



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

“Efecto del ultrasonido y/o microondas en la extracción y propiedades fisicoquímicas de aceite y proteína de coco”

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Floover Steven Hernandez Rojas

TUTORA

Dra. Laura Patricia Martínez Padilla  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

Ciudad de México, septiembre 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente	Dra. Amelia Guadalupe Farrés González-Saravia
Vocal	M. en C. María de los Ángeles Valdivia López
Vocal	Dr. Alberto Tecante Coronel
Vocal	Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
Secretario	Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos (LAPRYFAL), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Laura Patricia Martínez Padilla y con el apoyo económico otorgado por CONACyT, con beca de maestría (número de becario 629497).

Parte de los resultados de este proyecto se presentaron en el siguiente congreso:

“Efecto del ultrasonido y/o microondas en la extracción y propiedades fisicoquímicas de aceite y proteína de coco”. Presentación de póster. XL encuentro nacional de la AMIDIQ, celebrado en la Ciudad de Huatulco, Oxa. México, entre los días 7 a 10 de mayo 2019.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Laura Patricia Martínez Padilla por la orientación recibida en el desarrollo y cumplimiento de esta investigación. A la Dra. Adriana Ganem Rondero por su apoyo en la realización de las pruebas de potencial zeta y tamaño de partícula. A la MC Julieta González Sánchez por la capacitación en la realización de las pruebas del análisis proximal. A la Dra. María Guadalupe Sosa Herrera por la capacitación en las técnicas de tensión superficial y reología dilatacional. Al personal docente de investigación y de apoyo del laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos (LAPRYFAL), por la capacitación y asistencia durante el proceso de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de Maestría, a través de la beca número 629497.

Al Posgrado de Ciencias Químicas por su apoyo para presentar parte de este trabajo en el XL encuentro nacional de la AMIDIQ, en Huatulco, México, 2019.

Agradezco también a los miembros del jurado sus valiosas aportaciones que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Finalmente agradezco a Dios, a mi familia y a mis padres por el apoyo continuo.

## DEDICATORIAS

Con admiración, cariño y mi más profundo agradecimiento a mi madre Blanca Irene Rojas Zúñiga.

Con cariño a mi hermano Paul Steward Hernández Rojas y a mi hija Violet Hernández Almeida.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
1.1 Coco	6
1.1.1 Aceite de coco y propiedades fisicoquímicas	7
1.1.2 Métodos de extracción de aceite	9
1.1.3 Proteínas de coco y propiedades fisicoquímicas	14
1.1.3.1 Propiedades térmicas de las proteínas de coco	16
1.1.4 Métodos de extracción de proteínas de coco	17
1.2 Sustancias fenólicas	22
1.2.1 Clasificación de los fenoles y propiedades	22
1.2.2 Métodos de extracción de fenoles	23
1.2.3 Fenoles en coco	24
1.2.4 Fenoles en el aceite de coco	25
1.3 Sistemas dispersos y propiedades de superficie de las proteínas	25
1.3.1 Emulsiones y espumas	25
1.3.2 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas en la interfase	27
1.3.3 Tensión superficial	30
1.3.4 Reología en la interfase	31
1.4 Extracción asistida	34
1.4.1 Principios de la radiación de microondas	34
1.4.4 Aplicaciones de extracción por microondas	35

1.4.2 Principio de la radiación de ultrasonido _____	37
1.4.3 Aplicaciones de extracción por ultrasonido _____	38
<b>CAPÍTULO II. METODOLOGÍA _____</b>	<b>41</b>
2.1 Hipótesis _____	41
2.2 Objetivos _____	41
2.3 Materiales _____	42
2.4 Métodos fisicoquímicos _____	43
2.4.1 Métodos de extracción de aceite y de proteína total en la crema vía húmeda, asistido por microondas o por ultrasonido _____	43
2.4.2 Evaluación del efecto del tratamiento control, microondas y ultrasonido sobre el rendimiento de extracción de aceite y proteína total en la crema de coco _____	46
2.4.2.1 Caracterización de la pulpa de coco _____	46
2.4.2.2 Evaluación del método control a dos tiempos de molienda húmeda, midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles _____	46
2.4.2.3 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas a dos tiempos de molienda húmeda, midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles de la leche de coco _____	47
2.4.2.4 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas con cambio de materia prima en el tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles de la leche de coco _____	47
2.4.2.5 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas sobre la pureza y composición de la proteína total recuperada de la crema de coco _____	48
2.4.2.6 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido en el rendimiento de extracción de aceite y proteína total obtenidos de la crema de coco _____	48
2.4.2.7 Determinaciones analíticas _____	49
2.4.2.7.1 Determinación del contenido de humedad en la leche de coco _____	49
2.4.2.7.2 Determinación del contenido de aceite en la leche de coco _____	49
2.4.2.7.3 Determinación del contenido de proteínas solubles en la leche de coco _____	49
2.4.2.7.3 Determinación de la distribución del tamaño de partícula en la leche de coco _____	50

2.4.3 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el contenido de fenoles en la crema y leche descremada de coco	51
2.4.3.1 Extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa, en la crema y leche descremada de coco	51
2.4.3.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos extraídos de la pulpa, en crema y leche descremada de coco	52
2.4.4 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el tamaño de partícula, potencial zeta, tensión superficial y reología dilatacional de la fracción de proteínas obtenida	53
2.4.4.1 Determinación del tamaño de partícula	53
2.4.4.2 Determinación del potencial zeta	54
2.4.4.3 Determinación de la tensión superficial dinámica en la interfase	54
2.4.4.4 Propiedades reológicas dilatacionales	54
2.5 Análisis estadístico	55

### **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS** 56

3.1 Evaluación del efecto del tratamiento control microondas y ultrasonido sobre el rendimiento de extracción de aceite y de proteína total en la crema de coco	56
3.1.1 Caracterización de la materia prima	56
3.1.2 Evaluación del método control a dos tiempos de molienda húmeda midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles	58
3.1.3 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas a dos tiempos de molienda húmeda, midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, proteínas solubles y aceite de la leche de coco	61
3.1.4 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas con cambio de materia prima en el tamaño de partícula, el pH, humedad, aceites y proteínas solubles de la leche de coco	64
3.1.5 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas sobre la pureza y composición de la fracción de la proteínas recuperada de la crema de coco	68
3.1.6 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido en el rendimiento de extracción de la proteína total y aceite obtenidos de la crema de coco	71
3.2 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el contenido de fenoles totales en la crema y leche descremada de coco	76



3.3 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el tamaño de partícula, potencial zeta, tensión superficial y reología dilatacional de la fracción de proteínas obtenida _____	79
3.3.1 Tamaño de partícula y potencial zeta de las dispersiones de proteínas _	79
3.3.2 Tensión superficial dinámica en la interfase _____	82
3.3.3 Reología dilatacional en la interfase _____	84
<b>CONCLUSIONES _____</b>	<b>89</b>
<b>RECOMENDACIONES _____</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS _____</b>	<b>91</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1.1. Sección transversal del fruto de coco _____	7
Figura 1.2. Esquema donde se resumen los métodos de extracción de aceite de coco _____	10
Figura 1.3. Esquema donde se resumen los métodos de extracción de proteínas de coco _____	18
Figura 1.4. Esquemización de la doble capa alrededor de una partícula cargada negativamente y el correspondiente gráfico que muestra el cambio en la magnitud del potencial a diferentes distancias desde la superficie de la partícula _____	28
Figura 1.5. Dinámica de la tensión en la interfase típica de las proteínas en solución acuosa diluida que se adsorbe a la interfase aceite-agua o agua-aire _____	31
Figura 1.6. Tensiómetro de gota pendiente (1) espacio óptico; (2) fuente de luz; (3) cubeta en donde se forma la gota; (4) jeringa con la que se forma la gota y se controla el volumen de manera automatizada; (5) cámara; (6) monitor de video; (7) computador para tratamiento de datos _____	32
Figura 1.7. Causas de los efectos de las MO a través de la conducción iónica y la polarización dipolar _____	35
Figura 1.8. Creación de burbujas por cavitación y su colapso _____	38
Figura 2.1. Esquema que resume los tratamientos: control, microondas y ultrasonido para la obtención de aceite y proteína total de coco _____	44
Figura 3.1. Distribución del tamaño de partícula de la leche de coco obtenida con 15 y 60 s de molienda húmeda _____	59
Figura 3.2. Distribución del tamaño de partícula de la leche de coco obtenida con 15 y 60 s de molienda húmeda y tratamiento asistido por microondas (a), o tratamiento asistido por ultrasonido (b) _____	61
Figura 3.3. Aumento de la presión de la interfase aire: agua con respecto al tiempo (t), en presencia de las proteínas de coco y extraídas por los tratamientos (a): control (C) - ultrasonido (U), (b): control (C) - microondas (M). La tensión de interfase de referencia fue la del agua pura _____	82
Figura 3.4. Modulo elástico y viscoso dilatacional de las proteínas obtenidas por los tratamientos control-microondas (A1-A2), control-ultrasonido (B1-B2) adsorbidos en la interfase aire-agua con una concentración al 0.1% _____	85

## ÍNDICE DE CUADROS

	<i>Página</i>
Cuadro 1.1. Composición de los ácidos grasos libres en AVC y en aceite de coco	8
Cuadro 1.2. Especificaciones fisicoquímicas establecidas para el AVC y el aceite de coco	8
Cuadro 1.3. Comparación de la composición próxima de leche de coco obtenida y de la pulpa de coco en diferente estado de madurez	11
Cuadro 1.4. Comparación de diferentes métodos de desestabilización de leche de coco para la extracción de AVC y rendimiento, R	13
Cuadro 1.5. Residuos de albúmina y globulina	14
Cuadro 1.6. Fracción de proteínas de la pulpa de coco y valores promedio	19
Cuadro 1.7. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante medido por DDPH y ABTS en la carne de coco con diferentes estados de madurez y obtenida de diferentes variedades	24
Cuadro 3.1. Valores promedio de humedad, aceite y proteína total de pulpa de coco, en muestras adquiridas en días diferentes	56
Cuadro 3.2. Diámetro de partícula medio e índice de polidispersidad de la leche de coco extraída por diferentes tratamientos	59
Cuadro 3.3. pH y humedad en la leche de coco, contenido de aceite y proteínas solubles de la leche de coco obtenida con el tratamiento control a dos tiempos de molienda húmeda	60
Cuadro 3.4. Masa de leche de coco obtenida con el tratamiento control, pH y rendimiento de extracción de aceite y proteínas solubles	60
Cuadro 3.5. Diámetro medio e índice de polidispersidad, de la leche de coco extraída por los tratamientos control, microondas y ultrasonido	62
Cuadro 3.6. pH, humedad, aceite y proteínas solubles en la leche de coco, obtenida con los tratamientos control (C), microondas (M) y ultrasonido (U) a dos tiempos de molienda	63
Cuadro 3.7. Masa de leche de coco obtenida y rendimiento de extracción de aceite y proteínas solubles obtenidos con los tratamientos control (C), microondas (M) y ultrasonido (U) a dos tiempos de molienda	64
Cuadro 3.8. Diámetro medio e índice de polidispersidad de partículas determinados en la leche de coco extraída por los métodos control, microondas y ultrasonido en diferentes días, se indica el coeficiente de variación (C.V.)	65

Cuadro 3.9. Humedad, pH y rendimiento de extracción de aceite y proteínas solubles de la leche de coco obtenida a partir del tratamiento control (C), microondas (M) y ultrasonido (U)	67
Cuadro 3.10. Caracterización de la proteína total de la crema de coco obtenida por los tratamientos control (C), microondas (M) y ultrasonido (U)	69
Cuadro 3.11. Recuperación de aceite (RA) y proteína total (RP) y rendimiento relativo mediante diferentes tratamientos	72
Cuadro 3.12. Producción mundial de aceite de coco, rendimiento industrial y aumento porcentual por microondas expresado en dólares	75
Cuadro 3.13. Contenido de fenoles totales equivalentes a ácido gálico (EAG) en crema y leche descremada de coco (LD), expresados en base EAG en coco y base leche de coco (LC) extraídos bajo diferentes tratamientos	77
Cuadro 3.14. Potencial zeta, tamaño de partícula e índice de polidispersidad (IP), de las proteínas de coco dispersas en agua en una concentración al 0.1 %	80
Cuadro 3.15. Presión superficial de la fracción de proteínas de coco (0.1%) en la interfase aire: agua obtenidas por los tratamientos control-ultrasonido y control-microondas	83
Cuadro 3.16. Módulos elásticos (E'), viscosos E'' y tan $\phi$ , para los tratamientos control y microondas a diferentes frecuencias de la fracción de proteínas (0.1%)	86
Cuadro 3.17. Módulos elásticos (E'), viscosos (E'') y tan $\phi$ para para los tratamientos control y ultrasonido a diferentes frecuencias de la fracción de proteínas (0.1%)	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
AVC	Aceite virgen de coco
C	Tratamiento control
C.V.	Coefficiente de variación
E'	Módulo de almacenamiento
E''	Módulo de pérdida
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAM	Extracción asistida por microondas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
IP	Índice de polidispersión
LC	Leche de coco
LD	Leche descremada de coco
M	Tratamiento por microondas
proteínas (%) base crema	Masa de proteínas de crema por masa de crema de coco
R	Rendimiento
RA	Rendimiento de extracción de aceite
RP	Rendimiento de extracción de proteína total
T	Tratamiento
U	Tratamiento por ultrasonido

## RESUMEN

En esta investigación se estudiaron métodos alternos de extracción húmeda asistida por microondas o ultrasonido, diferentes a los procesos convencionales de extracción por prensado. Primeramente, se obtuvo leche de coco por molienda, la cual se desestabilizó a pH 4 y se centrifugó para obtener crema con alto contenido de aceite y proteínas, denominado método control. Se evaluó el efecto de los dos métodos asistidos por microondas o ultrasonido comparándolos con el método control sobre la eficiencia de la recuperación de aceite y proteína total, así como en el contenido de fenoles en la crema separada, además se evaluó su repercusión en las propiedades de interfase de las proteínas.

El tratamiento asistido por microondas (2.5 GHz, 1000 W, 3 pulsos de 20 s y 400 kJ/kg) generó un aumento significativo en la extracción de aceite en la crema de coco, el rendimiento de extracción fue de 81.9% y permitió separar 23.3% de proteína total de la pulpa, con una pureza del 53%. El tratamiento asistido por ultrasonido (24 kHz, 80% amplitud, 100% pulsos por ciclo, 2.5 min, 200 kJ/kg) incrementó significativamente el rendimiento de aceite y su extracción fue del 70.14%, lo que permitió extraer simultáneamente un 32.3% de proteína total con una pureza del 30.31%.

Los tratamientos alternos favorecieron una mayor incorporación de fenoles totales en la crema separada, lo que contribuye a su calidad nutricional, así como de estabilidad al deterioro debido a su actividad antioxidante. Las proteínas separadas generaron un aumento en la presión superficial de la interfase aire/agua, pero no se observaron diferencias entre los tratamientos alternos con respecto a su control. Las proteínas en la interfase presentaron un comportamiento viscoelástico, donde el módulo elástico dilatacional predominó sobre el viscoso después de 0.066 Hz. Estos resultados confirman que los procesos asistidos por ultrasonido o microondas favorecen la recuperación de biomateriales y sus propiedades, destacándose el método asistido por microondas, ya que genera rendimientos más altos de aceite y una mayor interacción del aceite liberado con los fenoles.

## INTRODUCCIÓN

El coco es un fruto de la palma *Cocos nucifera*. L, que sobresale entre los principales árboles del área tropical de América y Asia, del cual se obtienen subproductos que se pueden aprovechar en diferentes industrias como la de los alimentos, la farmacéutica, de los combustibles, la cosmética y la de aseo. Particularmente, cada año en México se cosechan cerca de un millón de toneladas del fruto, de las cuales se extrae alrededor de 166 mil toneladas de pulpa de coco, utilizada para obtener aproximadamente 100 mil toneladas de aceite (Granados-Sánchez y López-Ríos, 2002), siendo éste el principal producto de la industria por su viabilidad económica, demostrado a escala de laboratorio, a pequeña escala (Kindermann *et al.*, 2007) y escala industrial (Rethinam, 2005).

Sin embargo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), y la Comunidad de Coco de Asia y Pacífico (por sus siglas en inglés, APPC), reconocieron que la industria del aceite virgen de coco (AVC) que sigue el proceso de expulsión directa o prensado, debe ampliarse para promover la eficiencia, la producción en gran escala y satisfacer los requisitos de suministro en el mercado local y de exportación (Rethinam, 2005). Además, se han reportado pérdidas de aceite de hasta 24% en los residuos del proceso (Sulaiman *et al.*, 2013), los cuales son definidos como desperdicios y contaminantes de efluentes, aunque contienen proteínas y compuestos fenólicos que pudieran recuperarse para la diversificación de la industria o con aplicación en la de alimentos o farmacéutica (Thaiphanit y Anprung, 2016). Por ejemplo, las proteínas son importantes porque poseen propiedades funcionales de superficie, como el descenso de la tensión superficial que disminuye el trabajo mecánico para realizar emulsiones o espumas (Bos y Van Vliet, 2001). Los compuestos fenólicos son importantes porque son responsables de una actividad antioxidante (Marina *et al.*, 2009a; 2009b).

Ahondando en lo anterior, cada vez aumenta la necesidad de satisfacer las demandas energéticas y alimenticias asociadas al crecimiento de la población y el desarrollo económico, que utilicen materia prima renovable y sostenible (como lo es

la pulpa y el aceite de coco), con alta calidad, rendimiento y que generen un consumo mínimo de energía de procesamiento, de los recursos y reduzcan la producción de desechos industriales.

Por consiguiente, entre los métodos de intensificación de procesos para la extracción de aceite, la aplicación de energía por microondas y por ultrasonido, son un ejemplo de metodologías eficientes, que pueden minimizar el consumo energético y del tiempo de proceso, así como maximizar los beneficios económicos y ambientales. Desde luego, dichos métodos relativamente modernos ya han sido propuestos como alternativas para aumentar los rendimientos de extracción de compuestos naturales y alimenticios (Chemat *et al.*, 2011; Gude, 2015).

En estudios a nivel laboratorio se ha empleado exitosamente el ultrasonido de baja frecuencia en la extracción no acuosa de aceite (principalmente con hexano), de semillas u otros subproductos como chía y cascarilla de arroz (de Mello *et al.*, 2017; Khoei y Chekin, 2016). En la extracción asistida por ultrasonido a 20 kHz, con una sonda sumergida en un vaso de precipitado que contenía la semilla de dátil y hexano, en comparación con el método Soxhlet, generó una extracción comparable de 8.5 g de aceite por 100 g de semilla, además de que redujo el tiempo de proceso de 180 a 45 min y la energía consumida de 128 kJ/g a 0.30 kJ/g (Jadhav *et al.*, 2016). Utilizando un prototipo ultrasónico de alta frecuencia a gran escala, se aumentó en un 10% el rendimiento de extracción de aceite de oliva (Clodoveo, 2019).

A nivel piloto el ultrasonido se ha implementado en estudios de prefactibilidad para separar aceites de productos relativamente blandos como la pulpa de coco y aguacate (Juliano y Knoerzer, 2016; Martínez-Padilla *et al.*, 2018). Con un efecto combinado de refrigeración de la pulpa de coco a 5 °C y ultrasonido de alta frecuencia, también se aumentó el rendimiento de extracción de crema de coco (Li *et al.*, 2018). Siendo los estudios de Juliano y Knoerzer (2016) y Li *et al.* (2018) los únicos encontrados durante la revisión bibliográfica para la pulpa de coco.



La extracción asistida por microondas ha sido utilizada para la obtención de metabolitos de plantas, como los compuestos fenólicos (Zhang *et al.*, 2011) y de aceites esenciales por hidrodestilación. También, al combinar la técnica con un tratamiento con fluido supercrítico o enzimas, se mejoró la eficiencia y la especificidad en la extracción simultánea de aceites, polisacáridos, proteínas y fenoles totales (Ekezie *et al.*, 2017). En Francia fue desarrollado un reactor piloto a escala semi-industrial (100L, 30 kW, 915 MHz), y de procesamiento en línea (100L, 6 kW, 2.45 GHz), con múltiples aplicaciones de extracción (Li *et al.*, 2013). En Canadá en el 2014 se inauguró la planta industrial Canada's Radient, que utiliza la tecnología patentada de Jocelyn Pare y definida como procesamiento asistido por microondas (MAP, por sus siglas en inglés), para extraer las sustancias de interés con diferentes aplicaciones (nutracéuticos, farmacéuticos, de cuidado personal, cosméticos, alimentos y bebidas) (Tec Edmonton, 2014). Su ventaja industrial se debe a que genera una recuperación más rápida del compuesto extraído (minutos frente a horas), aumenta el rendimiento y la pureza del compuesto extraído, al tiempo que disminuye los requerimientos de disolvente y energía, únicamente se utilizan agua y/o etanol como disolventes. MAP se definió como menos costoso y más escalable que las tecnologías de extracción convencionales y alternativas que incluyen la extracción de fluido supercrítico/CO<sub>2</sub>, la cromatografía en columna, la extracción convencional con solventes y la destilación con vapor (Radient, 2019).

Sin embargo, en la literatura aún no existe información disponible referente a la aplicación del ultrasonido y/o microondas para evaluar el efecto sobre la extracción de aceite y proteína de coco. Por todo lo anterior, en la presente investigación se proponen la obtención de aceite y proteína total, la estimación del contenido de fenoles y las propiedades de superficie de la proteína, comparando un proceso asistido por ultrasonido o por microondas con un proceso de molienda húmeda o control, el cual generalmente se utiliza en semillas con alto contenido de humedad (Nakajima y Nabetani, 2000).

Al no secarse la materia prima se puede incrementar la calidad del producto y la eficiencia del proceso, puesto que permite un suministro continuo de la materia

prima, reduce los costos energéticos y la posible desnaturalización de las proteínas termolábiles, así como el deterioro del aceite de coco por el calentamiento. Se pueden obtener proteínas frescas con el mínimo cambio en sus propiedades nativas que pudiera generarse por el calentamiento o por largos tiempos de extracción.

## CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

### 1.1 Coco

La palma de coco es una planta de importancia tropical cultivada en el mundo en 12.3 millones de hectáreas, de las cuales el 80.7%, 10.16% y 4.8% son cosechadas en Asia, África y América, respectivamente. De la palma se obtuvieron en el 2017 un total 60.7 millones de toneladas del fruto de coco, de las que Indonesia, India y Filipinas aportan el 73.3% de dicha producción.

En México se cultivan 183,793 ha, principalmente en Guerrero, Colima y Tabasco se cosechan 1.2 millones de toneladas del fruto, correspondientes al 1.9% de la producción mundial del fruto (Granados-Sánchez y López-Ríos, 2002; FAOSTAT, 2017).

Por otro lado, a nivel global se exporta el 50% de los productos derivados de la palma de coco, el 10% se realiza a gran escala y se distribuye en productos como la copra o endospermo de coco, en aceite de coco, coco desecado, leche de coco, leche en polvo, productos químicos de coco, carbón vegetal y carbón activado (Rethinam, 2005). En México estos derivados también han sido propuestos como alternativas de diversificación (Granados-Sánchez y López-Ríos, 2002).

En las semillas oleaginosas los cotiledones son las células con la principal fuente de cuerpos lipídicos y se encuentran junto a proteínas, que son estabilizados por fuerzas intermoleculares hidrofílicas y lipofílicas. En el fruto de coco los cotiledones constituyen el endospermo celular sólido (pulpa blanca, Figura 1.1), cuya pared celular está estructurada por manosas (61%), arabinogalactanos (26%) y celulosa (13%) (Rosenthal *et al.*, 1996).

