en este estudio (43%), sin embargo por la falta de información acerca de las modificaciones que pudieran ocurrir en la estructura química de los oxalatos

bajo condiciones supercríticas se podrían estar subestimando o sobrestimando, según sea el caso, los valores reales al finalizar el tratamiento. Por consiguiente se recomienda el uso de metodologías de cuantificación más sensibles que permitan identificar el efecto real de la combinación de presión y temperatura, e incluso la concentración del co-solvente etanólico dada la solubilidad de los oxalatos en éste.

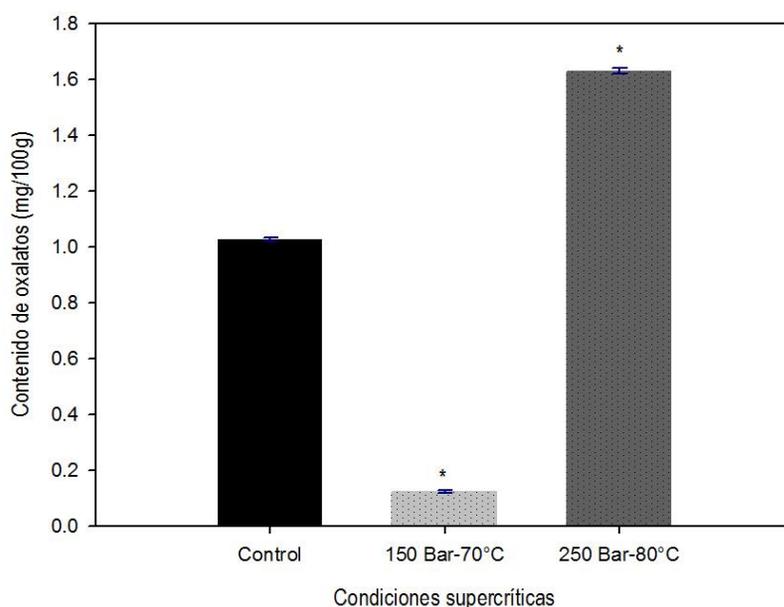


Figura 16. Efecto de fluidos supercríticos (CO₂) sobre el contenido de oxalatos de la harina de semilla de mango (HSM). Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado \pm EE. Valores con asterisco expresan diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo control por la prueba de Dunnet ($p \leq 0.05$).

6.2.4 Ácido cianhídrico

El comportamiento del ácido cianhídrico fue similar al descrito para los oxalatos, para la condición de 250 Bar-80°C sobre la HSM; se presentó un descenso significativo (8.64 ± 0.13 mg/100g) comparado con el control el cual tuvo un valor de 12.48 ± 0.06 mg/100g, lo que representó una reducción del 31% mientras que ocurrió lo contrario al evaluar 150 Bar-70°C ya que se generó un incremento no esperado (15.93 ± 0.13 mg/100g) una vez finalizado el tratamiento (Figura 17), esto debido a la ruptura del tejido vegetal y liberando a los glucósidos cianogénicos presentes, así

mismo ocurre una posible estabilidad en la termosensibilidad sobre la enzima β -glucosidasa presente en la HSM que es conferida por la presión aplicada (150 Bar= 15 MPa y 250 Bar= 25 MPa) , generándose la cianogénesis y por lo tanto el incremento en HCN, por otro lado el descenso se ve relacionado por la temperatura aplicada en el cual el factor antinutricional es degradado. Shiferaw *et al.* (2013) reportaron la estabilidad en la actividad de la enzima β -glucosidasa proveniente de la almendra cuando aplicaron altas presiones hidrostáticas en un intervalo de presión de 0.1 a 100 MPa con temperaturas moderadas (50-70°C) no inactivando la enzima, ocurriendo lo contrario al aplicar 80°C en donde ocurre su degradación. Estos autores indicaron que la presión refuerza las interacciones intramoleculares sobre los puentes de hidrógeno de las proteínas mientras que la aplicación de calor genera el efecto contrario debilitando el enlace, por lo que la enzima genera estabilidad. Por lo que este fenómeno pudiera estar ocurriendo en el sistema supercrítico.

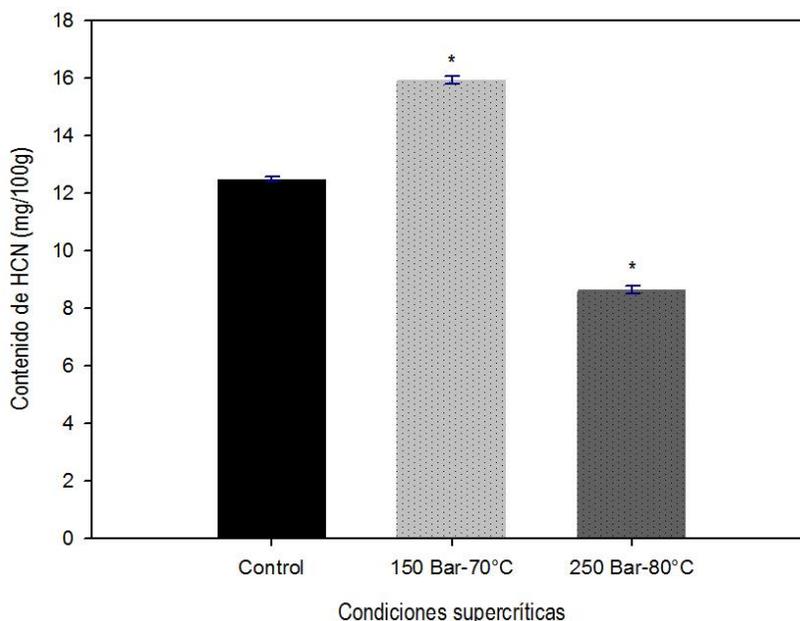


Figura 17. Efecto de fluidos supercríticos (CO₂) sobre el contenido de ácido cianhídrico de la harina de semilla de mango (HSM). Resultados expresados como la media de determinaciones por duplicado \pm EE. Valores con asterisco expresan diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo control por la prueba de Dunnet ($p \leq 0.05$).

Métodos como la biofermentación y el secado al sol así como sus combinaciones han presentado efectos benéficos sobre la reducción de HCN en la yuca, sin embargo la disminución se ve potencializada al combinar otros tratamientos, ya que la biofermentación requiere de períodos de inmersión prolongados donde los microorganismos del medio ambiente fermenten el material de estudio, sobre todo los carbohidratos causando la formación de ácido láctico por lo que el pH decrece de 8 a 6, aumentando la suavidad del vegetal e incrementa la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos por acción de la β -glucosidasa correspondiente, así el posterior secado al sol genera la reducción del componente antinutricional por su volatilidad (Véliz *et al.*, 2002).

Agatemor (2009) empleó piezas de yuca para ser tratadas por diferentes métodos con la finalidad de reducir la concentración de HCN (cocción, remojo, secado al sol). La cocción por 40 minutos logró un descenso significativo casi al 90%, sin embargo al aplicar un remojo previo de 18 horas sobre el alimento esta reducción se vio incrementada, aunque conllevó a tiempos demasiado prolongados de calentamiento que tuvieron como consecuencia un descenso en el color final del material.

En este trabajo, la aplicación de fluidos supercríticos como método para eliminar o reducir el contenido de HCN en la HSM presentó pocas ventajas en cuanto a poder de reducción se refiere, ya que fue más significativa cuando se aplicaron métodos tradicionales logrando disminuciones de hasta 95% que usando esta tecnología de extracción. A pesar de eso, el 33% de reducción logrado por FSC fue significativo si se compara contra el método de fermentación aquí empleando. La falta de estudios sobre las modificaciones que pudiera sufrir la estructura química del HCN al aplicar la extracción supercrítica no permite observar el efecto real del sistema, por lo que las recomendaciones realizadas para los oxalatos son también necesarias para el ácido cianhídrico.

Si bien la aplicación de fluidos supercríticos (CO₂) para la reducción de componentes antinutricionales no generó resultados satisfactorios, se sugieren más estudios para tratar de comprender el rol de cada parámetro de extracción (temperatura, presión, % cosolvente, tipo de cosolvente) en la remoción de los factores antinutricionales, además de aplicar otras técnicas que permitan identificar alteraciones a las estructuras químicas durante la aplicación de esta técnica y con ello poder conseguir mayores valores de reducción.