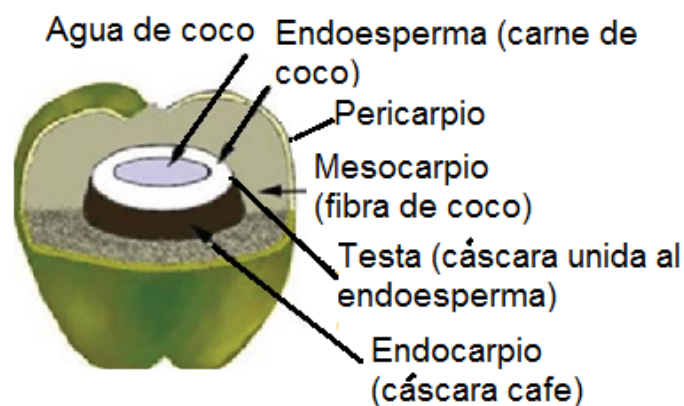


Figura 1.1. Sección transversal del fruto de coco (Rao y Najam, 2016).

### 1.1.1 Aceite de coco y propiedades fisicoquímicas

En el mundo se producen 3.1 millones de toneladas de aceite de coco, de las cuales Asia aporta el 88.4%, América el 5.6% y África el 3.5% (FAOSTAT, 2014). El aceite es utilizado en la industria de oleoquímicos, como inhibidor de la corrosión, en la fabricación de surfactantes y plastificantes, en la industria farmacéutica y de los alimentos (Bawalan, 2011a). Particularmente, en México del 90% de la pulpa de coco se extraen entre 60 y 70% de aceite. De este último, el 90% se utiliza para fabricación de jabones y sólo el 10% para fines alimenticios (Granados-Sánchez y López-Ríos, 2002).

El mayor derivado del coco es el aceite de coco refinado, blanqueado y desodorizado, que es utilizado con fines alimenticios o industriales. Sin embargo, el aceite virgen de coco (AVC), presenta mejores atributos por no sufrir tratamientos que pudieran modificar sus propiedades nativas (Marina *et al.*, 2009a; 2009b). En la actualidad se prefieren productos con el mínimo de procesamiento.

Como se muestra el Cuadro 1.1, el AVC y el aceite de coco están constituidos principalmente por triglicéridos de ácidos grasos libres de cadena media saturados (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), siendo el de mayor proporción el ácido láurico (C<sub>12</sub>:0).

Cuadro 1.1. Composición de los ácidos grasos libres en AVC y en aceite de coco.

Ácido	NAC: INS <sup>1</sup>	Composición		Ácido	NAC: INS <sup>1</sup>	Composición	
		% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>			% <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>
Caproico	6:0	0.1-0.7	N.D. <sup>a</sup> -0.7	Palmítico	16:0	7.5-10.2	7.5-10.2
Caprílico	8:0	4.0-10.0	4.6-10.0	Esteárico	18:0	2.0-5.0	1.8-7.4
Cáprico	10:0	4.0-8.0	5.0-8.0	Oleico	18:1	5.0-10.0	5.0-10.0
Láurico	12:0	45.1-56.0	45-.153.2	Linoleico	18:2	1.0-2.5	1.0-2.5
Mirístico	14:0	16.0-21.0	16.8-21.0	-----			

<sup>1</sup>Número de átomos de carbonos: Insaturaciones. <sup>2</sup>Composición de AVC según Bawalan (2011a).

<sup>3</sup>Composición de aceite según el Codex Alimentarius (2015). <sup>a</sup>N.D.: no detectable

El producto debe cumplir con las especificaciones del Cuadro 1.2 establecidas por la APCC y el Codex Alimentarius (2015), referente al valor de peróxidos, acidez, índice de saponificación, índice de yodo, densidad e índice de refracción.

Cuadro 1.2. Especificaciones fisicoquímicas establecidas para el AVC y el aceite de coco.

Variable	Especificación <sup>1</sup>	Especificación <sup>2</sup>
Humedad (%)	Máximo 0.1	---
Acidez libre, expresada como ácido láurico (%)	Máximo 0.2	---
Valor de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /kg aceite)	Máximo 3.0	---
Índice de yodo (g I <sub>2</sub> /100 g de aceite)	4.1-11.0	6.3-10.6
Índice de saponificación (mg KOH /kg de aceite)	250.0-260.0	248.0-265.0
Densidad relativa	0.915-0.920	0.908-0.921
Índice de refracción a 40 °C	1.4480-1.4492	1.448-1.445

<sup>1</sup>En el AVC según Bawalan (2011a). <sup>2</sup>En el aceite de coco según el Codex Alimentarius (2015).

En los últimos treinta años el aceite de coco ha tendido a ser reemplazado por el aceite de palma y aceites hidrogenados de semillas, debido a su deteriorada imagen en el sector de consumo, así como por las críticas en las prácticas de cultivo, aunque en la actualidad también se ha dañado la imagen del cultivo de la palma. Desde luego, se han aplicado estrategias de mejora como la agricultura orgánica y todavía se deben desarrollar procesos modernos que cumplan con mejores estándares de

calidad para su exportación (Prades *et al.*, 2016). A pesar de su mala imagen presenta actividad contra las bacterias Gram negativas, hongos y virus. El aceite de coco se metaboliza en una ruta diferente a los ácidos grasos de cadena larga, por estar principalmente constituido por ácido láurico de cadena media, que es rápidamente transportado y convertido en energía y otros metabolitos, en lugar de ser almacenado en grasa y generar enfermedades cardiovasculares, como algunos argumentan (Dayrit, 2015). En revisiones de la literatura actuales, se ha refutado la hipótesis que se sostiene desde 1960, sobre la teoría de la tradicional dieta cardiaca, donde se cree que un incremento en el consumo de aceites saturados, causa una elevación del colesterol en la sangre, por lo tanto, en enfermedades cardiacas (Ribeiro, 2017).

### **1.1.2 Métodos de extracción de aceite**

De acuerdo con el esquema presentado en la Figura 1.2, el aceite de la pulpa de coco puede ser extraído de la célula después de realizar la lisis de la pared celular, a través de diferentes métodos en los que se realizan tratamientos físicos, térmicos, químicos y bioquímicos, como a través de métodos alternativos que aplican radiación de ultrasonido o microondas.

Anteriormente los métodos convencionales eran métodos químicos en donde las extracciones se realizaban con hexano (Rosenthal *et al.*, 1996). Entre los primeros tratamientos bioquímicos o enzimáticos que se han referenciado, se reportó una extracción de aceite del 73.8%, empleando pulpa de coco en un medio acuoso y una mezcla de las enzimas celulasa,  $\alpha$ -amilasa y poligalacturonasa al 1%, para realizar la lisis celular (Che Man *et al.*, 1996).

Los tratamientos físicos y térmicos pueden ser aplicados en métodos denominados secos y húmedos. En los métodos convencionales vía seca, la pulpa de coco es previamente secada y a través del prensado de la pulpa con un extractor hidráulico se obtiene el aceite. En los métodos húmedos convencionales, se puede o no adicionar agua al endospermo sólido de coco fresco, que posteriormente es

prensado para obtener un extracto acuoso (Seow y Gwee, 1997). Además, en dichos métodos las semillas oleaginosas con alto contenido de humedad también pueden ser molidas en húmedo para obtener un extracto con alto contenido de aceite (Nakajima y Nabetani, 2000).

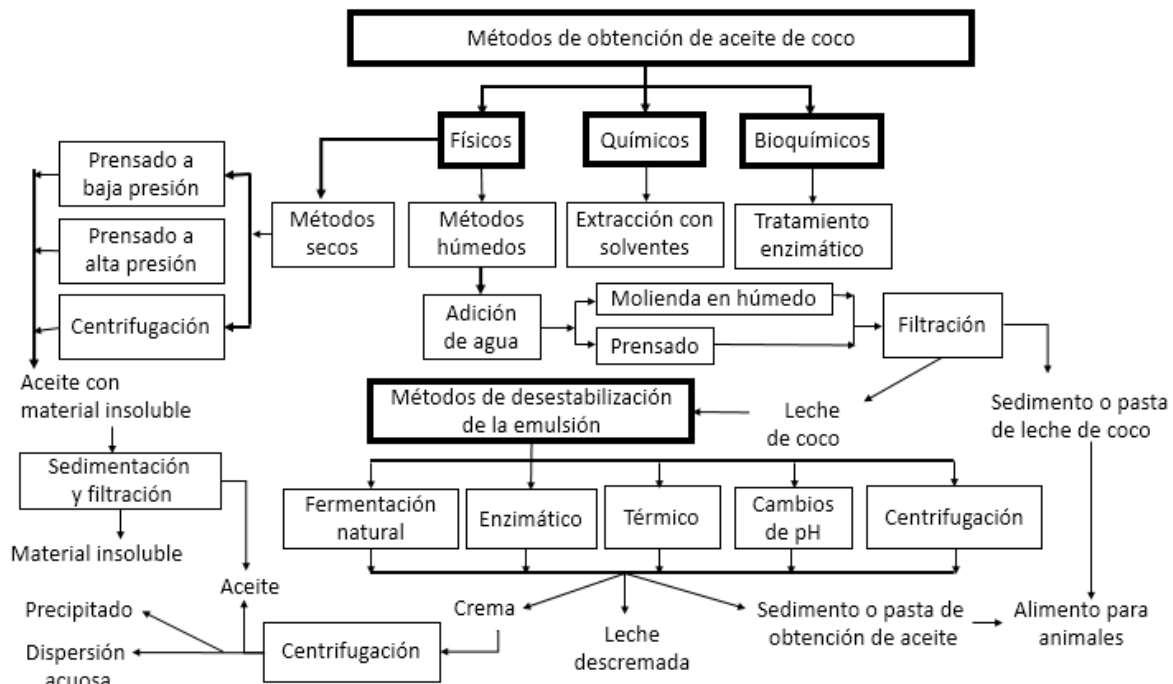


Figura 1.2. Esquema donde se resumen los métodos de extracción de aceite de coco.

En el método seco a baja presión, la pulpa de coco se somete a una desecación indirecta por aire caliente, hasta una humedad de 10 a 13% y a una presión de 450 psi. Las sustancias insolubles en el aceite obtenido se dejan sedimentar por 5 días, se filtra y se seca a baja temperatura para obtener el AVC. En el método de alta presión, el endospermo se lleva hasta una humedad de 2.5 a 4.0% y luego se le aplica una presión por arriba de 1600 psi. También, las partículas presentes en el AVC se dejan sedimentar durante cinco días y se retira el material insoluble por decantación y filtración. En el método seco por centrifugación, la pulpa de coco se lleva hasta una humedad entre 2.5 y 3.0%, luego se micro pulveriza, y la pasta obtenida se centrifuga para recuperar el AVC (Bawalan, 2011b).

En los métodos húmedos, los organelos celulares y cierto material sólido de fibra de coco son liberados por prensado o molienda húmeda de la pulpa de coco, y constituyen una mezcla que se filtra para retirar el material insoluble denominado pasta de leche de coco. Al mismo tiempo, se obtiene un extracto acuoso que se conoce como emulsión de leche de coco (LC), y que es estable por las proteínas y los fosfolípidos originarios del fruto (Raghavendra y Raghavarao, 2010).

Las propiedades fisicoquímicas de la leche de coco y composición van a depender de factores agronómicos o del procesamiento, como la edad de cultivo, variedad, métodos de preparación y condiciones de proceso, de la cantidad de agua adicionada o la temperatura durante la extracción (Seow y Gwee, 1997). Por ejemplo, en el Cuadro 1.3 se presenta los resultados del análisis proximal de la leche obtenida mediante presión hidráulica de la pulpa del fruto en tres estados de madurez: inmaduros o de 9 a 10 meses de edad, maduros o de 11 a 12 meses y sobre maduros o de 14 a 15 meses de edad (Patil *et al.*, 2017).

Cuadro 1.3. Comparación de la composición proximal de leche de coco y de la pulpa de coco en diferente estado de madurez (Patil *et al.*, 2017).

Estado de madurez del fruto	Composición del fruto de coco					
	Humedad (%)	Materia seca (%)	Lípidos (%) <sup>a</sup>	Proteínas (%) <sup>a</sup>	Cenizas (%) <sup>a</sup>	Carbohidratos (%) <sup>a</sup>
Inmaduro	53.94	46.06	40.36	10.40	2.50	46.74
Maduro	61.07	38.93	53.58	10.15	2.93	33.52
Sobremaduro	39.5	60.5	53.64	7.36	1.72	36.93
Estado de madurez del fruto	Composición de la leche de coco					
	Humedad (%)	Materia seca (%)	Lípidos (%) <sup>a</sup>	Proteínas (%) <sup>a</sup>	Cenizas (%) <sup>a</sup>	Carbohidratos (%) <sup>a</sup>
Inmaduro	55.36	44.64	38.71	7.50	2.31	51.48
Maduro	61.55	38.45	78.91	7.54	2.60	10.95
Sobremaduro	36.59	63.41	69.71	5.27	1.26	23.77

<sup>a</sup>Expresados en base seca, calculados a partir de los valores reportados.



Se observa que el fruto sobremaduro proporciona una mayor concentración de lípidos en la leche, mientras que el inmaduro una menor, lo que podría llegar a afectar el rendimiento de extracción de aceite del proceso industrial.

Para obtener el aceite de la leche de coco, ésta se puede desestabilizar mediante diferentes métodos de desestabilización de emulsiones, como cambios de temperatura, de pH, por centrifugación, a través de una actividad enzimática, con una fermentación natural o mediante combinación de los tratamientos (Figura 1.2), para así, generar una fase inferior de leche descremada y superior de crema de coco, de la cual se extrae el aceite por centrifugación (Raghavendra y Raghavarao, 2010; Sant'Anna *et al.*, 2003; Abdurahman *et al.*, 2009).

Por ejemplo, en el Cuadro 1.4 se presentan diferentes métodos de desestabilización de la emulsión de leche de coco, aplicados en un mismo estudio para la extracción de AVC a escala de laboratorio. Para ello, la pulpa se secó y se desintegró utilizando un cortador de cuña giratorio y la leche de coco se expulsó utilizando una prensa de tornillo, el material sólido fue retenido en una rejilla de filtración. El contenido aceite en la LC fue del 39%. Los tratamientos y las condiciones que generaron el más alto rendimiento de AVC son correspondientes al calentamiento (86%), ajuste de la emulsión a pH 3 (89%) y a pH 10 (83%), enfriamiento (92%), actividad enzimática (82%) y la combinación de la actividad enzimática y el enfriamiento de la emulsión (94.5%) (Raghavendra y Raghavarao, 2010).

Dia *et al.* (2005) compararon un método vía seca con dos métodos húmedos, sin detectar una diferencia significativa en la recuperación del aceite entre 20.5 y 23.3%. Mansor *et al.* (2012) compararon la extracción de AVC mediante un método seco y diferentes métodos húmedos, utilizando una pulpa de coco y leche de coco comercial. En el método seco, el endospermo fue rallado y secado en un horno por convención a 35 °C durante 48 h, luego se prensó con un tornillo para extraer el aceite, y éste se filtró para eliminar los residuos insolubles. En el método húmedo de superior rendimiento se realizaron algunas modificaciones al propuesto por Raghavendra y Raghavarao (2010). Para ello, la leche de coco se centrifugó a

3,600xg durante 10 min y la capa superior de crema se retiró, y se llevó a 5 °C durante 24 h; luego, se colocó en un baño de agua a 50 °C para extraer el aceite que se separó en la parte superior. Los rendimientos más altos se obtuvieron con el método seco (88.4%) con respecto al método húmedo (86.6%), aunque la diferencia no fue importante.

Cuadro 1.4. Comparación de diferentes métodos de desestabilización de leche de coco para la extracción de AVC y rendimiento, R (Raghavendra y Raghavarao, 2010).

Método de desestabilización	Etapas del método			R (%)
	1	2	3	
Calentamiento	LC más calentamiento a 90 °C por 20 min	Centrifugación a 3,885xg durante 10 min para obtener la crema de coco	Separación de la crema de coco y centrifugación a 4,880xg por 15 min, para obtener el aceite	86
pH	LC más ajuste a pH 3 y reposo por 2 h			89
	LC más ajuste a pH 10 y reposo por 2 h			83
Enfriamiento	LC más enfriamiento a 5 °C por 6 h, luego hasta 29 °C			92
Enzimático	LC más enzima proteasa aspártica al 0.1% e incubación a 37 °C por 3 h			82
Combinados	LC más enzima proteasa aspártica al 0.1% incubación a 37 °C por 2 h.	Centrifugación a 3,885xg durante 10 min, la crema de coco obtenida se llevó a 5 °C durante 6 h y luego se descongeló hasta 29 °C	95	

### 1.1.3 Proteínas de coco y propiedades fisicoquímicas

Las proteínas poseen propiedades funcionales alimenticias relacionadas con los residuos de aminoácidos, por lo que en el Cuadro 1.5 se muestra la composición de los residuos polares y no polares de las globulinas y albúminas determinadas en una alta proporción en la pulpa de coco.

Cuadro 1.5. Residuos de albúmina y globulina

Variable	Albúmina <sup>1</sup>	Albúmina <sup>2</sup>	Globulina <sup>1</sup>	Globulina <sup>2</sup>
Polares (%)				
Arginina (Arg)	17.90	16.5	15.00	14.9
Ácido Aspártico /Asparagina (Asp/Asn)	5.60	8.0	8.90	9.2
Cisteína (Cys)	---	0.00	---	0.01
Glutamina/Ácido glutámico (Glu/Gln)	24.90	24.1	17.50	19.7
Histidina (His)	1.80	2.40	1.90	2.82
Lisina (Lys)	5.10	6.26	3.50	5.00
Serina (Ser)	3.10	4.76	5.00	5.00
Treonina (Thr)	3.30	3.17	3.30	3.40
Tirosina (Tyr)	3.00	2.55	3.70	3.30
Total, de residuos polares (%)	64.70	67.83	58.80	63.30
No polares (%)				
Alanina (Ala)	2.90	5.99	4.10	4.46
Fenilalanina (Phe)	2.70	3.45	5.90	5.19
Glicina (Gly)	4.00	4.42	4.90	4.96
Isoleucina (Ile)	2.80	2.44	4.10	3.54
Leucina (Leu)	3.90	5.13	6.50	7.23
Metionina (Met)	1.20	1.40	2.90	1.94
Prolina (Pro)	2.70	5.45	3.40	3.86
Valina (Val)	3.50	3.89	7.50	5.47
Total, de residuos no polares (%)	23.70	32.17	41.20	36.70

<sup>1</sup>Kwon *et al.* (1997). <sup>2</sup>Patil y Benjakul (2017)

Se observa que las albúminas poseen principalmente una concentración de residuos polares (64.70 - 67.80%), lo que le confiere su alta solubilidad en agua. La

concentración de los residuos ácidos (glutámico y aspártico), influye en que las proteínas de la leche de coco tengan un punto isoeléctrico ácido.

Las globulinas se encuentran en una más alta proporción en la pulpa de coco y según lo mostrado en el Cuadro 1.6, poseen la mayor concentración total de residuos no polares (32.70 - 36.70%), lo que las hace más solubles en sustancias no apolares.

De acuerdo con lo mostrado en el Cuadro 1.5 las fracciones de proteínas globulinas y albúminas están constituidas por todos los aminoácidos esenciales a excepción del triptófano (Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Val y His), lo que les confiere utilidad como proteínas alimentarias (Thaiphanit y Anprung, 2016; Kwon *et al.*, 1996).

Jin *et al.* (2017) determinaron en la globulina 11S o cocosin 11S una estructura oligomérica hexamérica con alta actividad alergénica. A través de la técnica de electroforesis SDS-PAGE, dicha proteína generó una banda a 55 kDa correspondiente al hexámero, una banda a 22 kDa o a la subunidad trimérica del hexámero con propiedades básicas, y una a 32 kDa, correspondiente a la otra subunidad trimérica del hexámero con propiedades ácidas. Las subunidades se separan del hexámero porque la proteína sufre una modificación proteolítica postraducciona durante la maduración. Adicionalmente, clonaron el gen que produce la proteína cocosin 11S y propusieron un modelo de su estructura a través de la técnica de difracción de rayos X (PDB: 5WPW). La proteína se definió como un oligómero homohexámero, constituido por dos monómeros, que a su vez son trímeros. La superficie de unión de las dos subunidades triméricas que constituyen el hexámero es altamente cargada, y las interacciones de la interfase se deben principalmente a interacciones hidrofóbicas (231 contactos), puentes de hidrógeno (23) y puentes salinos (5).

Angelia *et al.* (2010) evidenciaron para las globulinas 11S un punto isoeléctrico alrededor de 5.4, una solubilidad de 80 a 100% entre 5.4 a 9.0 unidades de pH y alta fuerza iónica ( $I=0.5$ ). Por cromatografía en gel la masa de la proteína cocosin 11S fue de 320 kDa, y por electroforesis SDS-PAGE presentó una banda a 55 kDa

(del hexámero), otras bandas alrededor de 24 a 21 kDa (subunidades básicas) y otras de 32 a 35 kDa (subunidades ácidas). La subunidad a 35 kDa tuvo mayor susceptibilidad a la digestión en comparación a la de 32 kDa, indicando diferencias en el tipo de aminoácidos y en la secuencia, lo que podría sugerir un mayor número de sitios de escisión en el isomorfo de 35 kDa. Por otro lado, las subunidades básicas fueron más resistentes a la digestibilidad que las ácidas.

Las proteínas solubles en pH alcalino extraídas por Mepba y Achinewhu (2003) de la pulpa de coco, presentaron una digestibilidad del 94% y al ser utilizadas como alimento favorecieron un mayor crecimiento de ratas en comparación a su crecimiento debido al consumo de las dietas control preparadas con caseína y almidón de maíz. Algar y Mabesa (2015) determinaron en el monómero de proteína con baja masa molecular (19 kD), una actividad antimicrobiana e inhibitoria sobre algunas levaduras involucradas en el deterioro de los alimentos.

### **1.1.3.1 Propiedades térmicas de las proteínas de coco**

Cuando las proteínas se someten a alta temperatura tienden a desnaturalizarse, exponiendo sus residuos hidrofóbicos internos, de tal forma que aumentan las interacciones proteína-proteína, se agregan y precipitan de forma irreversible. Por lo tanto, las propiedades térmicas de las proteínas se relacionan con su estabilidad termodinámica, la cual es importante conocer en los diferentes procesos industriales que realizan cambios de temperatura. Por ejemplo, Chambal *et al.* (2014) sugieren en un proceso de pasteurización, evitar la desnaturalización porque se pueden generar incrustaciones.

Angelia *et al.* (2010) determinaron para la proteína cocosin 11S una temperatura media de desnaturalización a 100.5 °C, cuando fue incubada a 100 °C durante 10 a 60 min se agregó y precipitó, reduciendo su concentración en solución de un 10 a 40%, respectivamente. Mediante una pasteurización a 100 °C la proteína permaneció intacta, al someterse a una temperatura de 121 °C durante 15 min se desnaturalizó completamente. Por su parte, Huang *et al.* (2016) también

demonstraron que dicha proteína presentó una estabilidad térmica a 100 °C y durante 20 min.

Por otro lado, utilizando la técnica de calorimetría diferencial de barrido, Tangsuphoom y Coupland (2009b) evidenciaron en la leche de coco coalescencia a 90 °C y floculación a 120 °C después de ser calentada por una hora, debido a la desnaturalización y agregación de las proteínas. En el estudio de Kwon *et al.* (1996), la albúmina purificada de la pulpa de coco tuvo una temperatura media de desnaturalización a 93 °C ( $T_m$ ) y la globulina entre 82 y 98 °C. Además, Rodsamran y Sothornvit (2017), determinaron para las albúminas y globulinas presentes en el extracto acuoso obtenido de la torta de leche de coco y de la torta aceite de coco, una temperatura media de desnaturalización alrededor de los 88 °C, en las glutelinas la  $T_m$  estuvo entre 151 a 160 °C.

Chambal *et al.* (2014) después de realizar una desnaturalización parcial por calentamiento de las proteínas del coco, observaron un incremento en la formación de geles. Los mejores resultados se obtuvieron con un calentamiento de 63 a 65 °C, pH de 8 a 9, y concentración al 15%. Mediante electroforesis SDS-PAGE se determinó que las proteínas involucradas en la gelificación correspondían a una masa molecular de 22 kDa, 32-34 kDa y 53 kDa, las cuales conciernen a los monómeros y al dímero de la proteína cocosin determinados por Jin *et al.* (2017).

#### **1.1.4 Métodos de extracción de proteínas de coco**

Tomando como base la Figura 1.2, se esquematizan en la Figura 1.3 las corrientes en donde se pueden obtener proteínas de coco, mediante diferentes métodos químicos de acuerdo con la solubilidad de las proteínas en diferentes disolventes (Patil y Benjakul, 2017; Kwon *et al.*, 1996), a diferentes valores de pH (Samson *et al.*, 1971), a un valor de pH específico o utilizando una solución amortiguadora en el cual se favorece la máxima solubilidad y extracción de las proteínas (Angelia *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2017). Además, se pueden aplicar métodos de extracción físicos y vía húmeda para así obtener las proteínas de la leche de coco (Thaiphanit y

Anprung, 2016), de la crema de coco (Onsaard *et al.*, 2006), de la pasta de leche de coco, un subproducto sólido de la extracción de la leche de coco y de la pasta de aceite de coco, un subproducto sólido de la extracción de aceite de coco (Rodsamran y Sothornvit, 2017).

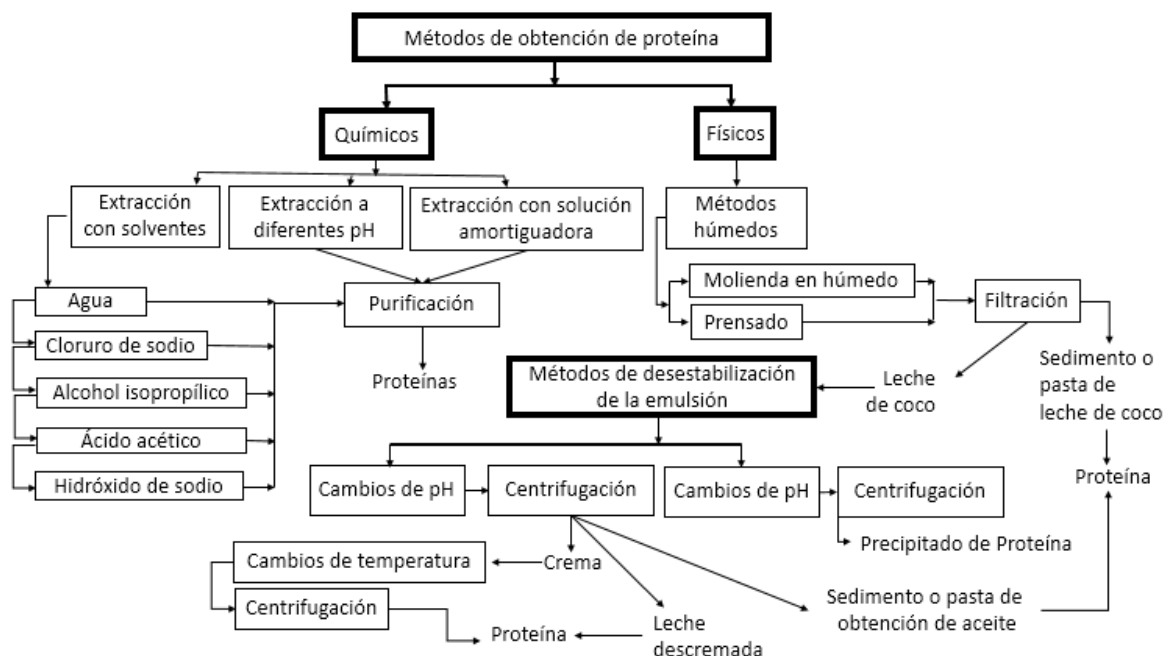


Figura 1.3. Esquema donde se resumen los métodos de extracción de proteínas de coco.

Por ejemplo, Kwon *et al.* (1996) y Patil y Benjakul (2017) extrajeron las diferentes fracciones de proteínas en función de su solubilidad en varios disolventes, partiendo de una pulpa de coco desengrasada y con un 17.2% de proteína total base seca (cuantificada vía Kjeldahl). Como se muestra en el Cuadro 1.6, las proteínas fueron extraídas a partir de la secuencia de solubilidad en agua, solución de cloruro de sodio al 0.5%, solución de alcohol isopropílico al 70%, solución de ácido acético al 50% y solución de hidróxido de sodio al 0.1 M. Las fracciones de proteínas fueron denominadas, albúminas, globulinas, prolaminas, glutelinas-1 y glutelinas-2, respectivamente.

El rendimiento de proteína calculado a partir de la suma porcentual de las fracciones solubles estuvo entre 71.0 y 91.7%. La suma de las albúminas y globulinas fue del

55.0 al 61.1%, por lo cual la mayoría de las proteínas del coco presentaron alta solubilidad en solventes polares. Además, Kwon *et al.* (1996) determinaron un 8.1% de proteína residual en pulpa, lo cual implica que dicho método no permitió extraer todas las proteínas de las células.

Cuadro 1.6. Fracción de proteínas de la carne de coco y valores promedio.

Variable	Fracción <sup>1</sup>	Fracción <sup>2</sup>
Rendimiento: fracción proteínica (%)	91.7	71.0
Secuencia y proteína		
Albúminas, solubles en agua (%)	21.0	19.0
Globulinas, solubles en 0.5% NaCl (%)	40.1	36.0
Prolaminas, 70% alcohol isopropílico (%)	3.3	2.0
Glutelinas-1, soluble 50% de ácido acético (%)	14.4	10.0
Glutelinas-2, soluble en 0.1 M NaOH (%)	4.8	4.0
Proteína no extraída (%)	8.1	--

<sup>1</sup>Kwon *et al.* (1996). <sup>2</sup>Patil y Benjakul (2017).

Entre los métodos químicos de extracción de proteínas a diferentes valores de pH, Samson *et al.* (1971) obtuvieron las fracciones realizando un barrido de pH 4 a 5 y posterior precipitación isoelectrica (pH en el cual la carga neta de las proteínas es cero). Por otro lado, Mepba y Achinewhu (2003) extrajeron un 27.6% de las proteínas solubles a un valor constante de pH alcalino, y posterior precipitación isoelectrica a pH 4. En el método se utilizó una pulpa de coco liofilizada y pulverizada que se dispersó en 20 mL de agua destilada, luego, se extrajeron las proteínas solubles en álcali ajustando a pH 9 con NaOH 1 N y con agitación constante. Seguidamente, la mezcla se centrifugó a 1,000xg durante 30 min, el sedimento obtenido se descartó y el sobrenadante se ajustó a pH 4.5 con HCl 1 N. Finalmente, después de aplicar una centrifugación a 1,000xg durante 30 min los sólidos de proteínas fueron precipitados, los cuales se re-suspendieron, se neutralizaron y se liofilizaron.

Entre los métodos de extracción que utilizan soluciones amortiguadoras a un pH específico y por arriba del punto isoelectrico en el cual se pueden solubilizar todas



las proteínas (alrededor de 4), Angelia *et al.* (2010) del endospermo de coco maduro rayado y desengrasado extrajeron las proteínas con una solución amortiguadora de fosfatos (5 mM de fosfato de potasio a pH 7.6, con NaCl 0.4 M, inhibidor de proteasas fluoruro de fenil metil sulfonilo 0.1 mM, reductor de puentes disulfuro  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, bactericida azida de sodio al 0.02%, complejante EDTA 1 mM, con agitación en baño de hielo durante 1h), determinando en mayor concentración las albúminas y globulinas de las cuales el 73% correspondió a la globulina 11S purificada.

Jin *et al.* (2017) para extraer las proteínas utilizaron una solución amortiguadora de Tris-HCl, tris (hidroximetil) aminometano (20 Mm, pH de 7.9, alta fuerza iónica con NaCl 1M, e incubación en baño de agua a 60 °C durante 30 min). Después de solubilizadas las proteínas su purificación se realizó variando la saturación con sulfato de amonio, seguido de diálisis, separación mediante cromatografía hidrofóbica y posterior separación por gel.

De forma complementaria, Huang *et al.* (2016) demostraron que la cocosin 11S representa el 86% de las globulinas y también posee una banda a 55 kDa vía SDS-PAGE. El otro 14% corresponden a las proteínas llamadas globulinas 7S. También realizaron un análisis proteómico completo de las diferentes proteínas de la pulpa de coco.

Entre los métodos de obtención de las proteínas de coco mediante métodos húmedos y posterior aplicación de métodos de desestabilización de la emulsión de leche de coco (tratamientos de cambios de pH y centrifugación para obtener un precipitado proteínico, mostrado en la Figura 1.3). Thaiphanit y Anprung (2016) utilizaron una la leche de coco comercial que se centrifugó a 7,440xg, 4 °C y durante 20 min. El sedimento se desechó, el sobrenadante y el precipitado se mezclaron y homogeneizaron. La mezcla se ajustó a pH 4 con HCl 1 N y luego se centrifugó a 5,700xg, 4 °C y durante 15 min. Después de decantar la capa del sobrenadante, el precipitado de proteínas obtenido se lavó en agua destilada y el procedimiento de

su separación se repitió dos veces. Las proteínas precipitadas se liofilizaron para producir un concentrado proteínico.

Por otro lado, Onsaard *et al.* (2006) a través de métodos de desestabilización de emulsiones separaron las proteínas de la crema de coco. Para ello, utilizaron una pulpa de coco que se trituró con un rallador eléctrico y la leche de coco se obtuvo mezclando una parte de la pulpa de coco con una parte de agua y presión hidráulica en una bolsa de tela de doble capa. Luego, las fracciones de proteínas de la crema de coco se prepararon utilizando los siguientes métodos:

(a): la leche de coco se ajustó a pH 3.9 con 0.1 o 1.0 M de CH<sub>3</sub>COOH y se dejó reposar por un mínimo de 8 h a 4 °C. La LC acidificada se separó en dos fases: una fase acuosa inferior y una fase superior de crema. La fase acuosa inferior se descartó, la fase de crema superior se calentó entre 35 y 40 °C en un baño de agua y se centrifugó a 5,500xg durante 30 min para fundir el aceite y separarlo de la fracción proteínica. La solución acuosa debajo del aceite fundido se colectó y se mezcló con hexano para eliminar la presencia de aceite residual. La solución resultante se liofilizó para producir la fracción de proteínas.

(b): La LC se centrifugó a temperatura ambiente para separarla en dos fases: crema y leche descremada. La fracción de crema de coco se recogió, se congeló a -20 °C durante 12 h, y luego se calentó a 40 °C en un baño de agua. Después, la fase acuosa obtenida se separó del aceite de coco fundido mediante centrifugación a 5,500xg, durante 30 min y se enjuagó con hexano para eliminar cualquier aceite residual. La solución resultante se liofilizó para producir la fracción de proteínas.

Rodsamran y Sothornvit (2017) extrajeron las proteínas solubles en álcali o glutelinas presentes en el concentrado generado en la obtención de la leche de coco y en el concentrado generado en la obtención del aceite de coco (Figura 1.3). En la extracción el material se mezcló con agua destilada en una relación de 1:12, se ajustó a pH 11 con fosfato de sodio 0.7 M, se agitó a 50 °C y durante 1 h. La suspensión obtenida se centrifugó en frío a 12,000xg, a 0 °C y durante 30 min, el sobrenadante se recogió y se liofilizó para obtener el sólido de proteínas.

## 1.2 Sustancias fenólicas

### 1.2.1 Clasificación de los fenoles y propiedades

Los fenoles son compuestos químicos que están constituidos por un anillo bencénico sustituido con uno o más hidroxilos. Los polifenoles están conformados por dos o más anillos fenilo y el concepto también aplica para más de un sustituyente hidroxilo del anillo.

Existe una amplia clasificación de estas sustancias en función de los grupos funcionales sustituyentes en el anillo bencénico del fenol o del número de anillos bencénicos en el fenol, entre los que sólo se mencionan como ejemplos los fenoles simples derivados del benceno ( $C_6$ ), los fenoles ácidos [ $C_6-C_1$ . Grupo sustituyen: ácido carboxilo. Ejemplos: ácido *p*-hidroxibenzoico, gálico, protocatechuico, salicílico, siríngico y vinílico], los fenoles ácidos hidroxicinámicos [ $C_6-C_3$ . Derivados del ácido cinámico. Ejemplos: ácido cafeico, *p*-cumárico, 5-hidroxiferúlico, ferúlico y sinápico], los ésteres de ácidos cinámicos [ácido clorogénico], los flavonoides y derivados [ $C_6-C_3-C_6$ , dos anillos de benceno unidos por un grupo de tres carbonos], melaninas de catecol ( $C_6$ )<sub>n</sub> y antocianinas [polifenoles heterocíclicos] (Lattanzio, 2013).

Los fenoles están presentes en frutos o plantas, y son de interés alimenticio por sus propiedades antioxidantes y astringentes. Su actividad antioxidante se debe a que se oxidan y reducen a los radicales libres muy reactivos por tener un electrón desapareado, generando una inhibición en la reacción de propagación de formación de radicales libres y finalmente una protección de la oxidación de los lípidos o proteínas presentes (Singleton *et al.*, 1998).

Los fenoles pueden cuantificarse al hacerlos reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual es una solución amarilla debido a la presencia ácido fosfomolibdotúngstico. En la reacción los fenoles en un medio básico se ionizan a fenolatos y se oxidan mientras que el reactivo de Folin se reduce para generar un complejo que se observa de color azul en la solución y puede ser cuantificado por

colorimetría (Singleton *et al.*, 1998). Con este método se cuantifican los fenoles en conjunto, mientras que su especiación se puede realizar través de HPLC (Marina *et al.*, 2009a; Seneviratne *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2016; Mahayothee *et al.*, 2016).

### **1.2.2 Métodos de extracción de fenoles**

Los compuestos fenólicos en la pulpa de coco, en el aceite o en la proteína de coco, generalmente son extraídos en metanol concentrado o en una solución metanólica. Mahayothee *et al.* (2016) extrajeron los fenoles de la pulpa de coco mezclando el endospermo húmedo con metanol, seguido de una filtración y evaporación del extracto líquido al vacío y a 50 °C; el producto concentrado se llevó al volumen deseado con metanol. Marina *et al.* (2009a) solubilizaron el aceite de coco en hexano y extrajeron los fenoles con metanol al 60%. Seneviratne *et al.* (2009) mezclaron el aceite con metanol acuoso al 80%, la muestra se centrifugó y la solución superior se colectó. Naik *et al.* (2012) extrajeron fenoles de la proteína mezclándola con metanol concentrado, seguido de una centrifugación y el sobrenadante se almacenó. En todos los casos la cuantificación de los fenoles en el extracto se realizó por colorimetría con el reactivo de Folin-Ciocalteu, entre 725 y 760 nm.

El Consejo Oleico Internacional (2009) sugiere extraer los fenoles en el aceite de oliva con una solución metanólica al 80% y con un baño ultrasónico durante 15 min, seguido de una centrifugación y separación del sobrenadante para una posterior cuantificación por HPLC. Rodrigues *et al.* (2008) optimizaron la extracción de los fenoles en el endocarpio del coco y evidenciaron la máxima extracción con una solución al 50% (v/v) de etanol: agua ajustada pH 6.5, relación de sólidos de 50% e intensidad ultrasónica de 4870 W/m<sup>2</sup> durante 15 min.

### 1.2.3 Fenoles en coco

Los fenoles totales en la pulpa de coco y en el aceite se han correlacionado con una actividad antioxidante y en el aceite con una actividad antiinflamatoria y antidiabética (Seneviratne *et al.*, 2009; Siddalingaswamy *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2015; Svenia *et al.*, 2017; Mahayothee *et al.*, 2016).

Mahayothee *et al.* (2016) determinaron los fenoles totales en la pulpa de coco de frutos de dos variedades cosechados con 6.0, 6.3 y 7.5 meses después de su polinización. Como se observa en el Cuadro 1.7, los dos índices de actividad antioxidante (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, DDPH; ácido 2,2'-azino-bis, ABTS) aumentaron en los frutos maduros de 6 a 6.3 meses y se mantuvieron sin cambios significativos a 7.5 meses de madurez.

Cuadro 1.7. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante medido por DDPH y ABTS en la carne de coco con diferentes estados de madurez y obtenida de diferentes variedades (Mahayothee *et al.*, 2016).

Variedad de coco	Madurez (mes)	Fenoles totales (mg GAE/100 g coco húmedo) <sup>1</sup>	DDPH (% inhibición) <sup>2</sup>	ABTS (μM Trolox/g FW) <sup>2</sup>	Fenoles totales (mg GAE/100 g coco seca) <sup>3</sup>
<i>Samut Sakhon</i>	6.0	8.41 <sup>b*</sup>	57.77 <sup>b</sup>	4.97 <sup>b</sup>	33.2
	6.3	9.84 <sup>a*</sup>	77.54 <sup>a</sup>	7.54 <sup>a</sup>	30.1
	7.5	6.28 <sup>c*</sup>	73.95 <sup>a</sup>	7.39 <sup>a</sup>	14.0
Ratchaburi	6.0	6.85 <sup>B*</sup>	58.87 <sup>b</sup>	4.00 <sup>b</sup>	26.6
	6.3	10.01 <sup>A*</sup>	71.72 <sup>a</sup>	7.69 <sup>a</sup>	29.8
	7.5	6.82 <sup>B*</sup>	69.99 <sup>a</sup>	6.46 <sup>a</sup>	16.0

<sup>1</sup>Interacción significativa (p <0.05). Las diferencias significativas dentro de la misma área de siembra están indicadas por diferentes letras. <sup>2</sup>Interacción significativa (p<0.05). Las diferencias significativas se indican con letras diferentes. <sup>3</sup>Calculados a partir de los valores reportados. \*Diferencias significativas con igual estado de madurez

Los fenoles en base húmeda no presentaron diferencias significativas entre variedades y mismo grado de madurez. Sin embargo, después de calcular los resultados en base seca, se evidencia que los fenoles en la materia seca en general disminuyen al incrementar la maduración.

#### **1.2.4 Fenoles en el aceite de coco**

En el aceite de coco la concentración de fenoles y su actividad antioxidante depende de la temperatura en el proceso de extracción. En general, el aceite de coco presenta mayor contenido de fenoles, cuando la emulsión se desestabiliza a altas temperaturas (por arriba de 60 °C), en comparación con los métodos que utilizan bajas temperaturas (menores a 10 °C). Un ejemplo de ello, son los estudios presentados por Seneviratne *et al.* (2009) en el que cuantificaron un mayor contenido de fenoles y una mayor actividad antioxidante del AVC cuando la leche de coco se calentó entre 100 y 120 °C, en comparación con el tratamiento a 10 °C durante 10 h.

También los fenoles se han reportado en mayor concentración en el AVC que en el aceite refinado, blanqueado y desodorizado, la composición varía entre los diferentes aceites comerciales y depende del proceso extracción seguido. También, el AVC presentó una mejor actividad antioxidante por la presencia de dichas sustancias (Marina *et al.*, 2009a; 2009b).

En la pulpa de coco los fenoles, ácido cafeico, gálico, salicílico, *p*-cumárico y *p*-hidroxibenzoico y el polifenol catequina se cuantificaron en mayor concentración y el ácido siríngico y *m*-cumárico en menor proporción (Mahayothee *et al.*, 2016). En el aceite se han reportado, ácido gálico, ferúlico, protocatechuico, *p*-cumárico, siríngico, vanílico, y cafeico, además de tocoferoles y los polifenoles catequina y (-)-epigallocatequina (Marina *et al.*, 2009a; 2009b; Seneviratne *et al.*, 2009; Siddalingaswamy *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2016).

### **1.3 Sistemas dispersos y propiedades de superficie de las proteínas**

#### **1.3.1 Emulsiones y espumas**

Las emulsiones y espumas son sistemas dispersos termodinámicamente inestables constituidos por dos o más líquidos inmiscibles (ejemplos: líquido-líquido, líquido-gas), en las cuales una de las fases se dispersa en pequeñas gotas o burbujas

esféricas (la fase dispersa) en la otra (la fase continua), siendo la interfase la región o el límite de la superficie de las dos fases de contacto. Por ser las fases inmiscibles el sistema disperso tiende a separarse con el tiempo y no se restablece a través de una simple agitación (Mc Clements, 2004; Dickinson, 2003).

El término termodinámicamente inestable se refiere a que la energía libre de Gibbs de la dispersión es positiva, porque el proceso de formación de la dispersión no es espontáneo (a presión, volumen y temperatura constante). La energía libre de Gibbs ( $dG = \sigma dA$ ), depende de la tensión superficial ( $\sigma$ ) de la interfase y el área superficial ( $dA$ ) de la fase dispersa (Hadjittofis *et al.*, 2017), por lo que una reducción del área superficial de las gotas o burbujas dispersas conduce a que la energía libre se aproxime a cero y aumente la estabilidad de las gotas o burbujas, así como por la reducción de la tensión superficial. No confundir con el incremento del área superficial de la emulsión por homogenización, que considera todas las partículas como sistema de referencia.

Al adicionarse agentes de superficie activa como las proteínas surfactantes, éstas se adsorben en la interfase mediante interacciones químicas con las dos fases (propiedad anfifílica), reduciéndose la tensión superficial y generando un aumento en la estabilidad (Dickinson, 2003). El proceso de reducción del tamaño de partícula de la fase dispersa se conoce como homogenización (Mc Clements, 2004).

Las capacidad emulsificante o espumante de una proteína se relacionan con su habilidad en reducir la tensión superficial en la interfase aire/agua o aceite/agua y formar una dispersión con una estabilidad termodinámica mejorada. Mientras la estabilidad (estabilidad cinética) se refiere a la capacidad de mantenerse la dispersión en el tiempo sin generarse cambios en sus propiedades fisicoquímicas. La estabilidad cinética se puede estudiar visualmente y midiendo el tiempo en que el sistema disperso se demora en separarse sin ser agitado (Mc Clements, 2004; Herrera, 2012).

En una emulsión aceite en agua cinéticamente inestable, se puede producir el cremado, floculación o coalescencia, procesos que pueden causar la ruptura de la

emulsión. La floculación es la adhesión de los glóbulos sin fusionarse, el cremado se produce cuando los glóbulos entran en contacto o están formando pequeños glóbulos y se observa en la fase superior de la emulsión debido a la diferencia de densidad entre las fases. La coalescencia es el proceso más drástico en el cual dos o más gotas se fusionan para formar una sola gota más grande (Mc Clements, 2005).

### **1.3.2 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas en la interfase**

Las proteínas que son anfifílicas tienen una actividad de superficie similar a los surfactantes al estabilizar sistemas dispersos como emulsiones y espumas, por lo cual el mecanismo de adsorción, el abatimiento de la tensión superficial o la estimación de su concentración en la interfase son importantes de estudiar (Beverung *et al.*, 1999). Además, la flexibilidad y agregación de las proteínas adsorbidas en la interfase aceite/agua o líquido/aire genera la formación de una multicapa con propiedades viscoelásticas, proceso de adsorción complejo que puede facilitar o dificultar la formación de una emulsión o espuma (Baldursdottir *et al.*, 2010). Algunas propiedades como la carga de la partícula (relacionada con el potencial zeta), el tamaño de partícula o la composición química de las proteínas pueden influir en su mecanismo de adsorción a la interfase, o en la estabilidad de las dispersiones.