VII. CONCLUSIONES

Reducciones entre 30 y 60% de factores antinutricionales (taninos, fitatos, oxalatos) por medio de la fermentación sólida usando *A. niger*, hacen de este un método adecuado para la detoxificación de la HSM.

La FES aplicada a 30°C por 72 horas demostró ser más efectivo en la disminución de la mayoría de los factores antinutricionales, observándose sólo para el caso de taninos una mejor reducción a 40° C por el mismo período de tiempo. Esta diferencia pudiera ser atribuida a que dicha temperatura es la óptima para la actividad de la enzima tanasa producida por *A.niger* permitiendo la degradación del compuesto.

Para la reducción del contenido de ácido cianhídrico en la HSM no se recomienda únicamente el uso de la FES, ya que no se consiguió el efecto esperado, es necesario la aplicación de otro tipo de tratamiento que mejore la detoxificación y que conlleve a establecer límites seguros para su uso.

La fermentación en estado sólido empleando *A. niger* permitió el incremento en el contenido de proteína de la HSM una vez concluida la fermentación, generando un producto de mejor calidad nutricional.

La HSM fermentada es un buen producto para ser consumido como ingrediente en productos como galletas, bizcochos, pan, pasta o como suplemento de proteínas en productos que usan mezcla de cereales. El uso de la harina producida puede resultar benéfica para la nutrición humana sobre todo en lugares donde este agroresiduo es abundante.

La aplicación de fluidos supercríticos como método de detoxificación produce menos efectos de reducción en comparación con métodos tradicionales por lo que su uso puede ser limitado.

Son necesarios más estudios para conocer el comportamiento de los factores antinutricionales frente a condiciones combinadas de presión, temperatura, co-solvente empleado y concentración del mismo en un proceso de extracción por fluidos supercríticos, para confirmar la aparente efectividad sobre oxalatos y ácido cianhídrico en la HSM.

VIII. LITERATURA CITADA

- AOAC International. 2000.** Official methods of analysis. 17th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Abreu, M. 1995.** Evaluación nutricional y toxicológica de dos variedades de amaranto de semillas de color negro (*A. uranguesis* y *A. maurensis*). *Revista Cubana de Alimentación Nutrición: Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos*,9(2):1-4.
- Agatemor C. 2009.** Cooking time and steepin time effects ont he cyanide content and sensory quality of cassava slices. *Electronic Journal of Enviromental, Agriculture and Food Chemistry*, 8(3):189-194.
- Ajeigbe S.O., Mohammed A.K., Yahaya I.A. & Oyelowo A.O. 2012.** Effect of processing techniques on levels of minerals and antinutritional factors of *Canavalia ensiformis*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(12): 1121-1124.
- Ajila C.M.; Bhat S.G.; Prasada Rao U.J.S. 2007.** Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102: 1006-1011.
- Ajila C.M.; Leelavathi K.; Prasada Rhao U.S.J. 2008.** Improvement of dietary fibre content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48(2): 319-326.
- Ajila C.M.; Aalami M.; Leelavathi K. Prasada Rao U.J.S. 2010.** Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 219-224.
- Ajila C.M.; Prasada Rao U.J.S. 2013.** Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of Functional Foods*, 5: 444-450.

- Anupama & Pogaku R. 2001.** Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(1): 79-88.
- Arogba S.S. 1997.** Physical, chemical and functional properties of Nigerian mango (*Mangifera indica* L.) kernel and its processed flour. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 73:321-328.
- Arts ICW., VandePutte B & Hollman P.C.H. 2000.** Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetable, staple foods and processed food. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 1746-1751.
- Ayala- Zavala J.F.; Rosas-Dominguez C.; Vega-Vega V.; González-Aguilar G.A. 2010.** Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh cut fruits using their own byproducts: Looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8): 175-181.
- Ayala-Zavala J.F; Vega-Vega V; Rosas-Domínguez C; Palafox Carlos H.; Villa-Rodríguez J.A.; Wasim-Siddiqui M.; Dávila-Aviña J.E.; González-Aguilar G.A. 2011.** Agro-industrial potencial of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44: 1866-1874.
- Ayuk A.A., Iyayi E.A., Okon B.I., Ayuk J.O & Jang E. 2014.** Biodegradation of antinutritional factors in whole leaves of *Enterolobium cyclocarpum* by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Journal of Agricultural Science*, 6(10): 188-196.
- Batista K.A., Prudencio Sandra H. & Fernandes K.F. 2010.** Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard to cook

common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Journal of Food Science*, 75(3): 286-290.

Baraldo Junior A., G. Borges D., W. Tardioli P. & S. Farinas C. **2014**. Characterization of B-glucosidase produced by *Aspergillus niger* under solid state fermentation and partially purified using MANEA-Agarose. *Biotechnology Research International*, 1-8.

Bea-Wu James S.; Chang- Wu M. & Ping-Wei Yu. **2005**. Tropical Fruits en *Processing Fruits, Science and Technology*. CRC Press LLC. USA.

Beckman E.J. **2004**. Supercritical and near critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *Journal of Supercritical Fluids*, 28: 121-191

Belmares R., Contreras Esquivel J.C., Rodríguez Herrera R., Ramírez Coronel A. & Noé Aguilar C. **2004**. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37:857-864.

Berardini Nicolai; Knödler Matthias; Schieber Andreas & Carle Reinhold. **2005**. Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6: 442-452.

Bohn T., Davidsson Lena, Walczyk Thomas & F.H. **2004**. Phytic acid added to white-bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(3): 418-423.

Bradford, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

- Braga** M.E.M., Silvania R.M., Moreschi M. & A.Meireles A. **2006**. Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches. *Carbohydrate Polymers*, 63: 340-346.
- Brunner** G. **2005**. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67: 21-33.
- Caliskan** M. **2000**. The metabolism of oxalic acid. *Turkish Journal of Zoology*, 24: 103-106.
- Cannel** E. & Moo-Young M. **1980**. Solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, 15: 2-7.
- CEMANGO**. **2010**. Consejo Estatal del Mango de Guerrero A.C. Consultado Marzo 2013. (En línea) <http://mi.yasalte.com/cemango/>
- COVECA**, **2011**. Monografía del mango. Gobierno del Estado de Veracruz. Consultado Marzo 2013. (En línea) <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/TAB4003236/MONOGRAFIA%20MANGO2011.PDF>.
- Coulibaly** A., Kouakou B. & Chen J. **2011**. Phytic acid in cereal grains: Healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1:1-22.
- Chung** King T., Wong Yee T., Wei Cheng-I., Huang Y. Weng & Lin Yuan. **1998**. Tannins and Human Health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6):421-464.

- Crane** J. H. & Campbell C. W. **1991**. El mango en Florida. Universtiy of Florida IFAS Extension. Consultado Marzo 2013. (En línea) <http://miamidade.ifas.ufl.edu/old/programs/tropicalfruit/Publications/EL%20MANGO.pdf>
- Dakare** M.A.; Ameh D.A.; Agbaji A.S.; Atawodi S.E. **2012**. Efec of processing techniques on the nutritional and antinutritional contents of mango (*Mangifera indica*) seed kernel. *World Journal of Young Researchers*, 2 (3): 78-82.
- Da Porto** C., Decorti D. & Natolino A. **2014**. Water and etanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: A comparison and a proposal. *Journal of Supercritical Fluids*, 87: 1-8.
- Deol** J.K. & Bains K. **2010**. Effect of household cooking methods on nutritional and antinutritional factors in green cowpea (*Vigna unguiculata*) pods. *Journal of Food Science and Technology*, 47(5): 579-581.
- De Dios** Elizalde A., P. Porrilla Y.; C. Chaparro D.C. **2009**. Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7(1): 45-54.
- Delgado**, E.J. **1998**. Factores antinutricionales. *Curso de fisiología digestiva*. ICA. La Habana, Cuba. p 2.
- Deshpande** Sudhir S., Cheryan M., Salunkhe D.K. & Luh S. **1986**. Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24 (4): 401-449.
- Diarra**, S.S. **2014**. Potential of mango (*Mangifera indica* L.) seed kernel as a feed ingredient for poultry: a review. *World's Poultry Science Journal*, 70: 279-288.
- Difo** H.V., Onyike E., A. Ameh D., S.Ndidi Uche & C. Njoku G. **2014**. Chemical changes during open and controlled fermentation of cowpea (*Vigna*

unguiculata) flour. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 5(1): 1-10.