El potencial zeta (Figura 1.4) es una propiedad física exhibida por cualquier partícula dispersa, describe la naturaleza del potencial electrostático cerca de la superficie de la partícula y corresponde al potencial que se mide entre la capa de Stern (potencial debido a la presencia de los contraiones) y la capa difusa (Hadjittofis *et al.*, 2017). Un mayor potencial zeta da como resultado un incremento en las fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas, por lo tanto, se aumenta distancia de separación entre las partículas en la dispersión y se reduce la agregación/floculación generada por las interacciones de Van der Waals.



Las mediciones del tamaño de gota pueden usarse para determinar los cambios en las propiedades de inestabilidad cinética de la emulsión. Cuando todas las gotas en una emulsión tienen el mismo tamaño, la emulsión se denomina "monodispersa". Si existen diferentes tamaños de gotas, las emulsiones se denominan "polidispersas".

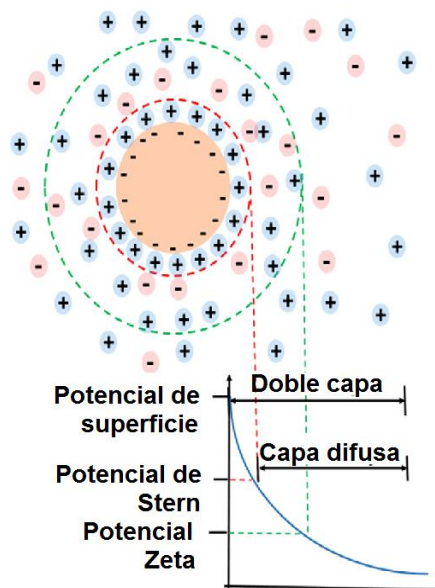


Figura 1.4. Esquemmatización de la doble capa alrededor de una partícula cargada negativamente y el correspondiente gráfico que muestra el cambio en la magnitud del potencial a diferentes distancias desde la superficie de la partícula (Hadjittofis *et al.*, 2017).

Patil y Benjakul (2017) midieron en emulsiones aceite en agua conteniendo albúmina o globulina de coco, el diámetro de partícula volumétrico, en ausencia y en presencia de dodecil sulfato de sodio, una vez formada la emulsión y después de 24 h de formarse. Determinaron que el tamaño de gota aumentó con el tiempo, y a partir del cual calcularon un índice de floculación que estuvo relacionado con el aumento del índice de coalescencia y de cremado, siendo el índice de cremado y de coalescencia de mayor magnitud en presencia de la albúmina de coco.

Un menor tamaño de partícula reduce la inestabilidad de las dispersiones y la presencia de las proteínas adsorbidas en la interfase, con carga negativa o positiva, estabilizan las dispersiones porque generan repulsiones electrostáticas entre las gotas de la fase dispersa, lo que puede compararse como un recubrimiento

protector que previenen la floculación y coalescencia (McClements, 2004; Nylander *et al.*, 2008).

En investigaciones de emulsiones aceite en agua, homogenizadas en presencia de cocosin sin adición de NaCl, presentaron estabilidad cinética por arriba de 60 min; mientras que se visualizó la formación de crema en emulsiones que contenían NaCl (4 M), diez minutos después de formarse (Angelia *et al.*, 2010). Este es un comportamiento particular contrario al observado en casi todas las globulinas, y se debe a la solubilidad de la cocosin a baja fuerza iónica, propiedad única que se puede aprovechar en formulaciones que requieren bajo contenido de sal. Kwon *et al.* (1996), Mepba *et al.* (2008) y Jin *et al.* (2017) también evidenciaron una misma tendencia en la solubilidad.

En estudios de emulsificación o espumado, se reportó alta capacidad emulsionante de las glutelinas de coco a pH 2 y pH 10, por lo cual la carga neta positiva o negativa de las proteínas en la interfase podría facilitar la actividad emulsificante, también se podría decir que una compresión de la doble capa difusa en las gotas de aceite pudo incrementar esta propiedad. La emulsión fue estable entre 36 y 48 h, aunque la capacidad espumante se vio reducida cuando se incrementó el pH de 4 a pH 10, colapsando la espuma en 48 h, por lo cual una carga neta negativa de las proteínas en la interfase no favoreció la formación de espuma (Mepba *et al.*, 2008).

Patil y Benjakul (2017) prepararon emulsiones de AVC en agua, una estabilizada con albúminas y la otra con globulinas de coco. La emulsión con globulinas presentó diámetro de partícula menor determinado por microscopía, donde se observaron gotas de forma y tamaño más uniforme (menor polidispersidad), además de que se cuantificó un índice de cremado menor, sugiriendo que las globulinas son mejores emulsificantes, lo que se podría atribuir a una más eficiente migración y adsorción en la interfase aceite/agua.

De acuerdo con lo mostrado en el Cuadro 1.5 las globulinas del coco presentan la más alta concentración total de residuos no polares, en comparación con las demás fracciones, muestra interacciones más fuertes con el aceite de coco, al mismo

tiempo que interactúan con el agua, lo que se traduce en una mayor capacidad emulsionante y como consecuencia de estabilidad. Desde luego, los residuos no polares podrían ser los que determinaron el incremento de su adsorción en la interfase.

Rodsamran y Sothornvit (2017) para las glutelinas presentes en residuos proteínicos generados en la obtención de la leche de coco y en los generados en la obtención del aceite de coco, determinaron propiedades emulsificantes, de formación de espumas y de absorción de agua.

### 1.3.3 Tensión superficial

En el centro de un material en cualquier estado de la materia, las moléculas interactúan simétricamente con el resto, las moléculas en la superficie del material exhiben interacciones anisotrópicas que conducen a una fuerza neta hacia el centro del material. Este desequilibrio de fuerza da lugar al concepto de tensión superficial (para líquidos) o energía superficial (para sólidos). La tensión superficial se define como la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área (Hadjittofis *et al.*, 2017), no obstante, la tensión de superficie también es equivalente a la fuerza desde el centro del material que actúa a lo largo de la superficie.

A medida que una proteína se adsorbe en la interfase de la emulsión o de una espuma, la tensión superficial ( $\sigma$ ) tiende a disminuir y se alcanzan equilibrios que pueden ser caracterizados mediante isothermas de tensión superficial en función del tiempo. También se pueden generar isothermas de presión superficial ( $\pi_i$ ), restando la tensión de la dispersión ( $\sigma$ ), a la tensión de la superficie vacía o del líquido puro ( $\sigma_{\text{agua}} = 72.8 \text{ mN/m}$ ) (Karbashi *et al.*, 2014; Tamm *et al.*, 2012), a través de la ecuación:

$$\pi_i = \sigma_o - \sigma$$

El mecanismo de adsorción o el cambio de la tensión en función del tiempo se pueden resumir en las tres regiones mostradas en la Figura 1.5. En el primero de inducción, la tensión es la del líquido puro y las bajas concentraciones de las proteínas en la interfase no generan un descenso apreciable de la tensión.

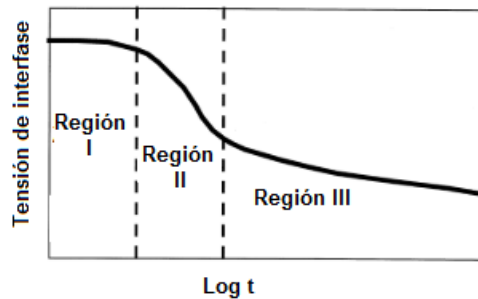


Figura 1.5. Dinámica de la tensión en la interfase típica de la proteínas en solución acuosa diluida que se adsorbe a la interfase aceite-agua o agua-aire (Beverung *et al.*, 1999).

En la región 2 se observa el descenso de la tensión por arriba de cierta concentración de la sustancia adsorbida, debido a la alta difusión de nuevas proteínas desde el seno de la dispersión y al aumento de la concentración hasta saturación. Simultáneamente, las proteínas adsorbidas tienden a exponer sus grupos hidrofóbicos internos, incrementando así el número de contactos entre las proteínas y la superficie, mediante cambios conformacionales que pueden modificar su plegamiento nativo o causar su desnaturalización.

En la región III se produce un lento declive en la tensión atribuido a los cambios conformacionales de la capa adsorbida y a la continua construcción de una red similar a la de un gel con propiedades viscoelásticas, asociado a los cambios conformacionales y a la agregación de las proteínas (Beverung *et al.*, 1999; Ybert y di Meglio, 1998).

### 1.3.4 Reología en la interfase

Las proteínas adsorbidas en la interfase durante la formación de espumas y emulsiones, retardan o previenen la coalescencia de las gotas o burbujas recién

formadas y proveen a la superficie estabilidad, además de propiedades viscosas y elásticas, que son estudiadas a través de pruebas dinámicas de reología en la interfase (Benjamins y Lucassen-Reynder, 2009). En esas últimas se evalúa la relación entre la deformación de la interfase en la superficie con los cambios de la tensión en función del tiempo (Baldursdottir *et al.*, 2010).

Se pueden distinguir dos tipos de deformaciones en las interfases líquidas: dilatacional y cizallamiento. En las deformaciones dilatacionales, el área de la superficie del líquido o la dispersión aumenta o disminuye, mientras que la forma del área de la superficie sigue siendo la misma. En las deformaciones de cizalla de superficie, se mide la respuesta de la superficie a cambios en la forma a área constante (Bos y Van Vliet, 2001; Benjamins y Lucassen-Reynder, 2009).

En la reología dilatacional las mediciones pueden ser realizadas cerca de la fase 3 mostrada en la Figura 1.5 o en el pseudoequilibrio alcanzado, a través de diferentes métodos como la reología de gota pendiente. En dicho método se utiliza el instrumento esquematizado en la Figura 1.6, en el cual, con una jeringa controlada de forma automática, se realizan deformaciones de expansión y compresión sobre la gota pendiente. Dichas deformaciones generan un cambio de la curvatura de la gota que es registrada por una cámara y mostradas en el monitor de video.

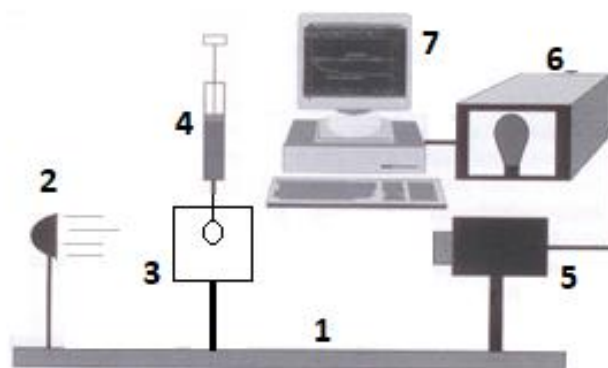


Figura 1.6. Tensiómetro de gota pendiente (1) espacio óptico; (2) fuente de luz; (3) cubeta en donde se forma la gota; (4) jeringa con la que se forma la gota y se controla el volumen de manera automatizada; (5) cámara; (6) monitor de video; (7) computador para tratamiento de datos. Adaptado de Benjamins y Lucassen-Reynder (2009).

En una medición dinámica, los parámetros viscoelásticos de superficie son definidos como módulos dilatacionales de superficie, elástico ( $E'$ ) y viscoso ( $E''$ ). Experimentalmente se aplica un cambio relativo infinitesimal de variación sinusoidal del área de la superficie ( $dA/A = d(\ln A)$ ). Esta deformación conduce a un cambio sinusoidal en la tensión superficial  $d\sigma$ . En consecuencia, el módulo elástico o de almacenamiento de energía corresponde a la relación de dichas propiedades y es una medida de la rigidez de la interfase contra una dilatación o compresión. El módulo viscoso o de pérdida de energía ( $E''$ ), se obtiene por el producto de la viscosidad,  $\eta_d$ , y la frecuencia angular utilizada  $\omega$ , mediante las ecuaciones:

$$E' = d\sigma / d \ln A; E'' = \omega \eta$$

El módulo viscoelástico  $E$ , es un número complejo con una parte real  $E'$  (módulo de almacenamiento) e imaginaria  $E''$  (módulo de pérdida). Experimentalmente la parte imaginaria es reflejada en la diferencia de fase entre la tensión superficial ( $d\sigma$ ) y la deformación ( $dA$ ), por lo cual, la contribución elástica e imaginaria son dadas por:

$$E = E' + i E''; E' = |E| \cos \varphi; E'' = |E| \sin \varphi$$

Donde,  $|E|$ , es el valor absoluto del módulo complejo y  $\varphi$  es el ángulo de fase viscoso (Benjamins y Lucassen-Reynder, 2009). A partir de la relación entre los módulos elástico y viscoso se puede calcular  $\tan \varphi (E''/E')$ , la cual si es menor a 1 permite identificar un mayor comportamiento elástico.

Por otro lado, en algunos casos de estudio las propiedades de superficie de las proteínas hidrolizadas en medio ácido del coco han sido evaluadas en la interfase aire/agua, generando un aumento de la presión de la interfase entre 33.1 y 36.8 mN/m, por su parte, las proteínas sin hidrólisis y dispersas en agua y en solución amortiguadora de fosfato (0.1M, pH 6.9), propiciaron un aumento de la presión entre 15.4 a 17.6 mN/m en la interfase aire/agua (Thaiphanit y Anprung, 2016; Thaiphanit *et al.*, 2016). En el estudio de Onsaard *et al.* (2006) las proteínas de la crema de coco a una concentración de 0.1 M, generaron un aumento de la presión en la interfase aire/agua de 28 mN/m. Sin embargo, en la literatura no se encontró

información de la cinética de adsorción y las propiedades viscoelásticas de las proteínas de coco.

#### **1.4 Extracción asistida**

Los procesos de secado, el enfriamiento y congelamiento para la conservación, así como la extracción son tradicionales en la industria de alimentos, para los cuales se han desarrollado nuevas tecnologías económicas y ambientalmente sostenibles como la extracción asistida por microondas (EAM) y ultrasonido (EAU). Los procesos de extracción convencionales presentan alto requerimiento energético, degradaciones térmicas y presentan un elevado consumo de solventes. Por lo tanto, la EAM y EAE son tecnologías verdes y mejoran la calidad de los alimentos, reducen los tiempos de procesos y los desechos industriales (Chemat *et al.*, 2011; Rombaut *et al.*, 2014; Gude, 2015; Ekezie *et al.*, 2017; Vinatoru *et al.*, 2017). Además de la extracción, el secado, el cocimiento de los alimentos, la filtración, la oxidación, inactivación de enzimas y la homogenización de emulsiones son mejoradas con estas tecnologías, aunque a continuación sólo se presenta el principio de operación, algunas de sus aplicaciones de laboratorio, industriales y en el coco.

##### **1.4.1 Principios de la radiación de microondas**

Las microondas (MO) son radiaciones u ondas electromagnéticas con una frecuencia de 0.3 a 300 GHz y las ondas domésticas e industriales en hornos tienen una frecuencia de 2.45 GHz. En la extracción asistida por microondas el agua *in situ* de las células vegetales se calienta con las MO, lo que aumenta la presión dentro de las células de la planta que empuja la pared desde el interior, estirándola y finalmente rompiéndola para así, facilitar la lixiviación de las moléculas de interés al disolvente circundante. En consecuencia, se incrementan los rendimientos de extracción en menor tiempo y una reducción del consumo de energía (Vinatoru *et al.*, 2017).

De acuerdo con lo mostrado en la Figura 1.7, el calentamiento es el resultado de dos mecanismos principales del sistema: la conducción iónica y la polarización dipolar (rotación dipolar) (Gude, 2015). El primero de éstos se refiere a la migración electroforética inducida de los portadores de carga (ejemplos: iones y electrones) bajo la influencia del campo eléctrico producido por las microondas. La migración genera una "fricción" entre los iones en movimiento y el medio, lo cual causa el calentamiento. En el segundo principio, la rotación del dipolo ocurre cuando las moléculas dipolares intentan alinearse con el campo eléctrico de las ondas microondas. La oscilación de dichas sustancias dipolares genera colisiones entre sí y con las moléculas circundantes, en consecuencia, se produce un aumento de la temperatura (Zhang *et al.*, 2011).

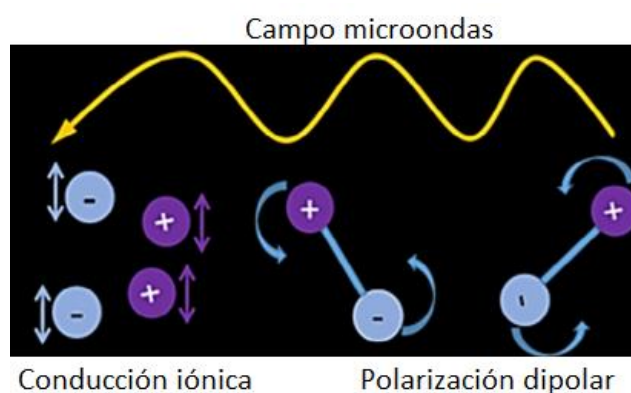


Figura 1.7. Causas de los efectos de las MO a través de la conducción iónica y la polarización dipolar (Gude, 2015).

#### 1.4.4 Aplicaciones de extracción por microondas

La EAM puede realizarse directamente sobre el material de interés o en presencia de solventes acuosos u orgánicos. Se ha utilizado en la separación de aceites esenciales y de los metabolitos secundarios como compuestos fenólicos en té, maní y plantas (Zhang *et al.*, 2011). Su posible uso se ha ejemplificado en procesos de biorrefinería para la extracción de pectina de naranja (Rombaut *et al.*, 2014).

Ciriminna *et al.* (2016) presentaron un extractor a escala piloto en donde su rotación asegura una distribución homogénea de las MO sobre las plantas, la cavidad del



equipo de acero inoxidable contiene un soporte de teflón removible a través del cual pasa el material de interés y con una capacidad de obtención de 75 L. En Francia se desarrolló un reactor piloto a escala semiindustrial (100 L, 30 kW, 915 MHz), y de procesamiento en línea (100 L, 6 kW, 2.45 GHz), con múltiples aplicaciones de extracción (Li *et al.*, 2013). La comparación simulada a gran escala en términos de velocidad, rendimiento, consumo de energía del EAM con otras técnicas convencionales (extracción sólido-líquido) o emergentes (extracción de líquido presurizado, extracción asistida por ultrasonido), mostró que las MO proporcionan beneficios tangibles (viabilidad económica), que podrían ser explotados a escala industrial, como, por ejemplo, para la extracción de compuestos bioactivos y polisacáridos (Soria *et al.*, 2015). La empresa Crodarom con sede en Francia, procesa a escala industrial 1000 toneladas por año de compuestos activos de plantas y la empresa Oleose del mismo país, combina la EAM con cavitación ultrasónica a baja frecuencia para producir más de 50 extractos oleosos de diferentes plantas y que contienen moléculas funcionales. En Alberta Canadá, la empresa Canada's Radiant tiene la capacidad de procesar hasta 200 kg de biomasa por día, y en 2014 tenía previsto recuperar más de 20 millones de dólares por año (Ciriminna *et al.*, 2016).

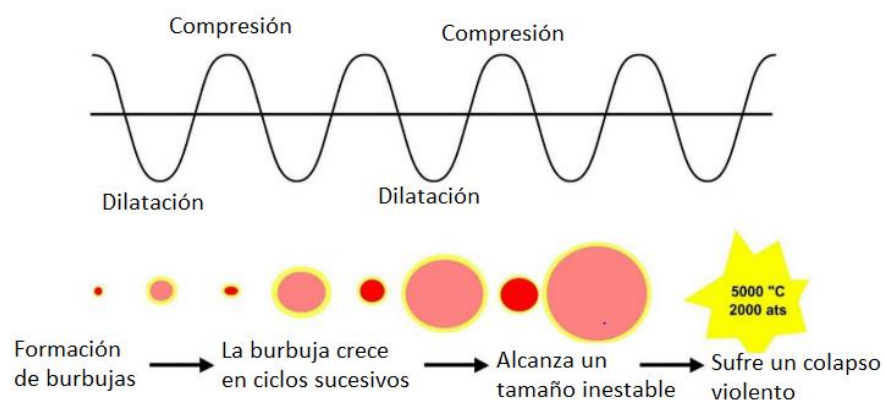
Chemat *et al.* (2017) mencionaron que la combinación de EAU con la EAM mediante una irradiación simultánea redujo drásticamente los tiempos de proceso y requirió niveles de potencia más bajos que las dos fuentes de energía individuales. La EAU puede mejorar significativamente la extracción de un componente objetivo principalmente a través del fenómeno de la cavitación. El efecto ultrasónico mecánico promovió la liberación de compuestos solubles del cuerpo de la planta al romper las paredes celulares, mejorando la transferencia de masa y facilitando el acceso del disolvente al contenido celular. Mientras tanto, las MO calientan la muestra en su totalidad induciendo muy rápidamente la migración de moléculas disueltas. La irradiación simultánea aumenta la penetración del solvente en la matriz, facilita la solvatación del analito y generando un incremento en la solubilidad de los compuestos objetivo.

En la industria del coco Quitain *et al.* (2013) utilizaron esta tecnología para extraer aceite de coco. En el método se secó la pulpa de coco utilizando un equipo con aire caliente asistido por MO, a una frecuencia de 2.45 GHz y el AVC se extrajo utilizando dióxido de carbono supercrítico. El rendimiento fue del 95% en 20 h de proceso, en comparación al 30 a 50% obtenido con un método convencional de expulsión directa por prensado y entre 48 y 72 h de proceso. Sin embargo, a la fecha no existe información en la literatura de extracción de aceite de coco a escala industrial con estas técnicas alternativas, a pesar de que son promisorias para una extracción eficiente.

#### **1.4.2 Principio de la radiación de ultrasonido**

Las ondas de US son radiaciones electromagnéticas con una frecuencia de 20 kHz a 10 MHz que son aplicadas en métodos definidos como EAU. En los cuales las ondas se propagan a través del disolvente y generan fenómenos químicos y físicos (vibración, aumento de la presión, ondas de choque, fuerzas de compresión-expansión, micro explosiones, transmisión acústica, cavitación acústica y formación de radicales), que actúan sobre el material presentes en el medio de propagación, como por ejemplo, las células sobre las que producen la ruptura de la pared celular y favorecen la liberación del material intracelular y desde luego la sustancia de interés (Tiwari, 2015).

En la extracción acústica por cavitación (Figura 1.8), la onda ultrasónica se propaga a través de una serie compresiones y dilataciones inducidas en las moléculas del medio líquido, cuando la potencia es suficientemente alta, el ciclo de expansión puede exceder las fuerzas atractivas de las moléculas del líquido y se crean cavidades o burbujas de aire, que también colapsan en todo el ciclo hasta obtener una burbuja de mayor tamaño e inestable, que finalmente colapsa con la formación de puntos calientes localizados, inclusive con temperaturas de 5000 K (Tiwari, 2015; Vinatoru *et al.*, 2017).



**Figura 1.8.** Creación de burbujas por cavitación y su colapso (Vinatoru *et al.*, 2017).

El colapso de estas cavidades genera ondas de choque liberadas con alta velocidad, que golpean con la pared celular de las semillas y crean grietas, hendiduras, y microfracturas. Debido a esto, el solvente puede difundir fácilmente a través de la célula y acelerar la liberación de las sustancias intracelulares al medio de extracción. Por otra parte, el colapso de la cavidad causa una turbulencia muy alta, lo que mejora la mezcla de las fases sólido-líquido y la velocidad de transferencia del soluto. Desde luego, se obtienen mejores rendimientos de extracción de sustancias en menor tiempo (Jadhav *et al.*, 2016).

### 1.4.3 Aplicaciones de extracción por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido se ha combinado a la extracción con Soxhlet reduciendo los tiempos del laboratorio, para obtener los lípidos y conocer su composición en las semillas oleaginosas, en las salchichas, quesos y los productos de panadería (Chemat *et al.*, 2017). Así como para la extracción de alcaloides, carbohidratos, aceites y metabolitos secundarios como los fenoles. El primer reactor diseñado en 1998 por Vinatoru *et al.* (2017) permitió esclarecer el mecanismo de extracción a través de EAU. Ellos también mencionan otros tipos de reactores patentados de varias compañías, aunque todavía no está disponible en el mercado un reactor independiente para ensayos a escala industrial.

La empresa Hielscher Company ha diseñado equipos ultrasónicos con múltiples aplicaciones y que trabajan con una potencia de 500 a 16000 W. Mientras la Reus Company ha diseñado equipos para la extracción de sustancias en los alimentos con una capacidad de 500 a 1000 L (Chemat *et al.*, 2017).

En la industria del coco el ultrasonido se ha implementado para extracción de compuestos inorgánicos y orgánicos. Santos *et al.* (2014) propusieron un método rápido de cuantificación analítica por ICP-OES de minerales en la leche de coco, extraídos con una sonicación durante 10 min; 20 mL de ácido nítrico 1M; y 5 min de centrifugación a 2000 rpm, en comparación con el método de digestión ácida completa. Rodrigues *et al.* (2008) optimizaron mediante un baño ultrasónico la extracción de fenoles del endocarpio (cáscara dura y café del coco), la cual fue tres veces mayor que el método sonicación. La máxima extracción de fenoles totales equivalentes a ácido tánico de 22.44 mg AG/g endocarpio seco, se obtuvo utilizando una solución al 50% (v/v) de etanol: agua, ajustada pH 6.5, relación de sólidos de 50 e intensidad ultrasónica de 4870 W/m<sup>2</sup> durante 15 min.

Juliano y Knoerzer (2016) tras realizar un tratamiento por 10 min de sonicación a 2 MHz sobre mezcla de pulpa de coco y agua, aumentaron los rendimientos de obtención de la leche de coco en comparación a 600 kHz y control sin aplicación de ultrasonido. Posteriormente, en el estudio de Li *et al.* (2018) se utilizó una pulpa de coco enfriada a 5 °C para extraer la crema de coco a través de un método con y sin aplicación ultrasonido, luego, se adicionó agua en una relación pulpa: agua (1:4), se calentó la mezcla de 60 a 70 °C, durante 30 min, y se aplicó un tratamiento megasónico a 2 MHz. La crema de coco fue separada por centrifugación a 4200 revoluciones por minuto. El aceite de coco se cuantificó a través de extracciones con hexano. Se demostró que la refrigeración de la pulpa por 20 h y el calentamiento de la mezcla hasta 70 °C aumentaron el rendimiento de extracción de aceite. El tratamiento megasónico también incrementó el rendimiento al utilizar de la pulpa de coco fresca y almacenada. Se evidenció que el proceso es escalable aplicando una radiación de 2 MHz durante 5 min e incrementó la extractabilidad con respecto al control en un 2.7%.

En aplicaciones de homogenización, Lad y Murthy (2012) prepararon emulsiones aceite en agua (10%) con aceite de girasol, y evaluaron su estabilidad después de 30 min, 7 días y 14 días, en presencia de 0.2 a 2% de las proteínas aisladas de la leche de coco, con o sin aplicación de ultrasonido a la emulsión recién preparada. La radiación se aplicó en un baño ultrasónico y a través sonda ultrasónica, a tres niveles de potencia (120 W, 250 W, 20 kHz), en tres etapas de 4 min (total 12 min), y una pausa de 1 min entre las sucesivas etapas. Con la sonda y a la concentración de proteínas del 1.6% se determinó que el tamaño de partícula después de 14 días no cambió con respecto al medido 30 min después de preparada la emulsión (3.2  $\mu\text{m}$ ). Con la sonda ultrasónica y las proteínas al 1.2% se obtuvo una emulsión estable por catorce días y con un tamaño de partícula más pequeño que usando el baño. La potencia más alta aplicada con la sonda ultrasónica (250 W) redujo el tamaño de gota en mayor magnitud.

## **CAPÍTULO II. METODOLOGÍA**

### **2.1 Hipótesis**

Los rendimientos de obtención de aceite, proteína total y fenoles de la crema de coco se ven mejorados por efecto de los tratamientos microondas y ultrasonido en comparación con el método de extracción acuosa debido al posible incremento de lisis celular, además de modificar las propiedades fisicoquímicas y de interfase de las proteínas extraídas.

### **2.2 Objetivos**

#### **Objetivo general**

Evidenciar el efecto de la extracción acuosa, denominada método control, asistida por ultrasonido o microondas sobre el rendimiento de extracción de aceite, proteína total y fenoles de la crema de coco, así como en las propiedades fisicoquímicas y de interfase de las proteínas extraídas, proponiendo procesos alternativos más eficientes a los convencionales, evaluando además las propiedades funcionales de subproductos.

#### **Objetivos particulares**

1. Valorar el efecto de la extracción acuosa asistida por ultrasonido o microondas sobre el rendimiento de extracción de aceite, a través de su cuantificación en la crema de coco, proponiendo métodos alternativos a los métodos convencionales por prensado.
2. Evaluar el efecto de la extracción acuosa asistida por ultrasonido o microondas sobre el rendimiento de extracción de proteína total, a través de su cuantificación en la crema de coco, como alternativa de extracción simultánea en el proceso de obtención de aceite de coco.

3. Verificar el efecto de la extracción acuosa asistida por ultrasonido o microondas sobre el rendimiento de extracción de fenoles totales, a través de su cuantificación en la crema de coco, resaltando su calidad.
4. Establecer el efecto de la extracción acuosa asistida por ultrasonido o microondas, sobre las propiedades fisicoquímicas y de interfase de las proteínas de coco, a través de la medición del potencial zeta, de la distribución del tamaño de partícula, la presión superficial y la reología dilatacional en interfase para una comprensión de los cambios generados proponiendo alternativas de aplicación para la industria de alimentos.

### **2.3 Materiales**

Para cada extracción experimental se utilizaron dos cocos adquiridos en el mercado local, a los que se les quitó el endocarpio, la testa y se les retiró el agua de forma manual. La pulpa de coco fresca se picó con cuchillo casero y se trozó con un molino de cuchillas giratorio (Pandora plus Moulinex, México). De la pulpa troceada se guardaron 700 g en una bolsa hermética Ziploc, para ser utilizada en el mismo día.

Durante la experimentación se utilizó agua purificada baja en sodio (E pura, Pepsico), los demás reactivos enlistados a continuación fueron grado reactivo: hidróxido de sodio (JT Baker), sulfato de cobre (JT Baker), carbonato de sodio (JT Baker), hexano (Macron), dodecil sulfato de sodio de (Mallinckrodt Chemicals), ácido bórico (Fermont), ácido clorhídrico (Fermont), ácido gálico (Fermont), metanol (Fermont), tartrato de sodio y potasio (Merck), reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel), alcohol absoluto (Meyer) y albúmina sérica bovino (Sigma Aldrich).

## **2.4 Métodos fisicoquímicos**

### **2.4.1 Métodos de extracción de aceite y de proteína total en la crema vía húmeda, asistido por microondas o por ultrasonido**

Para llevar a cabo los procesos de extracción de aceite y proteínas vía húmeda a través de la preparación de una leche de coco, se realizaron adaptaciones a escala de laboratorio de las metodologías reportadas en la obtención de proteínas de la leche de coco (Thaiphanit y Anprung, 2016) y de la crema (Onsaard *et al.*, 2006). La proporción 1:5 de coco: agua se eligió porque se ha reportado un incremento del rendimiento de aceite de coco a mayor efecto de dilución (Seow y Gwee, 1997). Con la misma relación de agua/semilla también se aumentaron las recuperaciones de aceite de maní, girasol y soya (Nakajima y Nabetani, 2000).

Los tiempos de tratamiento de 20 s en EAM y 2 a 3 min en la EAU, se seleccionaron considerando que el sistema de extracción no debía superar una temperatura de 45 °C, primero porque el AVC obtenido por prensado no puede exceder los 50 °C (Dia *et al.*, 2005) y segundo porque la temperatura media de desnaturalización de las diferentes fracciones de las proteínas en solución o purificadas varía entre 88 a 121 °C (Kwon *et al.*, 1996; Tangsuphoom y Coupland, 2009b; Angelia *et al.*, 2010; Rodsamran y Sothornvit, 2017).

El proceso general seguido para la obtención del aceite y la proteína total de coco de la crema se esquematiza en la Figura 2.1 y sus etapas se describen en los siguientes apartados.



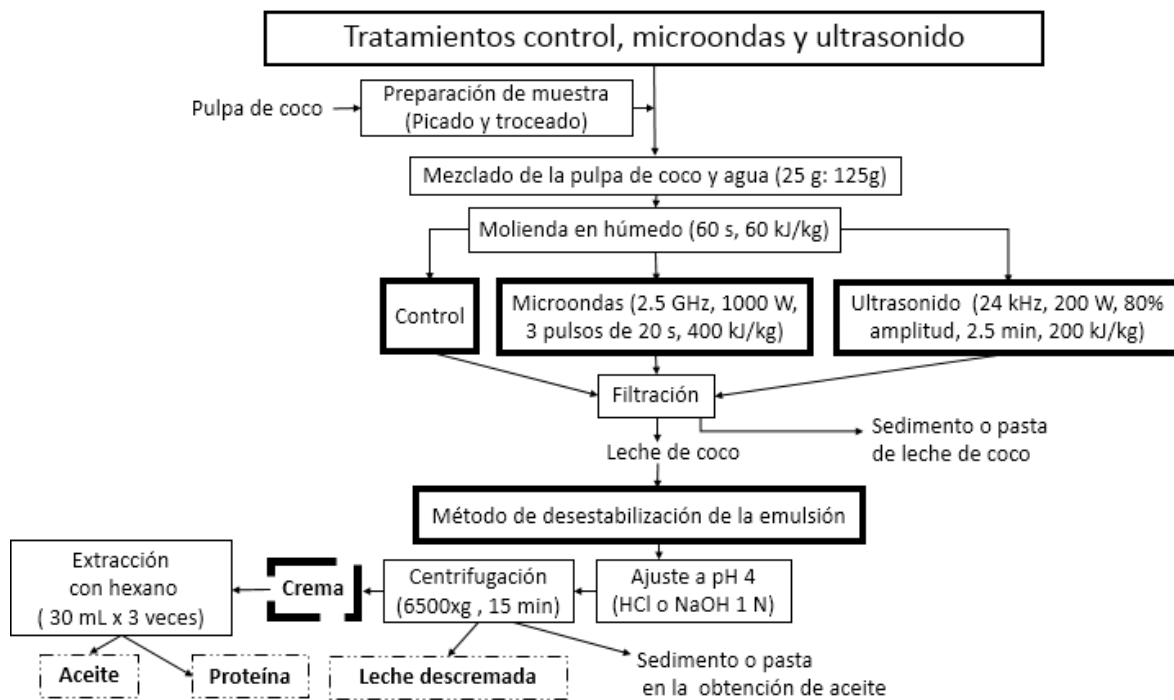


Figura 2.1. Esquema que resume los tratamientos, control, microondas y ultrasonido para la obtención de aceite y proteína total de coco.

#### 2.4.1.1 Obtención de la leche de coco

De la pulpa de coco se obtuvo la leche de coco a través de las siguientes etapas de los tratamientos control, microondas y ultrasonido.

**Control.** A la pulpa de coco fresca, troceada y contenida en un vaso de precipitados se le adicionó agua purificada en una relación 25 g coco: 125 g agua (1:5) y se molió con un homogeneizador de inmersión a 60 Hz, 150 W y durante 15 o 60 s (Taurus, México), equivalente a un consumo de energía específica de 15 o 60 kJ/kg. A la mezcla resultante se le retiró el material sólido (bagazo) a través de un tamiz casero de 1 mm para obtener únicamente la emulsión de leche de coco (125 g).

**Ultrasonido.** A la mezcla coco: agua (150 g) contenida en un vaso de precipitados, previamente molida y obtenida por el método control, se le aplicó la radiación de ultrasonido sumergiendo en la mezcla un sonotrodo (S24d40), controlado automáticamente por un procesador ultrasónico (UP400ST, Hielscher, Alemania),

con una potencia de 200 W, una frecuencia 24 kHz, amplitud al 80% y pulsos por ciclo al 100%, durante 2 a 3 min o hasta una temperatura de 45 °C, equivalentes a un consumo de energía específica promedio de 200 kJ/kg. Después, la mezcla se llevó a temperatura ambiente y se le retiró el material sólido (bagazo) a través de un tamiz casero de 1 mm para obtener únicamente la emulsión de leche de coco (125 g).

Microondas. A la mezcla coco: agua (150 g) contenida en un vaso de precipitados, previamente molida y obtenida por el método control, se le aplicó la radiación microondas utilizando un horno microondas (Daewoo KOR-147 HBS, China), con una potencia de 1000 W mediante 3 pulsos de 20 s cada uno, hasta alcanzar una temperatura de 45 °C, equivalente a un consumo de energía específica de 400 kJ/kg. Seguido se realizó un enfriamiento en baño de hielo hasta una temperatura de 25 °C o durante 3 min. Después, a la mezcla se le retiró el material sólido (bagazo) a través de un tamiz casero de aproximadamente 1 mm para obtener únicamente la emulsión de leche de coco (125 g).

#### **2.4.1.2 Separación de aceite y proteína total de la crema de coco**

De la emulsión de leche de coco obtenida por los diferentes tratamientos se pesaron 30 g en un tubo de centrifuga y se ajustó a pH 4 con HCl 1N utilizando un potenciómetro (Oakton pH 700, Singapur). Se centrifugó a 6,500xg durante 15 min (Hettich Centrifuga Universal 320, Alemania), para separar la crema (parte superior), la leche descremada (fase acuosa), y un precipitado. Después, el tubo se llevó a 4 °C por 20 min para que la crema solidificara, la cual se filtró (toallas de papel), se pesó, se colectó y se transfirió a otro tubo de centrifuga.

Para la obtención de aceite al tubo con la crema se le agregó 30 mL de hexano, se agitó en un Vortex durante 2 min (Barnstead Thermolyne, Maxi Mix I M 16700, Estados Unidos) y se centrifugó a 6,500xg por 30 min (Hettich Centrifuga Universal 320, Alemania). El sobrenadante de disolvente se colectó y se realizaron dos

extracciones adicionales con hexano y se mezclaron. Luego, el disolvente se destiló y el aceite que quedó en el balón fue cuantificado gravimétricamente.

Para la obtención de la proteína total el material sólido que quedó en el tubo de centrifuga se secó a 45 °C por 4 h en un horno de convección y se pesó. La concentración de la proteína total en el precipitado fue cuantificada vía micro Kjeldahl (AOAC. 960.52).

## **2.4.2 Evaluación del efecto del tratamiento control, microondas y ultrasonido sobre el rendimiento de extracción de aceite y proteína total en la crema de coco**

### **2.4.2.1 Caracterización de la pulpa de coco**

La pulpa de coco se analizó siguiendo los método de la AOAC (2012) para la humedad y proteína. La determinación de la humedad se realizó por secado a 105 °C hasta masa constante y utilizando 5 g de muestra (AOAC 925.10). De la pulpa de coco seca se extrajeron los lípidos totales a través de una extracción sólido-líquido por maceración y utilizando cuatro porciones de hexano de 25 mL, posteriormente el disolvente fue recuperado por destilación y el contenido de aceite fue cuantificado gravimétricamente. La proteína total en la pulpa de coco desengrasada se cuantificó siguiendo el método AOAC 960.52 vía micro Kjeldahl (Labconco, Estados Unidos). Las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado y en cinco ocasiones en las cuales se cambió la materia prima.

### **2.4.2.2 Evaluación del método control a dos tiempos de molienda húmeda, midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles**

Se evaluó el tiempo de molienda húmeda por inmersión durante los tiempos 15 y 60 s, teniendo en consideración que en dichos métodos un aumento del tiempo puede mejorar el rendimiento de extracción de aceite, aunque se podrían generar una

emulsión más estable y dificultar su desestabilización para separar el aceite (Rosenthal *et al.*, 1996).

Las pruebas se realizaron inicialmente a través del tratamiento denominado control y las extracciones de la leche se realizaron por triplicado. Para evaluar el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche obtenida se midió el pH (potenciómetro), aceite, proteínas solubles, humedad, distribución de tamaño de partícula y se calculó el índice de polidispersidad. Las determinaciones se realizaron según el apartado 2.4.2.7.

#### **2.4.2.3 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas a dos tiempos de molienda húmeda, midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles de la leche de coco**

El efecto de los tiempos de molienda húmeda de 15 y 60 s más la aplicación de los tratamientos ultrasonido y microondas, se evaluó sobre el pH, la humedad, el aceite, el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad. El seguimiento se llevó a cabo por triplicado con cada tratamiento y las determinaciones analíticas se realizaron según el apartado 2.4.2.7.

#### **2.4.2.4 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas con cambio de materia prima en el tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles de la leche de coco**

Con la finalidad de cuantificar la variabilidad en la materia prima y confirmar los resultados obtenidos con la molienda húmeda a 60 s, se realizó la experimentación en cinco ocasiones con diferente pulpa de coco, manteniendo una muestra control sin tratamiento por microondas o por ultrasonido. Cada vez que la muestra cambió se aplicaron los diferentes tratamientos y se realizó por triplicado. Las determinaciones analíticas para cada extracción se realizaron según el apartado 2.4.2.7.

#### **2.4.2.5 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas sobre la pureza y composición de la proteína total recuperada de la crema de coco**

A la proteína total aislada por cada tratamiento como se indicó en el apartado 2.4.1.2, se les determinó su contenido de humedad con una termobalanza digital a 50 °C (OHAUS MB45, Suiza). La determinación de la pureza por micro Kjeldahl (AOAC. 960.52) y las cenizas por calcinación pesando 1 g de muestra (AOAC 923.03). El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia.

#### **2.4.2.6 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido en el rendimiento de extracción de aceite y proteína total obtenidos de la crema de coco**

La proteína total y el aceite obtenidos de la crema de coco a través de los procedimientos descritos en el apartado 2.4.1.2, fueron extraídos por triplicado y en tres días diferentes en los cuales cambió la materia prima. En el primer día se aplicaron los tratamientos control-microondas-ultrasonido (C1, M1, U1), en el segundo día los tratamientos control-microondas (C2 y M2) y en el último día los tratamientos control-ultrasonido (C3 y U3). El rendimiento de extracción se calculó con base en el aceite y la proteína total presente en la pulpa de coco.

Rendimiento de aceite y de proteína total extraídos de la crema con respecto al aceite y la proteína total de coco:

$$RA (\%) = \frac{\text{Aceite extraído (g)}}{\text{Masa de crema (g)}} \times \frac{\text{Masa de crema (g)}}{\text{Masa de leche (g)}} \times \frac{\text{Masa de leche (g)} \times (100)}{\text{Masa de aceite en pulpa (g)}}$$
$$RP(\%) = \frac{\text{Proteína extraída (g)}}{\text{Masa de crema (g)}} \times \frac{\text{Masa de crema (g)}}{\text{Masa de leche (g)}} \times \frac{\text{Masa de leche (g)} \times (100)}{\text{Masa de proteína en pulpa(g)}}$$

## **2.4.2.7 Determinaciones analíticas**

### **2.4.2.7.1 Determinación del contenido de humedad en la leche de coco**

El contenido de humedad fue determinado siguiendo el procedimiento descrito por la AOAC (2012). Se pesaron 5 g de leche de coco y se secaron en una estufa de temperatura controlada a 105 °C (Felisa, México) durante 3 h. Luego, se colocaron en un desecador durante 30 min o cuando llegó a temperatura ambiente y se pesaron. El procedimiento de calentamiento, enfriamiento y pesado se realizó una vez adicional o hasta cuando se alcanzó masa constante.

### **2.4.2.7.2 Determinación del contenido de aceite en la leche de coco**

Para la cuantificación de los lípidos se realizó una extracción líquido-líquido. De la leche se pesaron 30 g en un tubo de centrifuga y se llevó a pH 4 con HCl 1N, se adicionaron 30 mL de hexano y se dejó en refrigeración y en reposo durante la noche. Al día siguiente el tubo se agitó durante 2 min con un Vortex y se centrifugó a 6,500xg por 5 min. El sobrenadante de disolvente se separó con pipeta y se colectó. Luego, se realizaron dos extracciones adicionales. Todos los extractos se mezclaron y el disolvente se recuperó por destilación, el aceite que quedó en el matraz fondo plano se cuantificó gravimétricamente.

### **2.4.2.7.3 Determinación del contenido de proteínas solubles en la leche de coco**

Las proteínas solubles en la leche de coco fueron analizadas por colorimetría siguiendo el método de Lowry. Para ello, de una solución madre de 200 ppm (mg /L) de albúmina sérica bovina se colocaron de 0.1 a 0.5 mL en un tubo de vidrio y se adicionaron a cada uno 5 mL del reactivo C (preparado a partir de una mezcla de las soluciones  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% y NaOH 0.1 M;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%;  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 2%, en la proporción 50:0.5:0.5). Luego, la mezcla en el tubo se dejó en reposo en la oscuridad durante 15 min. Transcurrido el tiempo se

adicionaron 0.5 mL del reactivo de Folin diluido (1/4) a cada tubo y se llevó a volumen con agua para obtener una curva patrón de 3.5 a 17.5 mg/L. Finalmente, la mezcla se dejó en reposo en la oscuridad durante 30 min para el generar el color. Las lecturas colorimétricas se realizaron a 560 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific UV-Visible Evolution 60S, Estados Unidos). De la muestra problema de leche de coco se utilizó 0.1 mL y su concentración fue comparada con la curva patrón de albúmina sérica bovina.

#### **2.4.2.7.3 Determinación de la distribución del tamaño de partícula en la leche de coco**

La distribución del tamaño de partícula y el diámetro medio volumétrico ( $D_{[4,3]}$ ) en la leche de coco fueron medidos utilizando un granulómetro (Cilas 930, Francia), a partir del principio de la difracción de la luz o de un rayo láser a una longitud de 830 nm (teoría Fraunhofer) y un intervalo de medición de 0.2 a 500  $\mu\text{m}$ . El control automático del instrumento y los cálculos se realizaron con el software Size Expert V9.08.

Se siguió el método de medición en húmedo, adicionando 1 mL de la leche de coco en el recipiente con agua del instrumento, el cual se agitó automáticamente y presentó un nivel de obscuración de la luz entre 8 y 15%. Con el fin de provocar disgregación de partículas o flóculos, en el instrumento se puede aplicar ultrasonido a 55 kHz durante la medición (aproximadamente 15 s), por lo que la prueba se realizó con la aplicación de ultrasonido durante la medida.