Dorta Eva; Lobo Gloria M.; González Mónica. **2012**. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 45: 261-268.

Duffus, Carol & Slaughter, C. **1985**. Las semillas y sus usos. México: A.G.T. p. 10-11, 18-21, 32-35, 102-107, 122.

D'Mello, J. **2000**. Antinutritional factors and mycotoxins. En: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CABI Publishing. Wallingford, Inglaterra, p. 383-403.

Ekundayo F.O.; Oladipupo O.A.; Ekundayo E.A. **2013**. Studies on the effects of microbial fermentation on bush mango (*Irvingia gabonensis*) seed cotyledons. *African Journal of Microbiology Research*, 7(34): 4363-4367.

Elleuch M.; Bedigian D.; Roiseux O.; Besbes S.; Blecker C.; Attia H. **2011**. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124: 411-421.

Embaby H. E. **2011**. Effect of heat treatments on certain antinutrients and *in vitro* protein digestibility of peanut and sesame seeds. *Food Science and Technology Research*, 17(1): 31-38.

Fadahunsi, I. F. 2009. The effect of soaking, boiling and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the water soluble vitamin content of Bambara groundnut. *Journal of Nutrition*, 8: 835- 840.

- Falade** M.S; Owoyomi O. Harwood C.E; Adewusi S.R.A. **2005**. Chemical composition and starch hydrolysis of *Acacia colei* and *Acacia tumida* seeds. *Cereal Chemistry*, 82 (5): 479-484.
- FAO - Agronoticias. 2012**. Boletín Food and Agriculture Organization of the United Nation- Agronoticias América Latina y el Caribe. Consultado Abril 2013. (En línea)[http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/?dyna_fef\[uid\]=159358](http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/?dyna_fef[uid]=159358)
- FAOSTAT. 2011**. Base de datos estadísticos de la FAO. Consultado Marzo 2013. (En línea) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Febles**, Acosta Clara I. **1998**. Estudio del contenido de fitatos en derivados de cereales de consumo en Canarias. [Tesis Doctoral]. Universidad de la Laguna. España.
- Fadahunsi** I.F. **2009**. The effect of soaking, boiling and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on water soluble vitamin content of Bambara groundnut. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(6): 835-840.
- Fekadu** H., Fekadu B. & Desse G. **2013**. Effect of traditional processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors of Anchote (*Coccinia abyssinica* (lam.) Cong) tubers grown in western Ethiopia. *Journal of Food Processing and Technology*, 4(7):249-256.
- Fekadu** Gemede Habtamu & Ratta Negussie. **2014**. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(4):284-289.
- Food Standard Australia, New Zealand. 2004**. Cyanogenic glycosides in cassava and bamboo shoots. *Technical Report Series No. 28*. 24p.

- Fowomola M.A. 2010.** Some nutrients and antinutrients contents of mango (*Mangifera indica*) seed. *African Journal of Food Science*, 4(8): 472-476.
- Francisco Ilza A. & Pimenta Pinotti M. Helena. 2000.** Cyanogenic glycosides in plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43(5):487-492
- Galán S. 2009.** El cultivo del mango. Ed. Mundi-Prensa. España.
- Galanakis C.M. 2012.** Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, 26(2): 68-87.
- García D.E. 2004.** Principales factores antinutricionales de las leguminas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y Forrajes*. 27(2): 101-116.
- García I. 2003.** Caracterización fisicoquímica y funcional de los residuos de mango criollo (*Mangifera indica* L) y su incorporación en galletas. [Tesis de Maestría] Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca.
- Gao You-ling, Wang Cai-sheng, Zhu Qiu-hua & Qian Guo-ying. 2013.** Optimization of solid state fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for trypsin inhibitor degradation in soymeal. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(5) 869:876.
- Gupta R. Kishor, Gangoliya S.S & Singh N. Kumar. 2013.** Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of Food Science and Technology*., 1-9.
- Hassan L.G., Muhammad A.B., Aliyu R.U., Idris Z.M., Izuague T., Umar K.J. & Sani N.A. 2013.** Extraction and characterization of starches from four varieties of *Mangifera indica* seeds. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, (3(6): 16-23.

Heuzé V.; Tran G.; Bastianelli D.; Archimède H.; Lebas F. **2013.** Mango (*Mangifera indica*) fruit and by-products. A programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. Consultado Abril 2013. (En línea) <http://www.feedipedia.org/node/516>

Holmes R. P, Kennedy M. **2002.** Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney International.*, 57(4):1662-1667.

Hui. H.Y. 2007. Handbook of food products manufacturing. Ed.Wiley-Interscience. USA. 2308 pp.

Ibrahim S.S., Habiba R.A., Shatta A.A & Embaby H.E. **2002.** Effect of soaking, germination, cooking and fermentation on antinutritional factors in cowpeas. *Nahrung/Food*, 46 (2):92-95.

Igbabul B.D., Amove J. & Twadue I. **2014.** Effect of fermentation on the proximate composition antinutritional factors and functional properties of cocoyam (*Colocasia esculenta*) flour. *African Journal of Food Science and Technology*, 5(3): 67-74.

Imelda J. R., Raj Paul & Bhatnagar D. **2008.** Effect of solid state fermentation on nutrient composition of selected feed ingredients. *Indian Journal of Fisheries.*, 55(4): 327-332.

INEGI. 2010. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Encuesta industrial mensual. Consultada Marzo 2013. (En línea) http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/encuestas/establecimientos/eim/mensual/eim.pdf

Jahurul M.H.A., Zaidul I.S.M., Norulaini N.N.A., Sahena F., Jaffri J.M. & Omar A.K.M. **2014.** Supercritical carbon dioxide extraction and studies of mango

seed kernel for cocoa butter analogy fats. *CyTA-Journal of Food*, 12(1): 97-103.

Joslyn, M.A. 1970. Methods in food analysis. 2nd. Eds. Academic press. London. 845.

Kayode R.M.O. & Sani A. 2008. Physicochemical and proximate composition of mango (*Mangifera indica*) kernel cake fermented with mono-culture of fungal isolates obtained from naturally decomposed mango kernel. *Life Science Journal*, 5(4): 55-63.

Kayode R.M.O., Sani A., Olayode C.O., Annongu A.A., Arekemase M.O., Obalowu M.A. & Abdulsalam K.O. 2013. Physico-chemical and antinutritional characterization of the kernels of some mango (*Mangifera indica*) cultivars grown in Western parts of Nigeria. *Food Science and Quality Management*, 22: 1-8.

Kaur Kiran D., Jha Alok, Sabikhi L. & Singh A.K. 2012. Significance of coarse cereals in health and nutrition: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 1-13.

King Thom C., Tit Yee W., Cheng I.W., Yao Wen H. & Yuan L. 1998. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6): 421-464.

Kittiphoom, S. 2012. Utilization of mango seed. *International Food Research Journal*, 19(4): 1325-1335.

Kumari M. & Jain S. 2012. Tannins: An antinutrient with positive effect to manage diabetes. *Research Journal of Recent Science*, 1(12): 70-73.

Liebman M. & Al- Wahsh I.A. 2011. Probiotics and other key determinants of dietary oxalate absorption. *Advance in Nutrition*, 2: 254-260.

Liener, M. 1997. Plant lectins properties, nutritional significance and function. En: *Antinutrients and phytochemical in food*. American Chemical Society. USA.

Linsberger Martin G., Weiglhofer K, Thi Phuong T. P. & Berghofer E. 2013. High hydrostatic pressure influences antinutritional factors and in vitro protein digestibility of split peas and whole white beans. *LWT-Food Science and Technology*, 51: 331-336.

Markom M., Hasan M., Wan Daud W.R., Singh H. & Md Jahim J. 2007. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52: 487-496.

Martínez, B.; Ibañez, M.; Rincón, F. 2002. Ácido fítico: Aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 52(3): 219-231.