El diámetro determinado corresponde al 10, 50 y 90% de frecuencia acumulada,  $D_{[0.1]}$ ,  $D_{[0.5]}$ ,  $D_{[0.9]}$ , respectivamente. Se calculó el índice de polidispersión (IP) de acuerdo con la siguiente ecuación (ASTM E799-03, 2015):

$$IP = \frac{D_{[0.9]} - D_{[0.1]}}{D_{[0.5]}}$$

### **2.4.3 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el contenido de fenoles en la crema y leche descremada de coco**

Se realizó un solo experimento de obtención de la crema y leche descremada para la cuantificación el contenido de fenoles totales equivalentes a ácido gálico (EAG). La preparación se llevó a cabo por triplicado con los tratamientos control, microondas y ultrasonido y el contenido de fenoles totales se determinó en cada material. Adicionalmente, se determinaron por triplicado los fenoles totales en la pulpa de coco para evaluar el rendimiento de extracción.

#### **2.4.3.1 Extracción de los compuestos fenólicos de la pulpa, en la crema y leche descremada de coco**

Para extraer los fenoles totales de la pulpa se adaptó el procedimiento propuesto para la extracción de fenoles de la cáscara café o el endocarpio duro (Rodrigues *et al.*, 2008). A 1.6 g de pulpa se adicionaron 5 mL del disolvente metanol: agua (50:50), ajustado a pH 6.9 con HCl o NaOH 0.01 N. Posteriormente, la mezcla se colocó en un baño de agua ultrasónico a 40 kHz durante 15 min y potencia del equipo de 300 W (Ultrasonic cleaner, SB5200DTS, China). Luego, se guardó para la determinación colorimétrica.

Para extraer los fenoles en la crema de coco se adaptó procedimiento de extracción de fenoles de aceite de oliva y fenoles de proteína de coco, propuestos por el Consejo Oleico Internacional (2009) y Naik *et al.* (2012). La crema de coco se secó a 40 °C durante 4 h y los fenoles se extrajeron con 5 mL de metanol al 80% y en un baño ultrasónico a 40 kHz, 300 W y por 20 min, luego, se centrifugó por 25 min a 2,700xg, el sobrenadante traslucido obtenido se retiró y se llevó hasta 5 g con metanol para su posterior cuantificación colorimétrica.

En la extracción de los fenoles en la leche descremada de coco se desarrolló un método de cuantificación en la leche descremada (LD). Para ello, se pesaron 14 g de LD que se liofilizaron, al material seco se le adicionaron 2.5 g de una mezcla de



metanol: agua (80:20), y se agitó durante 2 min para extraer los fenoles. Luego, se guardó para el análisis colorimétrico.

#### 2.4.3.2 Cuantificación de los compuestos fenólicos extraídos de la pulpa, en crema y leche descremada de coco

Para las cuantificaciones colorimétricas, una alícuota del extracto metanólico obtenido de la pulpa de coco (0.1 mL), de la crema (0.2 mL) y de la leche descremada (0.1 mL), se mezcló con 1 mL del reactivo de Folin (previamente diluido diez veces con agua desionizada), y con 0.8 mL de una solución de carbonato de sodio al 20% (Marina *et al.*, 2009b). Después, la mezcla se llevó a 2.5 g con agua destilada y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 min. Las mediciones se realizaron a 725 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. La curva estándar de fenoles totales se construyó con ácido gálico equivalente (0.8 - 6.4 mg/kg).

El rendimiento de contenido de fenoles totales y equivalentes a ácido gálico (EAG), extraídos en la crema y la leche descremada (LD) con respecto a los fenoles totales equivalentes en la pulpa de coco se calcularon a partir de las ecuaciones:

$$R \text{ EAG en crema (\%)} = \frac{\text{EAG extraídos (g)}}{\text{Masa de crema (g)}} \times \frac{\text{Masa de crema (g)}}{\text{Masa de leche (g)}} \times \frac{\text{Masa de leche (g)} \times (100)}{\text{Masa de EAG en pulpa (g)}}$$

$$R \text{ EAG en LD (\%)} = \frac{\text{EAG extraídos (g)}}{\text{Masa de LD (g)}} \times \frac{\text{Masa de LD (g)}}{\text{Masa de leche (g)}} \times \frac{\text{Masa de leche (g)} \times (100)}{\text{Masa de EAG en pulpa (g)}}$$

El rendimiento del contenido de fenoles totales y equivalentes a ácido gálico (EAG), presentes en la crema y la leche descremada (LD) y con respecto a la leche de coco desestabilizada se calculó a partir de las ecuaciones:

$$\text{mg EAG en crema /100 g leche (\%)} = \frac{\text{EAG extraídos (mg)}}{\text{Masa de crema (g)}} \times \frac{\text{Masa de crema (g)} \times (100\text{g})}{\text{Masa de leche (g)}}$$

$$\text{mg EAG en LD /100 g leche (\%)} = \frac{\text{EAG extraídos (mg)}}{\text{Masa de LD (g)}} \times \frac{\text{Masa de LD (g)} \times (100\text{g})}{\text{Masa de leche (g)}}$$

#### **2.4.4 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el tamaño de partícula, potencial zeta, tensión superficial y reología dilatacional de la fracción de proteínas obtenida**

La fracción de proteínas aislada por cada tratamiento descrito en el apartado 2.4.1.2, fue dispersada en agua y se determinó a la dispersión obtenida el tamaño de partícula, índice de polidispersidad, tensión superficial y reología dilatacional.

En la preparación de la dispersión se realizaron modificaciones al procedimiento propuesto por Thaiphanit *et al.* (2016) con respecto a la dilución. Para ello, a la fracción de proteínas extraída se le adicionó agua desionizada (0.1 g/100 mL), se dispersó a 9500 revoluciones durante 2 min (Ultra-Turrax T25, Alemania), se dejó en reposo y en refrigeración toda la noche para que se hidratara completamente. Al día siguiente se dispersó nuevamente aplicando el mismo proceso en el Ultra-Turrax.

##### **2.4.4.1 Determinación del tamaño de partícula**

El tamaño de partícula de las dispersiones se midió en un instrumento comercial de dispersión dinámica de luz (Rayleigh y Mie), con una longitud de onda de 532 nm (Zetasizer Nano Series Nano-ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), e intervalo de diámetro de partícula de 2 nm a 3  $\mu$ m. Para evitar los efectos de dispersión múltiple se realizaron ciertas modificaciones al procedimiento propuesto por Thaiphanit *et al.* (2016). Para ello, a una celda del equipo (DTS0012), se adicionaron 0.15 mL de la muestra de proteína dispersa, 15  $\mu$ L de la solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 1.5 mL de agua desionizada. La dispersión se agitó suavemente durante 60 s (Cubeta DTS0012), y luego se equilibró a 25 °C en el instrumento durante 60 s antes de la medición. El instrumento reportó el diámetro medio de partícula y un índice de polidispersidad (IP) que varía de 0 (monodispersa) a 1 (distribución muy amplia).

#### **2.4.4.2 Determinación del potencial zeta**

El equipo Zetasizer Nano se utilizó para determinar la carga eléctrica (potencial zeta en mV), de las partículas con un tamaño entre 3 nm a 10  $\mu\text{m}$  en la dispersión de proteínas y a través de su movilidad electroforética. Para evitar los efectos de dispersión múltiple se realizaron ciertas modificaciones al procedimiento propuesto por Thaiphanit *et al.* (2016). Para ello, las dispersiones de la fracción de proteínas se diluyeron en una relación 1:60 (V/V) con agua en la celda capilar del equipo y se equilibraron a 25 °C en el instrumento durante 60 s antes de la medición.

#### **2.4.4.3 Determinación de la tensión superficial dinámica en la interfase**

La tensión superficial aire-agua en las dispersiones se determinó mediante el análisis de una gota pendiente en un tensiómetro PAT-1 (Sinterface Technologies, Alemania). Para ello, se formó una gota de la dispersión de las proteínas y se mantuvo pendiente en el extremo de un capilar dentro de una celda de cuarzo transparente. Las imágenes digitales de la gota se registran y se ajustan a la ecuación de Young-Laplace. El volumen de la gota de 12  $\mu\text{L}$  se mantuvo constante para monitorear la tensión en la interfase y estudiar el mecanismo de adsorción en función del tiempo. Las densidades de las dispersiones se determinaron con un medidor de densidad digital DMA 50 (Anton Paar, Austria).

#### **2.4.4.4 Propiedades reológicas dilatacionales**

Después de dejar que la dispersión de las proteínas equilibrara durante 2 a 3 h, los experimentos de reología de interfase se realizaron en el mismo tensiómetro PAT-1 y con algunas modificaciones al procedimiento propuesto por Fuentes-Prado y Martínez-Padilla (2014). Con la jeringa controlada automáticamente se deformó la gota de la dispersión a través de ciclos sinusoidales de compresión y expansión, lo que generó una respuesta sinusoidal en la tensión de interfase. Una vez transcurrido dicho tiempo se realizaron barridos de deformación para definir el intervalo lineal de cada película adsorbida en la interfase líquido-aire. El intervalo de variación de los

barridos de deformación de volumen fue de 0.6 a 8.8% a una frecuencia constante de 0.1 Hz. Una vez elegida la magnitud de la deformación a aplicar a cada película se realizaron barridos de frecuencia entre 0.01 a 0.1 Hz.

## **2.5 Análisis estadístico**

Los datos resultantes fueron analizados utilizando análisis de una vía de la varianza (ANOVA) y la prueba de intervalo múltiple de Tukey para comparar las medias, considerando diferencias significativas cuando  $p < 0.05$ . Todas las pruebas se realizaron con el software Minitab versión 17.

## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Evaluación del efecto del tratamiento control microondas y ultrasonido sobre el rendimiento de extracción de aceite y de proteína total en la crema de coco

#### 3.1.1 Caracterización de la materia prima

La pulpa de coco se obtuvo de frutos sin controlar su estado de madurez, dependiendo de la disponibilidad en el mercado local. En el Cuadro 3.1 se presenta el contenido de humedad, aceite (lípidos) y proteína total de la pulpa de coco adquirida en diferentes ocasiones.

Cuadro 3.1. Valores promedio de humedad, aceite y proteína total de pulpa de coco, en muestras adquiridas en días diferentes.

Día	Humedad (%)	Aceite base seca (%)	Proteína base seca (%)	Observaciones
1	42.80 <sup>a</sup> ± 0.25	63.45 <sup>a</sup> ± 2.41	12.02 <sup>b</sup> ± 0.85	Textura dura
2	44.39 <sup>b</sup> ± 0.19	59.42 <sup>a</sup> ± 2.93	15.29 <sup>a</sup> ± 1.19	Textura dura
3	51.12 <sup>c</sup> ± 0.08	60.88 <sup>a</sup> ± 0.89	12.60 <sup>b</sup> ± 0.26	Textura dura
4	48.52 <sup>d</sup> ± 0.21	61.66 <sup>a</sup> ± 1.04	13.56 <sup>ab</sup> ± 0.89	Textura dura
5	62.78 <sup>e</sup> ± 0.27	65.68 <sup>a</sup> ± 1.07	6.71 <sup>c</sup> ± 0.24	Textura blanda

± Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias.

La textura blanda observada y la humedad determinada en la pulpa de coco en el día 5 (62.78%), al igual que la textura dura y la humedad de los demás días (42.80 a 51.12%), son comparables a la descripción y a los valores reportados por Bawalan y Chapman (2006) para frutos inmaduros o con diez meses de edad, donde reportaron una humedad del 58.5%, o en frutos maduros de once a doce meses de edad, cuyo contenido de humedad es menor (43.3 a 46.4%), respectivamente. En este estudio, la humedad permitió diferenciar el grado de madurez del fruto que ingresó al proceso, predominando los frutos maduros.

Independientemente del fruto, el contenido de aceite en base seca de la pulpa no presentó una diferencia estadísticamente significativa, aunque los valores oscilaron entre 59.42 y 65.68%. El que no se hayan encontrado diferencias significativas pudo ser debido a la desviación estándar en las muestras, lo que propició coeficientes de variación relativamente grande pero menores al 5%. Sin embargo, estos resultados no se pueden generalizar, ya que al menos una muestra presentó un estado de madurez diferente, y los frutos inmaduros parecen tener un porcentaje de aceite mayor.

Al comparar con los resultados de Patil *et al.* (2017), se observó una tendencia contraria y diferencias significativas en el contenido de aceite (base húmeda) en frutos con diferente grado de madurez, los cuales fueron confirmados con los valores calculados expresados en base seca (Cuadro 1.3), donde el contenido de aceite fue inferior en los cocos inmaduros o cosechados después de 10 meses (40.36%) y mayor en los frutos maduros después de 11 a 12 meses de la polinización (53.63%).

La proteína total fue significativamente superior en el fruto con una textura dura (12.0 a 15.29%), que con una blanda (6.71%). Los resultados de proteína total expresados base seca y calculados a partir de Patil *et al.* (2017) no fueron diferentes entre los frutos inmaduros o maduros (Cuadro 1.3).

El desarrollo celular de semillas en el tiempo generalmente se divide en tres fases: la fase inicial o periodo de división celular caracterizada por un rápido incremento de agua y pequeña acumulación de masa seca, la fase de un rápido almacenamiento de materia seca y en donde los productos se condensan en organelos, y una tercera fase de maduración asociada con un máximo de materia seca y tolerancia de desecación (Bewley y Black, 1985). Además, en las oleaginosas como lo es el coco, los carbohidratos constituyen la pared celular, las sustancias de reserva proteínicas se almacenan como cuerpos proteínicos y el

espacio entre las proteínas está conformado por cuerpos lipídicos y por la red citoplasmática (Rosenthal *et al.*, 1996).

Considerando lo mencionado, los frutos procesados en el día 5 y posiblemente asociados a una menor madurez (10-11 meses) tuvieron el más bajo contenido de materia seca (más humedad) y probablemente no alcanzaron el máximo de almacenamiento de los organelos. La pulpa de coco procesada en los días 1 a 4 con una posible mayor madurez (11-12 meses) presentó la más alta materia seca (menor humedad). López-Villalobos *et al.* (2001) evidenciaron que los lípidos y la materia seca presentaron una acumulación en el endospermo cuando incrementó la madurez del fruto, de no más de tres meses de germinación.

En la presente investigación a partir de la correlación de Pearson se determinó que el aumento materia seca se relaciona significativamente con la acumulación de proteínas (0.85,  $p < 0.05$ ) y el aceite (0.93  $p < 0.05$ ). Por otro lado, aunque se haya determinado una correlación positiva y significativa entre las proteínas con el aceite (0.76,  $p < 0.05$ ), posiblemente su síntesis no depende entre sí, puesto que en algunas oleaginosas como la soya la acumulación de estas sustancias siguen mecanismos independientes (Jiang *et al.*, 2010).

### **3.1.2 Evaluación del método control a dos tiempos de molienda húmeda midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, aceite y proteínas solubles**

En la Figura 3.1 se presentan las gráficas representativas de la distribución del tamaño de partícula en la leche de coco, correspondientes a cada tiempo de molienda aplicado. Se observa una distribución no gaussiana amplia cuando se aplicaron 15 s (modas de 3 y 11  $\mu\text{m}$ , aproximadamente) y 60 s (moda 4  $\mu\text{m}$ ).

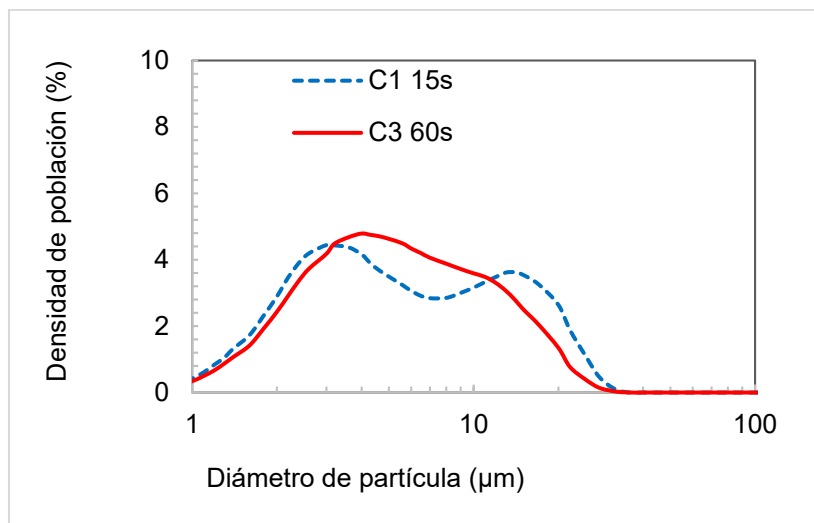


Figura 3.1. Distribución del tamaño de partícula de la leche de coco obtenida con 15 y 60 s de molienda húmeda.

Considerando que no se observó una distribución monomodal estrecha y con la finalidad de realizar comparaciones globales (Cuadro 3.2), se reporta únicamente el diámetro medio y el índice de polidispersidad de todas las determinaciones. Los tiempos de molienda evaluados en el método control no presentaron una influencia significativa en el tamaño de partícula, ni en el índice de polidispersión.

Cuadro 3.2. Diámetro de partícula medio e índice de polidispersidad de la leche de coco extraída por diferentes tratamientos.

Tratamiento	Tiempo (s)	Diámetro medio (µm)	Índice de polidispersión
Control	15	6.30 <sup>a</sup> ± 0.80	2.58 <sup>a</sup> ± 0.35
Control	60	6.60 <sup>a</sup> ± 0.06	2.60 <sup>a</sup> ± 0.28

± Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias.

En el Cuadro 3.3 se reportan los valores medios y la desviación estándar de las determinaciones de pH, humedad, aceite y proteínas solubles de la leche de coco obtenida por triplicado a través del tratamiento control. Se evidenció un incremento estadísticamente significativo en la concentración de aceite en función del tiempo de molienda y no se observó un cambio en el pH, la humedad y en las proteínas



solubles. El pH estuvo por arriba del punto isoeléctrico de las proteínas (pH 4) en el cual se pudo favorecer su solubilización.

Cuadro 3.3. pH y humedad en la leche de coco, contenido de aceite y proteínas solubles de la leche de coco obtenida con el tratamiento control a dos tiempos de molienda húmeda.

Tratamiento	Tiempo (s)	pH	Humedad (%)	Aceite base seca (%)	Proteína base seca (%)
Control	15	6.29 <sup>a</sup> ± 0.01	95.86 <sup>a</sup> ± 0.05	47.68 <sup>a</sup> ± 4.85	2.50 <sup>a</sup> ± 0.37
Control	60	6.32 <sup>a</sup> ± 0.03	92.80 <sup>b</sup> ± 0.36	62.03 <sup>b</sup> ± 1.41	2.13 <sup>a</sup> ± 0.10

± Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias.

Al considerar la masa de leche extraída por cada 150 g de muestra, para calcular los rendimientos de aceite y proteínas solubles (Cuadro 3.4), el mayor tiempo de molienda húmeda generó un incremento estadísticamente significativo en el rendimiento de las proteínas solubles y del aceite, aunque la concentración de las proteínas solubles expresada en base seca en la leche no fue estadísticamente diferente en los dos tiempos estudiados (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.4. Masa de leche de coco obtenida con el tratamiento control, pH y rendimiento de extracción de aceite y proteínas solubles.

Tratamiento	Tiempo (s)	pH	Masa de leche (g/150 g muestra)	Rendimiento de aceite (%)	Rendimiento de proteína (%)
Control	15	6.29 <sup>a</sup> ± 0.01	121.05 <sup>a</sup> ± 1.74	28.89 <sup>a</sup> ± 2.56	5.52 <sup>a</sup> ± 0.88
Control	60	6.32 <sup>a</sup> ± 0.03	125.77 <sup>b</sup> ± 0.59	68.04 <sup>b</sup> ± 4.38	8.49 <sup>b</sup> ± 0.62

± Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias.

En comparación con otros estudios, Agarwal y Bosco (2013) utilizando un método húmedo determinaron la máxima extracción de AVC con un tiempo de 3 min e independiente de la proporción de coco y agua (1:1 1:2, 1:3 y 1:4) a un pH de 6.5. Un exceso de molienda generó glóbulos más pequeños e hizo más difícil la desemulsificación. Edem y Elijah (2016) determinaron en la leche de coco un aumento de los sólidos solubles al incrementar el tiempo de extracción 10 a 20 min.

Yoon *et al.* (1991) en soya evidenciaron la máxima extracción de AVC en una relación pulpa: agua 1:6, aunque el porcentaje de proteína no se vio afectado. En todos los casos la dilución y el aumento del tiempo incrementaron probablemente la ruptura de las células y facilitó la extracción de las sustancias intracelulares de interés.

### 3.1.3 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas a dos tiempos de molienda húmeda, midiendo la distribución del tamaño de partícula, el pH, humedad, proteínas solubles y aceite de la leche de coco

En la Figura 3.2a se presentan las gráficas representativas de la distribución del tamaño de partícula de la leche de coco obtenida con 15 y 60 s de molienda húmeda a través del método denominado control (C) y el asistido por microondas (M). Se observa una distribución de tamaño de partícula con modas alrededor de 3.6 y 11  $\mu\text{m}$ , no bien definidas, similar para los dos tiempos de molienda e independiente del tratamiento. Por lo cual, en el Cuadro 3.5 se reportó el diámetro medio sin evidenciarse diferencias significativas entre tratamientos.

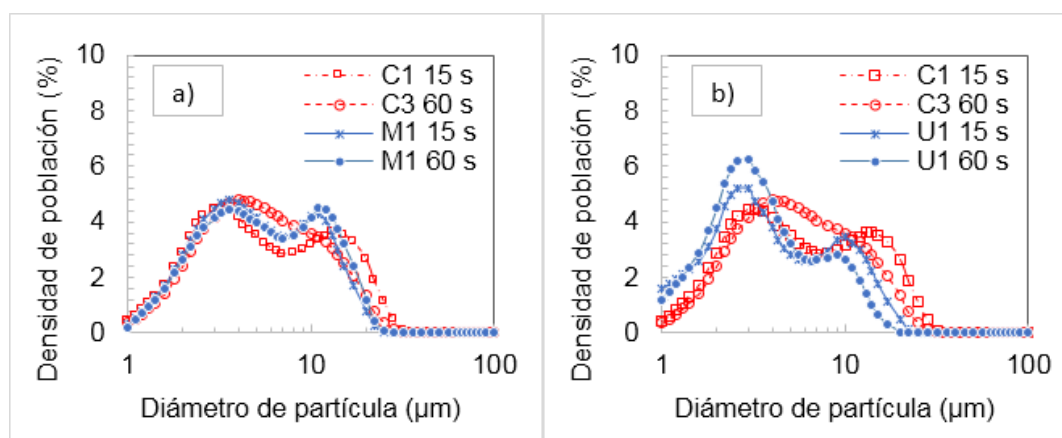


Figura 3.2. Distribución del tamaño de partícula de la leche de coco obtenida con 15 y 60 s de molienda húmeda y tratamiento asistido por microondas (a), o tratamiento asistido por ultrasonido (b).

En la Figura 3.2b se presentan las gráficas representativas de la distribución del tamaño de partícula de la leche de coco obtenida con 15 y 60 s de molienda húmeda

a través del método control (C) y el asistido por ultrasonido (U). Se observa una distribución no gaussiana con dos modas alrededor de 3.0 y 11  $\mu\text{m}$ .

Cuadro 3.5. Diámetro medio e índice de polidispersidad, de la leche de coco extraída por los tratamientos control, microondas y ultrasonido.

Tratamiento	Tiempo (s)	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Índice de polidispersión
Control	15	6.30 <sup>a</sup> $\pm$ 0.80	2.58 <sup>a</sup> $\pm$ 0.35
Microondas	15	6.25 <sup>a</sup> $\pm$ 0.19	1.74 <sup>b</sup> $\pm$ 0.06
Ultrasonido	15	4.80 <sup>b</sup> $\pm$ 0.40	2.76 <sup>a</sup> $\pm$ 0.42
Control	60	6.60 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06	2.60 <sup>a</sup> $\pm$ 0.28
Microondas	60	6.28 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06	2.28 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.14
Ultrasonido	60	4.25 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17	2.72 <sup>a</sup> $\pm$ 0.14

$\pm$  Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias.