Martínez R. José A. 2005. Hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado con invertasa y *Aspergillus niger* inmovilizados en el medio de cultivo sólido. [Tesis de Maestría] Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Medina Carlos; Paredes Alison; Rodríguez Ma. E.; Moreno Mario; Belén-Camacho Douglas; García David; Ojeda Carlos. 2010. Evaluación de dos métodos de extracción de almidón a partir de cotiledones de mango. *Bioagro*, 22(4): 67-74.

Medugu C.I., Saleh B., Igwebuike J.U & Ndirmbita R.L. 2012. Strategies to improve the utilization of tannin-rich feed materials by poultry. *International Journal of Poultry Science*, 11(6):417-423.

- Mendiola** León J.A. **2008**. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Midjavila**, S. **1998**. Sustancias nocivas en los alimentos. En: Toxicología de los alimentos. Derache, R.Eds. Omega. Barcelona, España. p. 109-115.
- Mitchell** D.A. **1992**. En Solid substrate cultivation. Elsevier Sci. Publ. Ltd. London and New York. 17-20.
- Mohamed** M.E., Amro B. Hassn, Mashier A.S. & Elfadil E.B. **2007**. Effect of processing followed by fermentation on antinutritional factors content of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) cultivars. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(5): 463-467.
- Moyler** D.A. **1993**. Extraction of flavours and fragrances. En: *Extraction of natural products using near-critical solvents*. Eds. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Muchoki** CN, Lamuka PO & Imungi JK. **2010**. Reduction of nitrates oxalates and phenols in fermented solar-dried store cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaf vegetables. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 10(11): 4398- 4412.
- Mudgett** R.E.; Nash J.; Ruther R. **1992**. Controlled gas environments in solid state fermentations. *Developments in Industrial Microbiology*, 34: 1217-1233.
- Mukhopadhyay** M. **2000**. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Eds. CRC Press LLC. USA.

- Nadeem M., Muhammad Anjum F., Muhammad Amir R., Moazzam Rafiq K., Hussain S. & Sameem Muhammad J. 2010.** An overview of antinutritional factors in cereal grains with special reference to wheat: A review. *Pakistan Journal of Food Science*, 20: 54-61.
- Neira Vielma A.A., Nava Reyna E., Illina A., Michelena Alvarez G., Gaona Lozano J.G. & Martínez Hernández J.L. 2013.** Aspectos fundamentales de las fitasas. *Investigación y Ciencia*, 21(57): 58-63.
- Nigam P.& Singh D. 1994.** Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology*, 34:405-423.
- Noonan S.C. & Savage G. P. 1999.** Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pacific Journal of Clinic Nutrition.*, 8(1):64-74.
- Ojokoh A.O. 2011.** Physiochemical properties and antinutrient content of fermented popcorn and groundnut composite flours using pure strains. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 23:35-39.
- Osman A. Magdi. 2011.** Effect of traditional fermentation process on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet during preparation of Lohoh. *Journal of the Saudi Society of Agriculture Sciences*, 10: 1-6.
- Omotubga S. K.; Ashifat A.A. ; Kehinde A.S.; Olayinka O.O.; Edugbola G.O. 2012.** Proximate evaluation of nutritional value of mango (*Mangifera indica*) *International Journal Research in Chemistry and Environment*, 2(4): 244-245.
- Owenzulo J.C. & Nwabugwu C.C. 2009.** Fermentation of millet (*Pennisetum americanum*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds for flour production: Effects on composition and selected functional properties. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(6):737-744.

- Palmer M. V. & Ting S.S.T. 1995.** Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry*, 52: 345-352.
- Pandey A.; Azmi W.; Singh J.; Banerjee U.C. 1999.** Types of fermentation and factors affecting it. En: *Biotechnology-Food Fermentation*. Joshi V.K, Paney A. Eds. Educational Publishers, New Delhi.
- Pandey A.; Selvakumar P.; R. Soccol C.; Nigam P. 1999a.** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, 77(1): 149-162.
- Pastrana L. 1996.** Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(3)4-12.
- Paterson, R.T. 1993.** Use of trees by livestock:Antinutritive factors. Eds. Natural Resources Institute, UK.
- Pérez G. N. ; Torrado A.A.; López M.C.; Pastrana L. 2003.** Main characteristics and application of solid state fermentation. *Electronic Journal of Enviromental, Agriculture and Food Chemistry*, 2(3): 343-356.
- Prakasham R.S., Rao C.S. & Sarma P.N. 2006.** Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus sp.* In solid state fermentation. *Bioresources Technolgy*, 97:1449-1454.
- Prieto-Martínez J. J.; Covarrubias-Alvarado J. E.; Romero-Cadenas A.; Figueroa-Viera J.J.; Munro-Olmos J.J. 2005.** Paquete tecnológico para el cultivo de mango en el Estado de Colima. Secretaría de Desarrollo Rural. Gobierno del Estado de Colima. Consultado Marzo 2013. (En línea) <http://www.cadenahortofruticola.org/admin/bibli/29mango.pdf>.

- Raimbult M. 1998.** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3): 1-15.
- Raj B. M. & Kawabata J. 2006.** Cooking effects on oxalate, phytate, trypsin and α -amylase inhibitors of wild yam tubers of Nepal. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 524-530.
- Ramadan E.A. 2012.** Effect of processing and cooking methods on the chemical composition, sugar and phytic acid of soybeans. *Food and Public Health*, 2(1):11-15.
- Ravindran S. & Sivakanesan R. 1996.** The nutritive value of mango seed kernels for starting chicks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71: 245-250.
- Reddy, N. R. 2002.** Occurrence, Distribution, Content and Dietary Intake of Phytate. En: *Food Phytates*, Eds. CRC Press, London.
- Robinson T.; Singh D. ; Nigam P. 2002.** Fermentación en estado sólida: Una tecnología microbiana promisorio para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae*, 9(2): 27-36.
- Rodríguez C.S.& Sanromán M.A. 2006.** Application of solid state fermentation to food industry: A review. *Journal of Food Engineering*, 76: 291-302.
- Rodríguez Durán L.V., Valdivia Urdiales B., Contreras Esquivel J.C., Rodríguez Herrera R. & Noé Aguilar C. 2010.** Química y biotecnología de la tanasa. *AQM-Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2(4):1-10.
- Ruijter George J.G., Van de Vondervoot J. I. & Visser Jaap. 1999.** Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces

citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology*, 145:2569-2576.

Sajo M.B.; Idi A.; Umar A. 2011. Microbiological features of solid state fermentation and its applications- An overview. *Research in Biotechnology*, 2(6): 21-26.

SAGARPA- Sistema producto mango. 2013. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado Mayo 2013. (En línea) <http://www.mango.gob.mx/index.php?portal=mango>.

Sekhar Dash S. & Gurumoorthi P. 2011. Studies on effects of processing on oxalates content in agricultural produce (*Colocasia esculenta*, *Prunus dulcis*, *Glycine max*). *Internet Journal of Food Safety*, 13: 270-274.

SIAP, 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado Marzo 2013. (En línea) http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350.

SIAP-DISEMINA. 2012. Boletín Disemina-Estadísticas del sector agroalimentario y pesquero. En Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado Marzo 2013. (En línea) <http://www.siap.gob.mx/opt/123/77/76.html>

Sibakov J., Myllymäki O., Holopainen U., Kaukovirta-Norja A., Hietaniemi V., Pihlava J.M., Poutanen K. & Lehtinen P. 2011. Lipid removal enhances separation of oat grain cell Wall material from starch and protein. *Journal of Cereal Science*, 54(1): 104-109.

- Soetan** K.O., & Oyewole O.E. **2009**. The need for adequate processing to reduce the antinutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: A review. *African Journal of Food Science*, 3(9): 223-232.
- Sumaya-Martínez** Ma. Teresa; Sánchez-Herrera Leticia M.; Torres-García Gerardo; García-Paredes Diego. **2012**. Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 30: 826-833.
- Schlemmer** Ulrich, Frolich W., M. Prieto R. & Grases F. **2009**. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intakes, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53:330-375.
- Schuster** E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C & Van Dijck P.W.M. **2002**. On the safety of *Aspergillus niger*- a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 9:426-435.
- Sharath** B.S., Mohankumar B.V. & Somashekar D. **2014**. Bio-detoxification of phorbol esters and other antinutrients of *Jatopha curcas* seed cake by fungal cultures using solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-8.
- Shaw** W. **2014**. Oxalates: Test implications for yeast and heavy metals. The great plains Laboratory Inc. Consultado Noviembre 2014. (En línea) <http://www.greatplainslaboratory.com/home/eng/oxalates.asp>
- Shiferaw** T. Netsanet, Sheean P., Fernando Susil & Versteeg C. **2013**. The stability of almond β -glucosidase during combined high pressure-thermal processing: a kinetic study. *Applied Microbiology and Biotechnology*., 97: 2917-2928.

Shimi Ghazalesh & Haron Hashah. 2014. The effects of cooking on oxalate content in Malayasian soy-based dishes: Comparison with raw soy products. . *International Food Research Journal*, 21(5): 2019-2024.

Smail T., Salhi O. & Knapp J.S. 1995. Solid state fermentation of carobs pods by *Aspergillus niger* for protein production: effect of particle size. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11: 171-173.

Smithard R. 2002. Secondary plant metabolites in poultry nutrition. En: *Poultry feedstuffs: Supply, composition and nutritive value*. McNab, J. & Boorman, K. Eds. Wallingford Inglaterra: CABI Publishing.

Tharanathan R.N.; Yashoda H.M.; Prabha T.N. 2006. Mango (*Mangifera indica L.*), The King of fruits: An overview. *Food Reviews International*, 22: 95-123.

Ukpabi, U. J. & Ejidoh, J. I. 1989. Effect of deep oil frying on the oxalate content and the degree of itching of cocoyams (*Xanthosoma* and *Colocasia* spp). Technical paper presented at the 5 th Annual Conference of the Agricultural Society of Nigeria, Federal University of Technology, Owerri, Nigeria, 3-6 Sept.

Van de Merbel N.C., Ruijter G. J., Lingerman H., Brinkman U.A. & Visser J. 1994. An automated monitoring system usin on-line ultrafiltration and colum liquid chromatography for *Aspergillus niger* fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41:658-663.

Velasco J. R., Villada S. H & Carrera J.E. 2007. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1): 53.65.

- Véliz** Tania, Valente A., Valcárcel L. & Noa Mario. **2002**. Detection of cyanide and comparison of two methods for its detoxification in cassava (*Manihot esculenta crantz*). *CENIC-Ciencias Químicas*,, 33(1): 3-6.
- Ventura** J., Belmares R., Aguilera Carbo A., Gutiérrez Sánchez G., Rodríguez Herrera R. & Noé Aguilar C. **2008**. Fungal biodegradation of tannins from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) and Tar Bush (*Flourensia cernua*) for gallic and ellagic acid production. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2):213-217.
- Vetter** J.**2000**. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38:11-36
- Viniegra** Gonzalez G.; Favela Torres E.; Aguilas C.; Romero G. S.; Díaz G. G.; Augur C. **2003**. Advantage of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 157-167.
- Wadamori** Yukiko, Vanhanen Leo & P. Savage G. **2014**. Effect of Kimchi fermentation on oxalate levels in silver beet (*Beta vulgaris* var. cicla). *Foods*, 3: 269-278.
- Wheeler** E.L. & Ferrel, R.E. **1971**. A method for phytic acid determination in wheat fractions. *Cereal Chemistry*, 48: 312-316
- Wyatt** C. & Triana A. **1994**. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca and phytates in foods commonly consumed in Northern Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 204-209.
- Zaidul** I.S.M., Norulaini N.A.N., Mohd O.A.K. & Smith R. L. Jr. **2007**. Blending of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extracted palm kernel oil fractions and palm oil to obtain cocoa butter replacers. *Journal of Food Engineering*, 78:1397-1409.

Zein R. E., El-Bagoury, A. A., & Kassab, H. E. 2005. Chemical and nutritional studies on mango seed kernels. *Journal of Agricultural Science, Mansoura University*, 30(6), 3285–3299.

Zhou J. & Erdman J. 1995. Phytic acid in health and disease. *Food Science and Nutrition*, 35: 495-508.

IX. ANEXOS

a) Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de taninos condensados.

Preparación de reactivos:

Vainillina al 1%: 0.5 g aforado en 50 mL de metanol, proteger de la luz.

HCL/MeOH al 8%: 21.6 mL de HCL aforado a 100 mL con Metanol.

HCL/MeOH al 4%: 10.8 mL de HCL aforado a 100 mL con Metanol.

Vainillina al 1:1 HCL: 20 mL de vainillina al 1 % + 20 mL de HCL/MeOH al 8%.

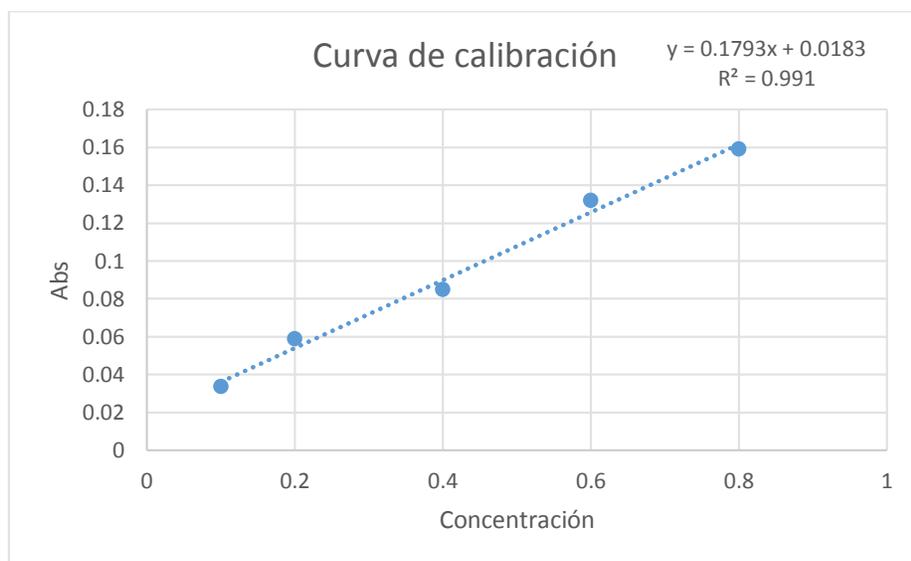
Solución stock: 0.20 mg de (+) Catequina aforado en 25 mL de metanol.

Metodología:

Se prepararon 18 viales color ámbar con tapa (previamente rotulados), para cada punto de la curva de calibración se adicionó a cada vial la cantidad y proporciones de reactivos que indica la siguiente tabla, cada punto de la curva se realizó por triplicado, se anexó un punto extra (0.02) a la curva de calibración para tener un rango más amplio de medición.

Dilución	Reactivos	Concentración (mg/mL)
1	2000µL sol. Stock	0.8
2	1000 µL dil. 1+1000 µL metanol	0.4
3	1000 µL dil. 2+1000 µL metanol	0.2
4	1000 µL dil. 3+1000 µL metanol	0.1
5	750 µL sol. Stock + 250 µL metanol	0.6
6	25 µL sol. Stock + 975 µL metanol	0.02

Los viales se taparon inmediatamente después de colocar los reactivos, se montó en microplaca 50 μ L de cada vial y se adicionó 200 μ L de Solución Vainillina 1:1 HCl, para el blanco se empleó 50 μ L de metanol + 200 μ L de vainillina 1:1 HCl. A continuación se muestra la curva de calibración obtenida.



b) Preparación de la curva de calibración con BSA (sero-albúmina bovina) para la cuantificación de proteína total

Preparación de reactivos:

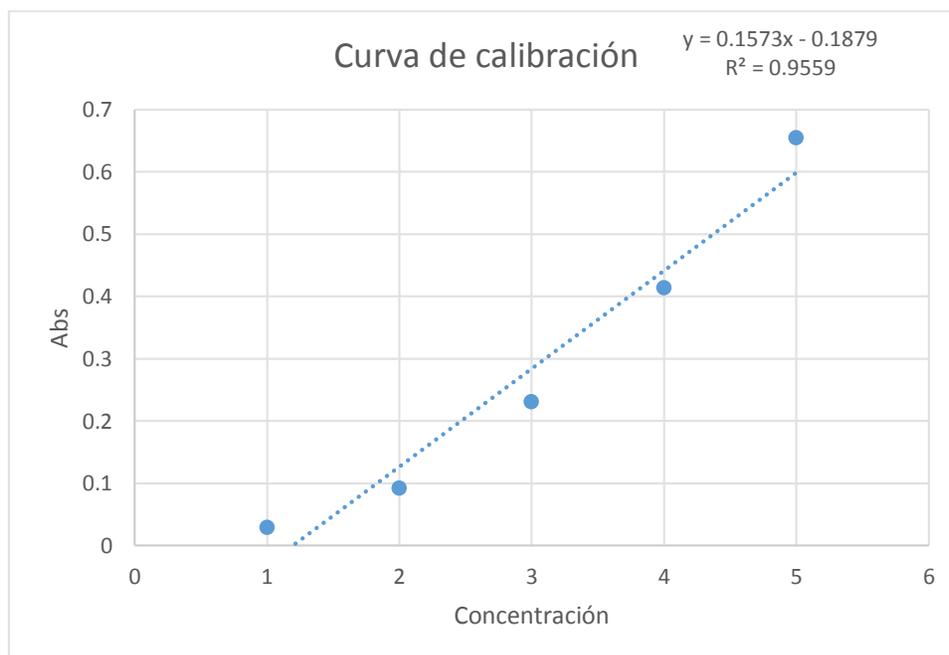
Reactivo de Bradford: 100 mg de Coomasie (gel) en 50 mL de etanol al 95%+100 mL de ácido fosfórico. Se afora a 1 L y se filtra doblemente. Almacenar en frasco ámbar a 4°C.

Metodología:

Se prepararon 12 tubos eppendorf (previamente rotulados), para preparar cada punto de la curva de calibración se adicionó a cada tubo la cantidad y proporciones de reactivos que indica la siguiente tabla, cada punto de la curva se realizó por duplicado.

Dilución	Reactivos	Concentración (mg/mL)
1	100µL de BSA+100 µL de agua destilada	1
2	100µL dil. 1+100 µL de agua destilada	0.5
3	100µL dil. 2+100 µL de agua destilada	0.25
4	100µL dil. 3+100 µL de agua destilada	0.125
5	100µL dil. 4+100 µL de agua destilada	0.0625
6	100µL dil. 5+100 µL de agua destilada	0.03125

En tubo de vidrio previamente rotulados, se colocaron 20 µL de cada punto y se adicionó 1 mL del reactivo de Bradford. Se dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente. Posterior se leyó a 595 nm, para el blanco se empleó 20 µL de agua destilada +1 mL del reactivo de Bradford. A continuación se muestra la curva de calibración obtenida.



c) Técnicas empleadas para la caracterización en la composición química de la HSM (AOAC, 2000)

▪ Humedad

1. Preparar crisol o cápsula limpio, colocándolo a peso constante (60 °C/24 h)
2. Sin tocarlo con las manos pasarlo a un desecador para enfriar hasta llegar a temperatura ambiente y pesar (Po)
3. Pesar en la cápsula 3 g de muestra tamizada en balanza, tomar registro (P1)
4. Colocar cápsula con ayuda de pinzas, en estufa de secado, evaporar el agua a 60°C/24 h ó 105°C/3 h
5. Retirar muestras con ayuda de pinzas, colocar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar (P2)
6. Calcular usando:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P1-P2}{Pm} * 100$$

Donde:

P1 es el peso del crisol (Po) más la muestra húmeda

P2 es el peso de la muestra seca en el crisol

Pm es el peso de la muestra (>3 g)

▪ Cenizas

1. Colocar crisol de porcelana a peso constante (60 °C/24 h), posterior pasarlos a desecador sin tocar, dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar (Po)
2. Pesar 2 g de muestra en el crisol previamente pesado (Pm)
3. Carbonizar la muestra sobre parrilla de calentamiento o mechero, hasta que deje de liberar humo (cuidar que no se incendie)
4. Colocar mufla a 550°C-600° C por 3 horas, mantener temperatura hasta que cenizas adquieran un color blanco o gris-blanco
5. Pasado el tiempo necesario, retirar crisol con ayuda de pinzas y dejar enfriar en desecador, pesar (P2)
6. Calcular usando:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P2-Po}{Pm} * 100$$

Donde:

Po es el peso de crisol vacío

P2 es el peso de la muestra incinerada en el crisol

Pm es el peso de la muestra (>2 g)

▪ Grasa

1. Muestra seca, molida y tamizada a 1mm
2. Colocar a peso constante papel filtro (60°C/24 h)
3. Pesar 3 g de la muestra preparada en el papel filtro secado (Pm)
4. Colocar matraz d extracción a peso constante (103°C/30 min), pesar (P1)
5. Colocar matraz de extracción al sistema soxhlet, el papel filtro se coloca en el tubo de extracción y se adiciona al matraz éter de petróleo o hexano
6. Extraer la muestra con el solvente por 6-8 horas a velocidad de condensación de 3-6 gotas/seg
7. Una vez terminada la extracción, eliminar el solvente mediante campana de extracción con parrilla a 100°C, hasta no percibir el olor al solvente
8. Secar el matraz con la grasa en la estufa a 103°C/10 minutos a peso constante. Enfriar en desecador y pesar (P2)
9. Calcular usando:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P2 - P1}{Pm} * 100$$

Donde:

P1 es el peso de matraz de extracción a peso constante

P2 es el peso del matraz con la grasa recuperada

Pm es el peso de la muestra (>3 g)

▪ Proteína

1. Pesar 1 g de muestra molida, seca y desgrasada, colocar en matraz kjeldhal
2. Añadir catalizador (0.4 g de sulfato cúprico, 3.5 g de sulfato de sodio)
3. Añadir 15 mL de H₂SO₄ concentrado

4. Las muestras son colocadas en el digestor, a una temperatura inicial de 300°C por 1:30 h, posterior incrementar a 400°C hasta que la coloración sea verde claro (indica fin de la digestión)
5. Una vez digerida enfriar a temperatura ambiente en campana de extracción, posterior a eso 100 mL de agua destilada y 50 mL de NaOH 40%, colocar en el destilador
6. Se recibe destilado en matraz Erlenmeyer con 15 mL de H₂SO₄ 0.2 N y 2 gotas de indicador rojo de metilo, destilar mínimo 50 mL
7. El destilado se titula con NaOH 0.2 N hasta que la coloración roja desaparezca virando a amarillo
8. Calcular usando:

$$\% N = \frac{(mL \text{ ácido})(N \text{ ácido}) - (mL NaOH)(N NaOH)(1.4)}{Pm} * 100$$

$$\% P = (\%N)(F)$$

Donde:

mL ácido= 15 mL H₂SO₄ 0.2 N

N ácido= 0.2 N (valorar)

mL NaOH= mL gastado al titular

N NaOH= 0.2 N (valorar)

F= 6.25 general

- Fibra cruda
 1. Homogenizar y moler la muestra
 2. Extraer con éter de petróleo si el contenido de grasa es superior a 1%
 3. Pesar 2 g de muestra preparada en un vaso berzelius (m)
 4. Agregar 200 mL de H₂SO₄ 0.255 N, hirviendo
 5. En el equipo conectar a reflujo y hervir exactamente 30 minutos
 6. Filtrar con papel filtro No. 4 previamente pesado (Pp) con embudo büchner con bomba de vacío
 7. Lavar con 50 a 75 mL de agua destilada hirviendo, repetir lavado con 3 porciones de 50 mL de agua o hasta el cese de la reacción ácida

8. Colocar el residuo del matraz con ayuda de una piseta conteniendo 200 mL de NaOH 0.313 N caliente y dejar hervir 30 minutos
9. Lavar con 75 mL de agua hirviendo y repetir lavada hasta neutralidad
10. Secar el papel filtro en estufa 130°C/2 h, enfriar a temperatura ambiente y pesar (Ps)
11. Incinerar 30 minutos a 600°C, enfriar en desecador y pesar (Pc)
12. Calcular usando

$$\% N = \frac{(Ps - Pp) - (Pc - Pcp)}{M} * 100$$

Donde:

Ps que son los gramos del residuo seco a 130°C

Pp que son los gramos del papel filtro

Pcp que son los gramos de cenizas que presenta el papel filtro

Pc que son los gramos de cenizas después de incinerar

M que es el peso de la muestra (2g)

- Carbohidratos

R= (% Humedad)(% Cenizas)(% Grasa)(% Fibra)(% Proteínas)

Carbohidratos= 100-R

d) Fermentación en medio sólido

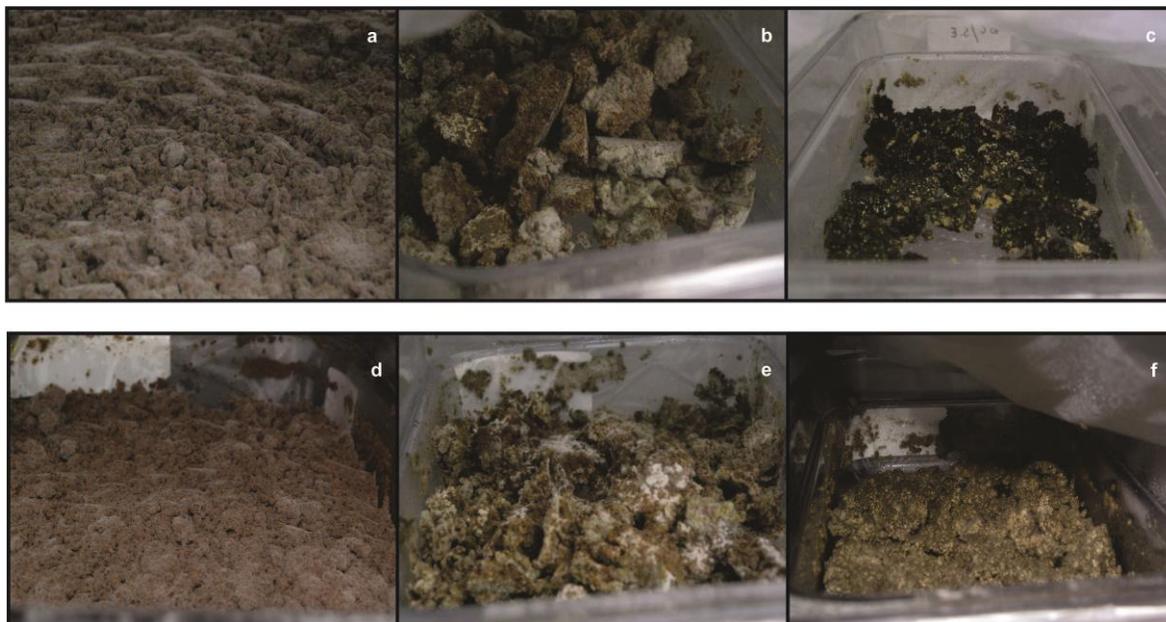


Figura 18. Crecimiento de *A.niger* sobre HSM con respecto a temperatura y tiempo de fermentación, a) 30°C/24 h, b) 30°C/48 h, c) 30°C/72 h, d) 40°C/24 h, e) 40°C/48 h, f) 40°C/72 h

e) Análisis térmicos

Se realizó un análisis térmico para apreciar si la aplicación de la fermentación en medio sólido así como el primer tratamiento con fluidos supercríticos pudo haber afectado directamente al almidón. Esto a su vez ayudó a proponer la segunda condición aplicada para FSC, considerando la temperatura de gelatinización del gránulo de almidón para evitar con ello afectar las propiedades fisicoquímicas que este posee.

Por lo que se pesaron en cápsulas de aluminio 3 mg de muestra, se adicionaron 7 μ L de agua destilada a través de una microjeringa evitando que la punta del dispositivo tocara la muestra directamente, se dejó reposar 5 minutos y posterior a ello se selló herméticamente la cápsula. Para la lectura se empleó el DSC 1 Star^e System (Mettler-Toledo, Suiza) previamente calibrado con indio, a

través de Star[®] Software se programó una rampa de calentamiento de 25 a 100°C con incrementos de 10°C/min.

De los datos obtenidos a través del análisis, se observó que no hubo efecto sobre la temperatura de gelatinización del almidón para ambas condiciones de temperatura (30 y 40°C), así como el período de fermentación tampoco generó cambio alguno sobre dicha variable, identificándose que la temperatura de gelatinización está alrededor de los 65-80°C. Esto permitió indicar que *A. niger* no utilizó el almidón como fuente de nutrientes para su crecimiento y que las condiciones empleadas no degradaron el gránulo. Para el caso de fluidos supercríticos el comportamiento es similar, sin embargo el gránulo de almidón queda mas sensible a cualquier cambio posterior.

Dentro de las imágenes recuperadas se logró apreciar un pico alrededor de los 30-35°C en ambas condiciones de fermentación, señalando la presencia de lípidos naturales de la semilla de mango, la cual es rica en dichos compuestos. Por otro lado este pequeño pico no se apreció cuando se empleó el FSC como tratamiento, esto debido a que el sistema supercrítico extrajo la materia lipídica dejando el material sólido libre de ellos.

Con todo lo anterior se propuso emplear la temperatura de 80°C para la segunda condición con fluidos supercríticos como tratamiento para la eliminación de factores antinutricionales, bajo la premisa de que a dicha temperatura el almidón está un poco mas sensible a la gelatinización, pudiéndose lograr un almidón pre-gelatinizado generando beneficios en las propiedades fisicoquímicas del mismo, por lo que la harina de semilla de mango presentará ventajas para ser usado como ingrediente.