En el método asistido por ultrasonido, la mayor densidad de población de las partículas en un tamaño a 3  $\mu\text{m}$  generó que el diámetro medio se desplazara a valores menores (Cuadro 3.5). Lo cual corresponde a una disminución significativa en el menor tiempo de 1.50  $\mu\text{m}$  (24%) y en el mayor tiempo de 2.35  $\mu\text{m}$  (36%), manteniéndose un índice de polidispersión aproximadamente constante (2.7).

Por otro lado, en el Cuadro 3.6 se reportan los valores medios y la desviación estándar de las determinaciones de pH, humedad, aceite y proteínas solubles de la leche de coco obtenida por triplicado a través de los tratamientos, control, microondas y ultrasonido, considerando los resultados dependientes e independientes al tratamiento, y a un mismo tiempo. Así como el coeficiente de variación calculado con todos los datos a 15 y 60 s.

El pH fue constante e independiente del tiempo de molienda o al efecto de la extracción asistida por microondas o ultrasonido. En los tratamientos asistidos se evidenció un incremento de aceite, pero a un tiempo de 60 s el incremento no fue significativo. La extracción asistida por microondas o ultrasonido no generaron cambios significativos en la concentración de proteínas solubles con respecto a sus controles. No obstante, al comparar los valores medios sólo por efecto de tiempo, a

60 s se disminuyó la variabilidad analítica medida a través del coeficiente de variación para las sustancias de interés.

Cuadro 3.6. Humedad, pH, contenido de aceite y proteínas solubles en la leche de coco obtenida con los tratamientos control (C), microondas (M) y ultrasonido (U) a dos tiempos de molienda.

Tratamiento	Tiempo (s)	pH	Humedad (%)	Aceite base seca (%)	Proteína base seca (%)
C	15	6.29 <sup>a</sup> ± 0.01	95.86 <sup>a</sup> ± 0.05	47.68 <sup>c</sup> ± 4.85	2.50 <sup>bc</sup> ± 0.37
M	15	6.32 <sup>a</sup> ± 0.03	94.76 <sup>a</sup> ± 1.46	70.81 <sup>ab</sup> ± 6.91	1.76 <sup>bc</sup> ± 0.13
U	15	6.30 <sup>a</sup> ± 0.02	95.43 <sup>ab</sup> ± 0.08	85.48 <sup>a</sup> ± 14.71	1.73 <sup>c</sup> ± 0.15
C	60	6.32 <sup>a</sup> ± 0.03	92.80 <sup>ab</sup> ± 0.36	62.03 <sup>bc</sup> ± 1.41	2.13 <sup>a</sup> ± 0.10
M	60	6.30 <sup>a</sup> ± 0.01	92.75 <sup>c</sup> ± 0.48	71.47 <sup>ab</sup> ± 5.69	1.70 <sup>ab</sup> ± 0.07
U	60	6.27 <sup>a</sup> ± 0.05	92.95 <sup>c</sup> ± 0.53	63.39 <sup>bc</sup> ± 5.30	2.26 <sup>a</sup> ± 0.04
T	Tiempo (s)	pH	Humedad (%)	Aceite base seca (%)	Proteína base seca (%)
C, M, U	15	6.30 <sup>A</sup> ± 0.02	95.35 <sup>A</sup> ± 0.87	67.99 <sup>A</sup> ± 18.55	2.00 <sup>A</sup> ± 0.44
C, M, U	60	6.30 <sup>A</sup> ± 0.06	92.83 <sup>B</sup> ± 0.40	65.63 <sup>A</sup> ± 5.93	2.03 <sup>A</sup> ± 0.26
Tratamiento	Tiempo (s)	Coeficiente de variación (%) *			
C, M, U	15	0.3	0.9	27.3	22.0
C, M, U	60	1.0	0.4	9.0	12.8

±Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra, o en los tratamientos agrupados y con la misma letra, indica que no hay diferencia significativa entre medias.

\*Coeficiente de variación independiente del tratamiento y a un mismo tiempo de molienda.

Cuando se consideró la masa de la leche extraída en cada tratamiento y se calcularon los rendimientos de aceite y de las proteínas solubles en la leche con respecto al aceite y la proteína total de coco de la materia prima inicial (Cuadro 3.7), se evidenció que un mayor tiempo de molienda húmeda generó un incremento estadísticamente significativo en la extracción de las proteínas solubles (8.12%) y del aceite (72.38%), en comparación a las proteínas (4.91%) y el aceite (47.43%) en un menor tiempo.

También se disminuyó la variación analítica en términos del coeficiente de variación. En consecuencia, el tiempo de molienda húmeda por inmersión durante 60 s se eligió para los posteriores lotes en el cambio la materia prima. Los siguientes

resultados se reportarán sólo en términos del rendimiento de extracción, puesto que para su cálculo se incluye el rendimiento de masa de leche extraída.

Cuadro 3.7. Masa de leche de coco obtenida y rendimiento de extracción de aceite y proteínas solubles obtenidos con los tratamientos control (C), microondas (M) y ultrasonido (U) a dos tiempos de molienda

T	Tiempo (s)	Masa de leche (g/150 g muestra)	Rendimiento de aceite (%)	Rendimiento de proteína (%)
C1	15	121.05 <sup>d</sup> ± 1.74	28.89 <sup>c</sup> ± 2.56	5.52 <sup>bc</sup> ± 0.88
M1	15	122.85 <sup>d</sup> ± 0.46	55.16 <sup>b</sup> ± 5.21	4.94 <sup>bc</sup> ± 1.28
U1	15	123.05 <sup>cd</sup> ± 0.15	58.25 <sup>b</sup> ± 10.96	4.26 <sup>c</sup> ± 0.35
C2	60	125.77 <sup>bc</sup> ± 0.59	68.04 <sup>ab</sup> ± 4.38	8.49 <sup>a</sup> ± 0.62
M2	60	129.36 <sup>a</sup> ± 1.52	80.94 <sup>a</sup> ± 3.21	7.03 <sup>ab</sup> ± 0.77
U2	60	126.34 <sup>a</sup> ± 0.61	68.16 <sup>ab</sup> ± 4.57	8.84 <sup>a</sup> ± 0.49
T	Tiempo (s)	Masa de leche (g/150 g muestra)	Rendimiento de aceite (%)	Rendimiento de proteína (%)
C1, M1, U1	15	122.31 <sup>D</sup> ± 1.31	47.43 <sup>A</sup> ± 15.29	4.91 <sup>A</sup> ± 0.96
C1, M1, U1	60	127.16 <sup>E</sup> ± 1.88	72.38 <sup>B</sup> ± 7.34	8.12 <sup>B</sup> ± 1.00
T	Tiempo (s)	Coeficiente de variación (%)		
C1, M1, U1	15	1.1	32.2	19.6
C1, M1, U1	60	1.5	10.1	12.3

±Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra, o en los tratamientos agrupados y con la misma letra, indica que no hay diferencia significativa entre medias.

\*Coeficiente de variación independiente del tratamiento y a un mismo tiempo de molienda.

### 3.1.4 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas con cambio de materia prima en el tamaño de partícula, el pH, humedad, aceites y proteínas solubles de la leche de coco

Con la finalidad de considerar la variabilidad de la materia prima se replicaron los tratamientos asistidos por microondas y ultrasonido. En el Cuadro 3.8 se reporta el diámetro medio y el índice de polidispersión de todas las determinaciones efectuadas por cada tratamiento, así como el coeficiente de variación para los experimentos realizados en diferentes días con cambio de materia prima. Al igual

que lo reportado en el apartado 3.1.3 la radiación por microondas no presentó una tendencia sobre el diámetro de partícula medio obtenido en la leche de coco con respecto al control, las variaciones a menores o mayores valores se deben también a la variación de la densidad de población de las partículas alrededor de las modas de 3 y 10  $\mu\text{m}$ , lo que finalmente, afectó el valor medio reportado.

Cuadro 3.8. Diámetro medio e índice de polidispersidad de partículas determinados en la leche de coco extraída por los métodos control, microondas y ultrasonido en diferentes días, se indica el coeficiente de variación (C.V.).

Día	Tratamiento	Diámetro medio		Índice de polidispersidad	
		$\mu\text{m}$	C.V. (%)	----	C.V. (%)
1	C	5.04 <sup>A</sup>	1.4	1.82 <sup>A</sup>	2.2
	M	5.00 <sup>A</sup>	0.4	1.80 <sup>A</sup>	0.6
	U	2.54 <sup>B</sup>	4.7	1.43 <sup>B</sup>	0.7
2	C	6.60 <sup>a</sup>	2.9	2.60 <sup>a</sup>	10.8
	M	6.28 <sup>b</sup>	1.0	2.27 <sup>b</sup>	6.2
	U	4.24 <sup>c</sup>	4.0	2.71 <sup>a</sup>	5.2
3	C	6.14 <sup>d</sup>	1.1	2.27 <sup>CD</sup>	1.0
	M	8.14 <sup>e</sup>	1.2	2.15 <sup>D</sup>	4.1
	U	3.91 <sup>f</sup>	14.3	2.49 <sup>C</sup>	4.3
4	C	5.00 <sup>C</sup>	0.6	2.04 <sup>E</sup>	0.8
	M	5.67 <sup>D</sup>	1.1	1.97 <sup>E</sup>	2.6
5	C	5.10 <sup>E</sup>	4.5	2.08 <sup>F</sup>	4.6
	U	3.14 <sup>G</sup>	0.6	1.34 <sup>G</sup>	4.4

Exponentes en una columna, en el mismo día y con la misma letra, indica que no hay diferencia significativa entre medias.

El ultrasonido en todos los casos generó un comportamiento en la distribución de la población, similar a la presentada en el apartado 3.1.3 y una reducción estadísticamente significativa del diámetro medio hasta valores entre 2.54 a 4.24  $\mu\text{m}$ . Iswarin y Permadi (2012) reportaron que el ultrasonido aumentó la homogenización de la leche de coco y redujo significativamente el tamaño de partícula desde 5.44  $\mu\text{m}$  a 3.64  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, en el presente estudio se

determinó la mayor variabilidad analítica en términos del coeficiente de variación por este tratamiento (4.0, 4.7 y 14.0), por lo que, la energía liberada durante la cavitación disminuyó el diámetro medio de las partículas de forma no controlada. No obstante, se ha comprobado la viabilidad de estas tecnologías con reactores ultrasónicos y de microondas con homogeneidad de campo que favorece alta reproducibilidad en las extracciones (Vinatoru *et al.*, 2017; Ciriminna *et al.*, 2016) y las hace viables y escalables.

Complementariamente, el método de preparación por molienda húmeda fue el que principalmente influyó en el diámetro medio reportado, con cambios de la densidad de población al combinar el tratamiento control con el asistido por microondas y ultrasonido. Los valores de las modas obtenidas alrededor de 3 y 10  $\mu\text{m}$ , fueron relativamente comparables a los valores reportados en la leche de coco de 11 a 12  $\mu\text{m}$  por Tangsuphoom y Coupland (2008).

La obtención de una leche homogénea de distribución de tamaño de partícula no fue objetivo de esta investigación, porque no se intentó obtener la leche de coco (emulsión) como producto final, sino desestabilizarla y separar la crema, aun así, la información obtenida es útil en la caracterización de la leche, en el efecto de los tratamientos aplicados y para las discusiones posteriores.

Para lograr una distribución gaussiana, se podrían aplicar tratamientos con tiempos de molienda húmeda superiores a 60 s y obtener un producto homogéneo, cuidando que el tiempo de molienda o de exposición a la radiación por microondas o ultrasonido, no sobrepase los 45 °C, por las razones explicadas en la metodología (apartado 2.4.1) y con la finalidad de no desnaturalizar las proteínas.

En el Cuadro 3.9 se reportan los resultados para las mediciones de pH, humedad, el rendimiento de aceite y proteínas solubles en la leche de coco extraída en cinco días entre los que cambió el fruto, mediante los tratamientos control (C), microondas (M) y ultrasonido (U). Las comparaciones estadísticas se realizaron entre los tratamientos en un mismo día.

Para cuatro de los cinco experimentos se observa que el efecto de los diferentes tratamientos dentro de un mismo día no cambió el pH, y fueron valores cercanos a los reportados por Tangsuphoom y Coupland (2008) de 6.1 a 6.3 unidades. El hecho de que no se haya evidenciado cambio de pH pudo deberse a la alta dilución de la leche de coco al utilizar el factor 5 agua: 1 coco.

Cuadro 3.9. Humedad, pH y rendimiento de extracción de aceite y proteínas solubles de la leche de coco obtenida a partir del tratamiento control (C), microondas (M) y ultrasonido (U).

Día	T	pH	Humedad (%)	Masa de leche (g/150 g muestra)	Rendimiento de aceite (%)	Rendimiento de Proteína (%)
1	C	6.65 <sup>a</sup> ± 0.05	92.72 <sup>a</sup> ± 0.53	124.63 <sup>a</sup> ± 1.13	46.43 <sup>b</sup> ± 4.71	4.85 <sup>b</sup> ± 0.10
	M	6.54 <sup>b</sup> ± 0.01	92.66 <sup>a</sup> ± 0.62	127.31 <sup>a</sup> ± 0.99	60.11 <sup>a</sup> ± 4.71	5.23 <sup>b</sup> ± 0.63
	U	6.49 <sup>b</sup> ± 0.02	92.38 <sup>a</sup> ± 0.07	125.40 <sup>a</sup> ± 1.47	53.42 <sup>ab</sup> ± 3.34	7.64 <sup>a</sup> ± 0.62
2	C	6.32 <sup>c</sup> ± 0.03	92.80 <sup>b</sup> ± 0.36	125.78 <sup>b</sup> ± 0.59	68.04 <sup>c</sup> ± 4.38	8.49 <sup>cd</sup> ± 0.62
	M	6.30 <sup>c</sup> ± 0.01	92.75 <sup>b</sup> ± 0.48	129.36 <sup>c</sup> ± 1.52	80.94 <sup>d</sup> ± 3.21	7.03 <sup>d</sup> ± 0.77
	U	6.27 <sup>c</sup> ± 0.03	92.80 <sup>b</sup> ± 0.36	126.34 <sup>b</sup> ± 0.61	60.16 <sup>cd</sup> ± 4.57	8.84 <sup>c</sup> ± 0.49
3	C	6.23 <sup>d</sup> ± 0.01	94.21 <sup>c</sup> ± 0.36	124.34 <sup>d</sup> ± 0.31	63.89 <sup>e</sup> ± 3.20	4.76 <sup>ef</sup> ± 0.07
	M	6.20 <sup>d</sup> ± 0.02	93.37 <sup>cd</sup> ± 0.34	128.46 <sup>f</sup> ± 0.97	79.09 <sup>f</sup> ± 6.04	5.09 <sup>f</sup> ± 0.08
	U	6.21 <sup>d</sup> ± 0.02	94.18 <sup>c</sup> ± 0.23	125.16 <sup>d</sup> ± 0.25	70.98 <sup>ef</sup> ± 5.02	6.35 <sup>e</sup> ± 0.13
4	C	6.23 <sup>e</sup> ± 0.03	93.39 <sup>e</sup> ± 0.08	123.69 <sup>g</sup> ± 0.60	70.99 <sup>g</sup> ± 1.46	10.46 <sup>g</sup> ± 1.88
	M	6.20 <sup>e</sup> ± 0.02	93.18 <sup>e</sup> ± 0.14	131.23 <sup>h</sup> ± 1.25	80.55 <sup>h</sup> ± 1.41	9.79 <sup>g</sup> ± 0.59
5	C	6.45 <sup>f</sup> ± 0.03	95.52 <sup>f</sup> ± 0.09	124.16 <sup>i</sup> ± 0.29	66.95 <sup>i</sup> ± 1.05	9.00 <sup>h</sup> ± 0.61
	U	6.51 <sup>f</sup> ± 0.06	95.19 <sup>f</sup> ± 0.12	128.03 <sup>l</sup> ± 1.71	68.75 <sup>l</sup> ± 2.04	9.48 <sup>h</sup> ± 0.11

± Desviación estándar. Exponentes en una columna, en el mismo día y con la misma letra, indica que no hay diferencia significativa entre medias.

Las diferencias significativas observadas en el pH entre los diferentes días, probablemente estuvo relacionado con los ácidos grasos libres que pudieron estar presentes en los lípidos o el contenido de aceite cuantificado. Los valores más altos de pH de la muestra control de los días 1 y 5 (6.45 a 6.65), se pueden asociar con las concentraciones más pequeñas de aceite para esos mismos días (46.43 y 66.95%). De igual modo, los menores valores de pH de los días 2, 3 y 4 (6.23 a



6.32), se relacionan con las mayores concentraciones de aceite extraído en la leche de coco (63.89 a 68.04%). Patil y Benjakul (2017) observaron que el pH disminuía (7.0, 6.5 y 5.58) cuando la concentración de aceite se incrementaba (18.59% 20.86% y 32.45%, respectivamente), lo que concuerda con los resultados de esta investigación.

Al igual que en el apartado anterior, se observa que la radiación de ultrasonido no aumentó de forma significativa el rendimiento de aceite en la leche de coco con respecto al control. Mientras que el método asistido por microondas en todas las extracciones generó un aumento estadísticamente significativo. Por consiguiente, el método microondas fue favorable para obtener un incremento e independiente del fruto que se utilizó en el proceso o a su madurez. Desde luego, el calentamiento del agua intracelular por microondas fue más efectivo en la ruptura de las células para extraer el aceite en comparación al fenómeno de cavitación por ultrasonido.

La radiación microondas o de ultrasonido no presentaron un efecto importante sobre la solubilidad de las proteínas en la leche de coco. En otros estudios se ha evidenciado que la solubilidad de las proteínas es influenciada principalmente por la fuerza iónica, disminuyendo la solubilidad al adicionarse sal (Kwon *et al.*, 1996; Mepba *et al.*, 2008; Angelia *et al.*, 2010), se incrementa por efecto de cambio en pH, de un 10% (pH 6) hasta un 70% (pH 7), pudiendo alcanzar un 80% a pH 8 (no recomendado para no saponificar el aceite) y es mínima entre un pH de 4 a 5 (Thaiphanit y Anprung, 2016). El pH de la leche de coco obtenida en la presente investigación se encontró entre 6.2 y 6.65, y lejos de la saponificación del aceite.

### **3.1.5 Evaluación del efecto de ultrasonido y microondas sobre la pureza y composición de la fracción de las proteínas recuperada de la crema de coco**

El efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre las propiedades de la fracción de las proteínas de coco obtenida en tres lotes se presentan en el Cuadro 3.10. Se reporta la concentración de la proteína total extraída de la crema, la pureza, la humedad, las cenizas y los carbohidratos. Las

comparaciones estadísticas fueron realizadas entre los tratamientos de un mismo día (igual materia prima).

Las cenizas y los carbohidratos presentes en las proteínas separadas de la crema de coco (Cuadro 3.10), constituyen las impurezas. La concentración de cenizas fue variable (9 - 32%) y no se detectaron diferencias significativas por los tratamientos alternos excepto en la experimentación del día 5.

Cuadro 3.10. Caracterización de la proteína total de la crema de coco obtenida por los tratamientos control (C), microondas (M) y ultrasonido (U).

Día	T	Proteína (%) base crema	Pureza (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Carbohidratos (%)
3	C	6.69 <sup>a</sup> ± 0.84	46.71 <sup>a</sup> ± 1.63	0.46 <sup>a</sup> ± 0.05	23.07 <sup>a</sup> ± 5.05	29.76 <sup>a</sup> ± 6.16
	M	8.83 <sup>a</sup> ± 1.46	50.55 <sup>b</sup> ± 0.70	0.59 <sup>b</sup> ± 0.01	32.09 <sup>a</sup> ± 5.15	16.77 <sup>b</sup> ± 5.85
	U	15.24 <sup>b</sup> ± 0.81	29.00 <sup>c</sup> ± 2.27	0.70 <sup>c</sup> ± 0.10	22.95 <sup>a</sup> ± 3.07	47.36 <sup>c</sup> ± 4.92
4	C	6.02 <sup>c</sup> ± 0.32	29.14 <sup>f</sup> ± 3.48	0.25 <sup>d</sup> ± 0.05	30.11 <sup>b</sup> ± 6.88	40.50 <sup>d</sup> ± 8.13
	M	4.63 <sup>c</sup> ± 0.29	56.99 <sup>d</sup> ± 6.72	0.28 <sup>d</sup> ± 0.06	28.17 <sup>b</sup> ± 4.70	14.56 <sup>e</sup> ± 3.36
5	C	7.55 <sup>d</sup> ± 0.96	21.55 <sup>c</sup> ± 0.45	0.35 <sup>e</sup> ± 0.04	21.55 <sup>c</sup> ± 5.25	58.54 <sup>f</sup> ± 4.88
	U	10.04 <sup>e</sup> ± 0.73	31.63 <sup>e</sup> ± 2.74	0.32 <sup>e</sup> ± 0.01	9.06 <sup>d</sup> ± 0.42	59.00 <sup>f</sup> ± 2.59
Día	T	Proteína (%) base crema	Pureza (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Carbohidratos (%)
3,	C	6.79 <sup>B</sup> ± 0.89	31.80 <sup>D</sup> ± 12.08	0.35 <sup>A</sup> ± 0.10	24.91 <sup>A</sup> ± 6.38	42.93 <sup>F</sup> ± 13.80
4 y	M	6.72 <sup>B</sup> ± 2.32	53.77 <sup>C</sup> ± 5.54	0.44 <sup>A</sup> ± 0.17	30.13 <sup>A</sup> ± 4.91	15.66 <sup>D</sup> ± 4.43
5	U	12.68 <sup>C</sup> ± 3.03	30.31 <sup>D</sup> ± 2.67	0.51 <sup>A</sup> ± 0.22	16.00 <sup>E</sup> ± 7.86	53.18 <sup>F</sup> ± 7.86
Coeficiente de variación (%)						
3,	C	13	38	26	32	38
4 y	M	35	10	16	28	10
5	U	24	9	49	15	9

± Desviación estándar. Exponentes en una columna, en el mismo día y con la misma letra, o en los tratamientos agrupados y con la misma letra, indica que no hay diferencia significativa entre medias.

La pulpa de coco utilizada en el día 5 fue más blanda y presentó los valores más altos de carbohidratos en comparación con los días 3 y 4, que provinieron de cocos más duros. Por lo cual, una pulpa con una textura blanda y de cocos más inmaduros posiblemente favoreció durante la molienda por inmersión en húmedo y/o

ultrasonido se aumentará la extracción de los carbohidratos o la fibra fuera arrastrada con las proteínas en la leche de coco, que posteriormente, pasó a la crema y luego fue separada.

En el día 3 la pureza de la fracción de proteínas disminuyó significativamente con el tratamiento de ultrasonido (29.0%) con respecto al control (46.71%), por la alta concentración de carbohidratos calculada (47.36%). En el día 5 la pureza aumentó y también la muestra presentó alto contenido carbohidratos (59.0%). Al no considerar el efecto del cambio de la materia prima (día 3, 4 y 5) la pureza fue baja y no diferente al control (30.31%). Para todos los lotes con el microondas se alcanzó la más alta pureza (53.77%) y un incremento significativo.

La correlación negativa y significativa de Pearson (-0.90,  $p < 0.05$ ) entre los diámetros medios de partícula de la leche de coco generados por los diferentes tratamientos (Cuadro 3.8) y el contenido carbohidratos de las proteínas separadas (Cuadro 3.10), confirmó la reducción de la pureza. Puesto que implicó que los menores diámetros generados por la cavitación ultrasónica (3 - 4  $\mu\text{m}$ ) aumentaran las impurezas de carbohidratos, lo que repercutió en la reducción de la pureza de las proteínas. No obstante, Vinatoru *et al.* (2017) mencionan que la reducción de la pureza en las sustancias de interés por ultrasonido, es una de sus desventajas, por lo que se debe evaluar rendimientos de extracción contra los costos de purificación.