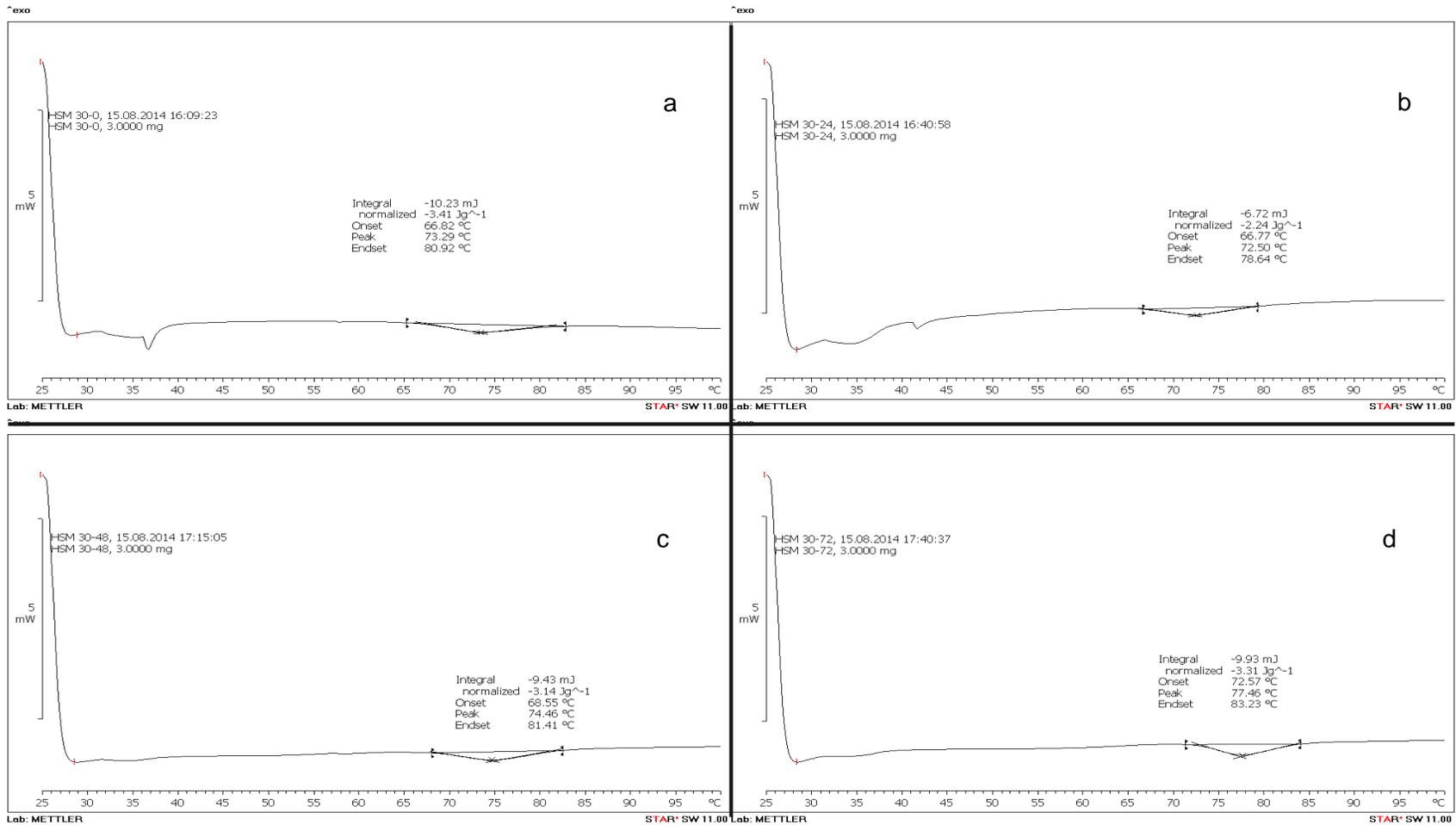


Figura 19. Análisis térmico de la HSM sometida a fermentación sólida a 30°C. a) 0 horas, b) 24 horas, c) 48 horas, d) 72 horas

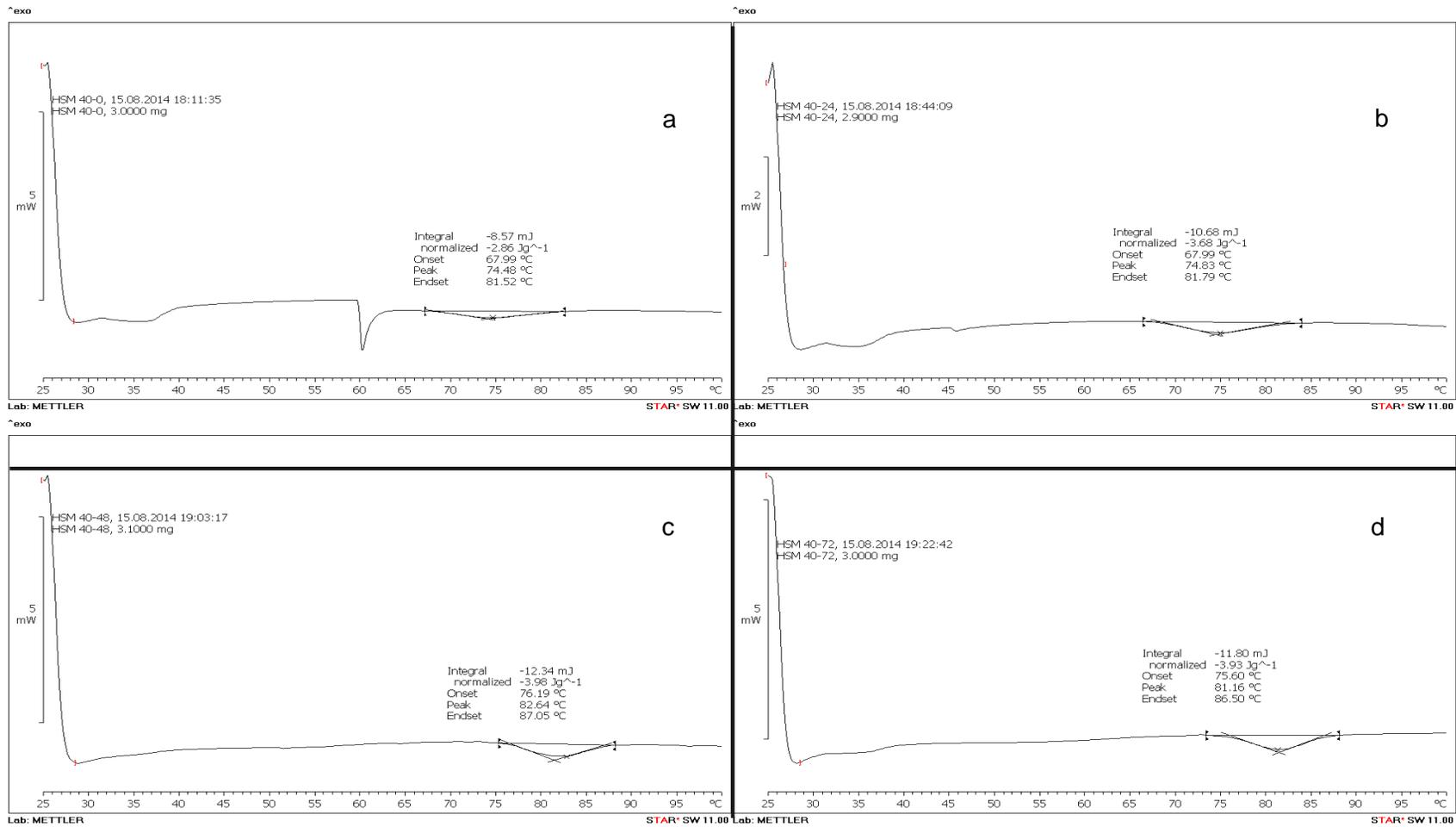


Figura 20. Análisis térmico de la HSM sometida a fermentación sólida a 40°C. a) 0 horas, b) 24 horas, c) 48 horas, d) 72 horas

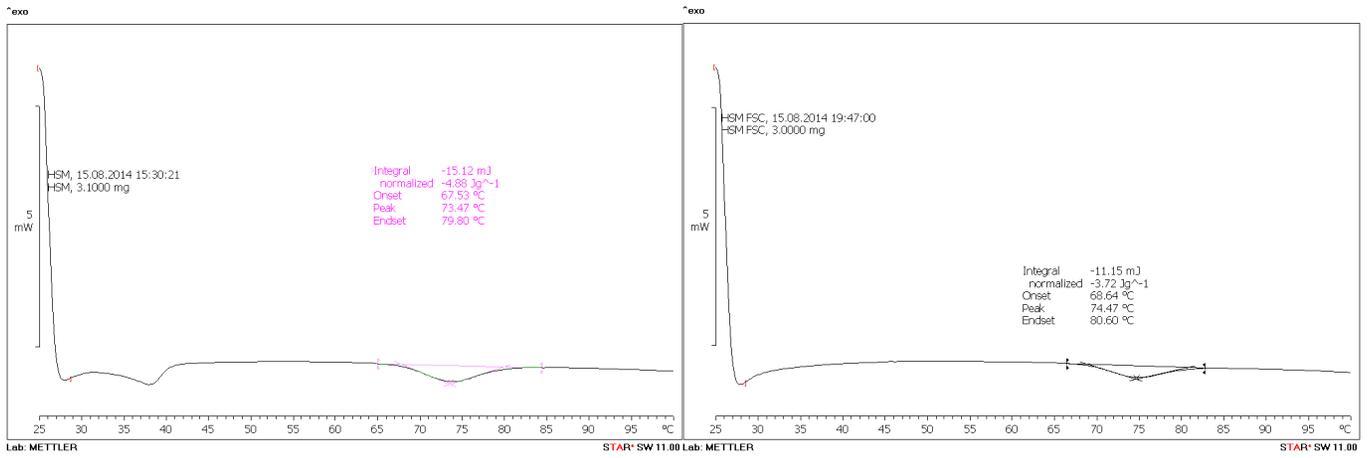


Figura 21. Análisis térmico de (a) HSM sin tratamiento y (b) HSM sometida a fluidos supercríticos (CO₂, 150 Bar-70°C).

f) Abreviaturas

°C	Centigrados
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros cúbicos
D	Dalton
g	Gramos
Kg	Kilogramo
L	Litros
M	Molar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Materia seca
nm	Nanómetros
RPM	Revoluciones por minuto
µL	Microlitro
v/v	Volumen-volumen