Sin embargo, los tratamientos alternos con respecto al control redujeron de forma favorable el coeficiente de variación de la pureza de la fracción de las proteínas recuperadas desde un 38 a 10% en el microondas y hasta el 9% con el ultrasonido (Cuadro 3.10). Por lo cual, se puede decir que estos tratamientos alternos generan resultados más reproducibles con respecto a la pureza.

En comparación con otros procesos de extracción de proteínas de coco, Thaiphanit y Anprung (2016), determinaron para las proteínas de la leche de coco separadas por precipitación isoeléctrica y centrifugación, una pureza del 80%, fibra cruda del 0.64% y carbohidratos del 0.06%. Onsaard *et al.* (2006) para las proteínas de la crema de coco a las que se les removió el aceite residual con hexano, cuantificaron

una pureza del 89.0% y carbohidratos de 1.6%, siendo procesos más eficientes en la separación de proteínas.

En el estudio de Rodsamran y Sothornvit (2017), para las proteínas solubilizadas con una solución a pH 11 y liofilizadas (partiendo de un concentrado generado en la obtención de la leche de coco), se les cuantificó una pureza (22%), cenizas (31%) y carbohidratos (40%), con una magnitud menor al control del presente trabajo. En dicho estudio, cuando se realizó la precipitación isoeléctrica de las proteínas solubilizadas a pH 11, las cenizas (2%), carbohidratos (15%) y la pureza de la fracción de proteínas obtenidas (63%), fueron valores no muy lejanos a los carbohidratos (15.17%) y la pureza (53.8) de la fracción de proteínas obtenidas por el tratamiento microondas del presente trabajo.

En consecuencia, la precipitación isoeléctrica es una estrategia que se puede utilizar en la purificación de las proteínas obtenidas en los métodos de molienda en húmeda o asistida (desde el punto de vista industrial y no como criterio de pureza en el laboratorio), aunque una baja pureza no implica que las proteínas no tengan propiedades funcionales alimenticias. Por ejemplo, las proteínas de coco aisladas con una concentración al 45% y dispersadas en agua al 15% (proteína 6.5%), presentaron alta fuerza de gel a temperaturas entre 63 a 67 °C, pH de 7 a 9 y baja fuerza iónica (Chambal *et al.*, 2014).

### **3.1.6 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido en el rendimiento de extracción de la proteína total y aceite obtenidos de la crema de coco**

En el Cuadro 3.11 se muestra el rendimiento de aceite (RA) y proteína total (RP) obtenido en la crema de coco con respecto al aceite y proteína total de la pulpa de coco. El rendimiento de proteína total presentado se obtuvo después de corregir la proteína por su pureza. Las comparaciones estadísticas se realizaron para los valores medios de los tratamientos en un mismo día, así como entre los tratamientos, sin considerar el efecto del día (cambio de materia prima).

Con el tratamiento control<sub>3</sub> en el que se utilizó una pulpa de coco con altos contenidos de humedad, los menores contenidos de aceite, más blandos y relacionados a cocos inmaduros (10-11 meses) (Cuadro 3.1), se obtuvo baja recuperación de aceite (59.08%). En los otros controles en los que se utilizó una materia prima con una menor humedad, un contenido de aceite superior al 30%, una textura más dura y relacionados con coco maduros (11-12 meses), se obtuvieron valores más altos en el rendimiento de aceite (64.95 - 70.11%). En consecuencia, una pulpa de coco en mayor estado de madurez favoreció mejores recuperaciones.

Cuadro 3.11. Recuperación de aceite (RA) y proteína total (RP) y rendimiento relativo mediante diferentes tratamientos.

Rendimiento relativo al control					
Tratamiento	Día	RA (%)	RP (%)	Aceite (%)	Proteína (%)
Control <sub>1</sub>	3	64.95 <sup>a</sup> ± 1.20	19.90 <sup>b</sup> ± 2.70	-----	-----
Microondas <sub>1</sub>	3	79.83 <sup>b</sup> ± 2.37	24.71 <sup>ab</sup> ± 2.91	18.6	19.6
Ultrasonido <sub>1</sub>	3	71.66 <sup>c</sup> ± 2.80	29.80 <sup>a</sup> ± 2.85	10.3	49.6
Control <sub>2</sub>	4	70.11 <sup>d</sup> ± 0.81	13.84 <sup>c</sup> ± 1.08	-----	-----
Microondas <sub>2</sub>	4	83.95 <sup>e</sup> ± 1.07	21.89 <sup>d</sup> ± 2.91	19.7	58.1
Control <sub>3</sub>	5	59.08 <sup>f</sup> ± 4.70	18.71 <sup>e</sup> ± 2.53	-----	-----
Ultrasonido <sub>3</sub>	5	68.61 <sup>g</sup> ± 2.59	34.83 <sup>f</sup> ± 3.06	16.1	86.1
Tratamientos	Día	RA (%)	RP (%)	Aceite (%)	Proteína (%)
Control <sub>1,2,3</sub>	3,4,5	64.71 <sup>A</sup> ± 5.37	17.5 <sup>A</sup> ± 3.21	-----	-----
Microondas <sub>1,2</sub>	3,4	81.89 <sup>B</sup> ± 2.79	23.3 <sup>B</sup> ± 2.38	26.5	33.4
Ultrasonido <sub>1,3</sub>	3,5	70.14 <sup>A</sup> ± 3.36	32.3 <sup>D</sup> ± 3.54	8.3	84.9

± Desviación estándar. Exponentes en una columna, en el mismo día y con la misma letra o en los tratamientos agrupados y con la misma letra, indica que no hay diferencia significativa entre medias.

Los cambios en la composición y estructurales de los carbohidratos en la pared celular de la pulpa de coco a diferentes estados de madurez, pueden ser los que dificultan la lisis celular y generan variaciones en los rendimientos. Aunque Patil y Benjakul (2017) no lo mencionaron, obtuvieron la más alta extracción de aceite en

la leche utilizando un fruto de mayor madurez y con el menor contenido de carbohidratos (33.52%), seguido de los sobremaduros (36.93%) y los inmaduros (46.75%) (Cuadro 1.3). Barrios (1991) utilizando un método enzimático para la lisis celular determinó un incremento en el rendimiento de extracción del aceite empleando cocos maduros (80%) con respecto a los inmaduros (62%), lo cual confirmó que los cambios estructurales de la pared celular asociados a los carbohidratos influyeron en las reacciones enzimáticas y finalmente en dicho rendimiento.

En los tres experimentos se obtuvo un incremento en el potencial de extracción estadísticamente significativo en la crema utilizando tecnologías alternas, ya que la recuperación de aceite y de proteína total fue más alta con respecto al control. Sin considerar el efecto de la materia prima, con el tratamiento microondas se obtuvieron los mejores rendimientos de aceite (81.9%) y con el ultrasonido de proteína (32.3%). Estos valores son equivalentes a un rendimiento relativo respecto al control en el caso del aceite extraído por microondas de 18.6 a 19.7% y para la proteína extraída por ultrasonido, de 49.6 a 86.1%.

A pesar de que los tratamientos alternos intensificaron significativamente la extracción de la proteína total, el intervalo del rendimiento relativo fue bastante amplio (19.6 a 58.1% y 49.6 a 86.1%) o no reproducible. Siendo así, la alta polidispersidad de las partículas en la leche de coco causada principalmente por la molienda húmeda, probablemente influyó en que los tratamientos alternos intensificaran la variación en el rendimiento. La centrifugación también pudo afectar la concentración y el tipo de proteína que quedó en la crema, debido a las posibles diferentes densidades de las proteínas a un pH 4 (punto isoeléctrico), y no sólo por su interacción con el aceite.

En la extracción enzimática anteriormente citada se recuperó de la pulpa de coco un 73.8% de aceite (Che Man *et al.*, 1996) y en los residuos durante la obtención de AVC por métodos industriales se han reportado pérdidas de 24 a 32%, que equivalen a un rendimiento de extracción entre 68 y 76% (Sulaiman *et al.*, 2013;

Rodsamran y Sothornvit, 2017). En otros procesos industriales de extracción de AVC por prensado del coco húmedo o seco, los rendimientos han sido de entre 20 y 50% (Dia *et al.*, 2005; Kindermann *et al.*, 2007; Quitain *et al.*, 2013). En consecuencia, el tratamiento por microondas es una alternativa con más potencial para extraer el AVC y podría generar un aumento de la extractabilidad de un 5 a 60%, con respecto a los métodos convencionales mencionados o al método enzimático (probablemente más costoso por el uso de enzimas y el sistema de control que se requiera).

Con relación a lo anterior, en el Cuadro 3.12 se muestra que en el 2018 se generó una producción mundial de aceite de coco de 3.6 millones de toneladas (1015.72 dólares por tonelada) y un ingreso total medio de 3.68 mil millones de dólares. Filipinas, Indonesia, India, Vietnam y México fueron los mayores productores. Si se consideran los rendimientos de aceite reportados por otros estudios de 32, 50 y 75% (Sulaiman *et al.*, 2013; Rodsamran y Sothornvit, 2017; Dia *et al.*, 2005; Kindermann *et al.*, 2007), y el rendimiento de método microondas del presente trabajo (81.9%), éste tiene una extractabilidad del 6, 32 y 50%. Por lo cual, se plantea la hipótesis, que en la producción mundial existe la posibilidad de generar una ganancia adicional entre 9 mil millones de dólares y 530 millones de dólares (Cuadro 3.12). En México podría representar de 20 a 341 millones de dólares y el potencial de ganancia del mayor productor sería de 257 millones a 4.37 mil millones de dólares.

Por otro lado, aun no existe información necesaria en la literatura con respecto al costo de producción de las proteínas de coco, pero sus propiedades de superficie y alto rendimiento de extracción, las hacen atractivas en la diversificación de la industria de alimentos, además de que existe un creciente interés en reemplazar los emulsionantes sintéticos por naturales como los polisacáridos y las proteínas. Como ejemplo de aplicación se cita a Lad y Murthy (2012) quienes determinaron que tan solo una concentración de 1.2% de proteínas de coco, fue necesaria para obtener una emulsión aceite/agua (10%) estable por 14 días y homogenizada por ultrasonido (120 W). En el estudio de Chambal *et al.* (2014), una dispersión acuosa

constituida con un 6.5% proteínas de coco formó geles estables a temperaturas entre 63 y 67 °C.

Cuadro 3.12. Producción mundial de aceite de coco, rendimiento industrial y aumento porcentual por microondas expresado en dólares (IndexMundi, 2018).

Rendimiento industrial (%)		75	50	32
Aumento por microondas (extractabilidad) (%)		6	32	50
Producción	Toneladas (t)	Aumento equivalente (USD X 10 <sup>6</sup> )		
Total	3,631,000	530	3,693	9,027
Filipinas	1,758,000	257	1,788	4,371
Indonesia	890,000	130	905	2,213
India	467,000	68	475	1,161
Vietnam	180,000	26	183	448
México	137,000	20	139	341

En comparación con otros estudios, Yoon *et al.* (1991) con una relación de dilución 1:6 (soya: agua), pH 8, 40 °C, tamaño de partícula pequeño (malla 120-150 µm), sin sonicación y utilizando mayores tiempos de sonicación con respecto a la presente investigación (5 min), aumentaron los rendimientos de 62 a 85% de aceite y de 68 a 87% de proteína total. Después de 10 min de sonicación obtuvieron un rendimiento del 90% para estas sustancias. En otra investigación, la extracción asistida por ultrasonido de aceite de dátil, a 20 kHz y utilizando solvente, en comparación con el método Soxhlet, las extracciones no aumentaron, pero se redujo satisfactoriamente el tiempo de proceso de 180 a 45 min y la energía consumida de 128 kJ/g a 0.30 kJ/g (Jadhav *et al.*, 2016).

En general, se evidenció que el microondas mejoró significativamente el rendimiento de extracción de aceite y aunque la extracción de proteína total fue menor con respecto al ultrasonido, es una metodología de mayor potencia para extraer AVC y diversificar la industria a través de la separación simultánea de proteínas. En relación con otras aplicaciones, en España a escala piloto se ha demostrado con la extracción microondas una ventaja técnica y económica (aumento en la velocidad de proceso, rendimiento, y reducción consumo de energía)



con respecto a las extracciones convencionales sólido-líquido, o emergentes de extracción con líquido presurizado (altas temperaturas, presión y solvente) o asistida por ultrasonido (Soria *et al.*, 2015). En Canadá una planta industrial de extracción por microondas se construyó bajo la concepción de que menos costosa y más escalable en comparación a las tecnologías de extracción convencionales y alternativas (extracción de fluido supercrítico/CO<sub>2</sub>, cromatografía en columna, extracción con solventes convencionales y destilación con vapor) (Radient, 2019).

### **3.2 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el contenido de fenoles totales en la crema y leche descremada de coco**

A través del método de ultrasonido propuesto, se obtuvo un contenido de fenoles totales equivalentes a ácido gálico de 41.34 mg EAG/100 g coco seco, utilizando una pulpa de coco con una humedad de 48.68%, aceite de 31.74% y textura dura. Al comparar estos resultados con un método no asistido por ultrasonido, se reportaron valores mayores a los cuantificados tanto en frutos cosechados con 6 meses (2.6 a 33.2 mg EAG/100 g coco seco) o con 7.5 meses de madurez (14 a 16 mg EAG mg EAG/100 g coco seco) (Cuadro 1.7) (Mahayothee *et al.*, 2016).

En el Cuadro 3.13 se reporta el rendimiento de extracción de los fenoles totales en la crema de coco y en la leche descremada base fenoles en la pulpa de coco, expresados como EAG en crema / EAG en coco (%), así como, los fenoles en la crema y en la leche descremada y expresados como mg EAG por cada 100 g de leche de coco que se desestabilizó.

La solubilización de los fenoles en la leche con un pH de 6.3 se generó posiblemente debido a la ionización de los principales fenoles ácidos determinados en la pulpa de coco como los determinados en mayor proporción, ácido cafeico, gálico y salicílico (Mahayothee *et al.*, 2016) y cuyos pK<sub>a</sub> son 4.62, 4.33 y 3.58, respectivamente.

Después de ajustar el pH de la leche de coco a 4, la polaridad de los fenoles posiblemente influyó en su solubilización en más alta proporción en la leche

descremada (43.42 y 58.67%), constituida principalmente de agua, y en menor proporción en la crema (12.50 y 22.97%) con alto porcentaje aceite de naturaleza apolar.

Cuadro 3.13. Contenido de fenoles totales equivalentes a ácido gálico (EAG) en crema y leche descremada de coco (LD), expresados en base EAG en coco y base leche de coco (LC) extraídos bajo diferentes tratamientos.

Tratamiento	Crema		Leche descremada (LD)	
	EAG en crema/ EAG en coco (%)	mg EAG en crema/ 100 g LC	EAG en LD/ EAG en coco (%)	mg EAG LD/ 100 g LC
Control	12.50 <sup>A</sup> ± 0.79	0.54 <sup>A</sup> ± 0.03	2.57 <sup>A</sup> ± 0.13	58.70 <sup>A</sup> ± 3.00
Microondas	23.00 <sup>B</sup> ± 2.60	0.93 <sup>B</sup> ± 0.10	2.42 <sup>A</sup> ± 0.11	54.60 <sup>A</sup> ± 2.78
Ultrasonido	22.20 <sup>B</sup> ± 2.22	0.96 <sup>B</sup> ± 0.09	2.23 <sup>A</sup> ± 0.11	43.4 <sup>B</sup> ± 2.96

± Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias.

Para los rendimientos de extracción de los fenoles totales en la leche de coco y calculados (fenoles totales en crema + fenoles totales en leche descremada), se evidenció una diferencia estadísticamente significativa debido al efecto de los tratamientos asistido microondas (77.6%) y ultrasonido (65.6%) con respecto al control (70.5%). Los valores menores obtenidos por ultrasonido se pueden deber a que el proceso de cavitación pudo destruir estas sustancias, aunque se haya aplicado una más baja energía específica (200 kJ/kg). Los valores más altos se obtuvieron por microondas y posiblemente debido a un incremento en la efectividad de la ruptura de las células por el calentamiento intracelular y la alta energía utilizada (400 kJ/kg), pero sin su posible destrucción.

Al considerar el efecto de los tratamientos sobre el contenido de los fenoles en la crema, se evidenció que los tratamientos asistidos con respecto al control generaron un aumento estadísticamente significativo en la incorporación de los fenoles en la crema que se obtiene después de desestabilizar la emulsión de leche de coco (0.93-0.96 mg EAG/100 g LC), lo cual se pudo originar porque la energía aplicada incrementó la energía cinética de las sustancias y finalmente, la probabilidad de la interacción de los fenoles con los compuestos no polares presentes.

Las diferencias del contenido de fenoles en la crema se pueden esclarecer al expresar los fenoles en la crema en base aceite. Siendo así, con los tratamientos control, microondas y ultrasonido se podrían obtener 11.1, 12.8 y 17.4 mg EAG /100 g de aceite, respectivamente. En el control los valores menores se podrían deber al menor tiempo de proceso y energía aplicada que genera la menor probabilidad en la interacción aceite-fenoles. La extracción asistida por ultrasonido podría favorecer la más alta concentración de los fenoles totales en el aceite, por el aumento de temperatura (45°C) y la alta energía cinética de las partículas generada por la cavitación, a pesar de la posible destrucción de estas sustancias durante su extracción en la leche. En el microondas el contenido de fenoles fue mayor al control, posiblemente debido al incremento de la temperatura durante la extracción (45°C). En el microondas con respecto al ultrasonido los valores son menores, aunque la temperatura alcanzada fue comparable, posiblemente debido al menor tiempo en que se expuso la mezcla de coco y agua, a la radiación o la diferencia en el mecanismo seguido.

En comparación con otros estudios, los fenoles en aceite de coco refinado, blanqueado y deodorizado; en AVC obtenido por refrigeración y en AVC separado por fermentación, fueron de 12, 18 y 25 mg EAG /100 g de aceite extraído, respectivamente. Los valores más altos en el método por fermentación se atribuyeron a que la leche de coco se dejó fermentar durante la noche, y el largo tiempo de contacto del aceite con los fenoles favoreció su mayor incorporación. En el AVC donde la muestra se refrigeró (48 h), la crema se obtuvo después de una centrifugación inmediata de la leche de coco, lo cual redujo el tiempo de contacto de los fenoles con el aceite (Marina *et al.*, 2009a).

El calentamiento de la leche de coco a 100 °C produce una evaporación del agua que concentra a las sustancias, por lo que una mayor concentración y temperatura favoreció la incorporación de fenoles en el aceite (7.8 mg fenoles totales/ 100 g aceite). El enfriamiento de la leche de coco a 10 °C por 10 h generó un contenido menor en el aceite por la baja temperatura que no benefició su interacción con los fenoles (6.2 mg fenoles totales/100 g aceite) (Seneviratne *et al.*, 2009). En

consecuencia, la concentración de estas sustancias en el aceite puede depender del método seguido, si es aceite virgen, refinado o la variedad del fruto (6.4 a 60 mg EAG /100 g) (Marina *et al.*, 2009a; 2009b; Seneviratne *et al.*, 2009; Siddalingaswamy *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2016).

En el aceite de oliva los fenoles reportados extraídos por ultrasonido estuvieron entre 26.2 y 155.2 mg EAG /100 g de aceite (Almeida *et al.*, 2017; Chanioti y Tzia, 2017). En la manzana con alto consumo por su conocida actividad antioxidante se determinaron 70 mg EAG /100 g de jugo de manzana (Abid *et al.*, 2014). En higo de diferentes variedades se han reportado valores altos entre 8850 y 15300 mg EAG / 100 g de fruto (Harzallah *et al.*, 2016). Valores bajos de fenoles totales en aceite de coco fueron correlacionados con una actividad antioxidante (Marina *et al.*, 2009a; 2009b). Por lo tanto, la crema, la leche descremada y el aceite de coco no son una fuente alta de fenoles, aunque pudieran presentar una actividad antioxidante.

Por otro lado, Sun-Waterhouse *et al.* (2011) adicionaron ácido cafeico y *p*-cumárico al aceite de coco y aguacate e identificaron un aumento de la estabilidad de los aceites y en su valor nutricional. Por lo que, en conclusión, los tratamientos alternativos incrementaron significativamente los fenoles totales en la crema y su implementación en la industria para la obtención de AVC y simultáneamente la proteína, podría aumentar el efecto protector de la oxidación del aceite o de la proteína con una mejora en su calidad nutricional y de conservación.

### **3.3 Evaluación del efecto de los tratamientos control, microondas y ultrasonido sobre el tamaño de partícula, potencial zeta, tensión superficial y reología dilatacional de la fracción de proteínas obtenida**

#### **3.3.1 Tamaño de partícula y potencial zeta de las dispersiones de proteínas**

En el Cuadro 3.14 se presenta el potencial zeta, el tamaño de partícula y la polidispersidad de las dispersiones de la fracción de proteínas por los diferentes tratamientos control-microondas y control-ultrasonido.

Del potencial zeta se puede inferir que la carga de las partículas fue negativa y posiblemente atribuibles a los grupos funcionales carboxilo ya ionizado ( $\text{COO}^-$ ) de los residuos ácidos de las proteínas, como el ácido glutámico y ácido aspártico en alta proporción en las proteínas de coco (Kwon *et al.*, 1996; Patil y Benjakul, 2017), así como también por los residuos polares con carga que probablemente influyeron en la carga superficial de las proteínas. Thaiphanit y Anprung (2016) para las proteínas precipitadas a pH 4 también le atribuyen el potencial zeta negativo a los grupos ácidos ya ionizados que conforman a las globulinas como las principales proteínas con propiedades de superficie que estabilizan la crema de coco (Tangsuphoom y Coupland, 2009a). Tangsuphoom y Coupland (2008) determinaron en la leche recién extraída un pH de 6 y potencial zeta de -18 mV, cuando la llevaron a un pH de 4 determinaron un potencial de -5 mV.

Cuadro 3.14. Potencial zeta, tamaño de partícula e índice de polidispersidad (IP), de las proteínas de coco dispersas en agua en una concentración al 0.1 %.

Día	Tratamiento	Potencial zeta (mV)	Tamaño de partícula (nm)	IP
4	C1	$-25.57^a \pm 5.5$	$645.7^a \pm 194.4$	$0.54^a \pm 0.21$
	M1	$-27.77^a \pm 0.7$	$476.8^b \pm 123.6$	$0.63^a \pm 0.09$
5	C2	$-20.45^c \pm 4.8$	$524.8^c \pm 49.9$	$0.51^a \pm 0.13$
	U2	$-28.43^d \pm 1.2$	$445.7^c \pm 180.6$	$0.26^b \pm 0.08$

± Desviación estándar. Exponentes en una columna, en el mismo día y con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias.

El valor medio del potencial zeta para tres de las cuatro determinaciones estuvieron entre -25 y -30 mV, intervalo sugerido para obtener emulsiones estables (Thaiphanit *et al.*, 2016). Los valores reportados en el Cuadro 3.14 también son comparables a los -28 mV determinados por Onsaard *et al.* (2006).

Con respecto a sus controles, el tamaño de partícula fue reducido por efecto de la radiación microondas (estadísticamente significativo) y por ultrasonido (no estadísticamente significativo). No obstante, por los tratamientos alternos microondas y ultrasonido se puede obtener un intervalo de tamaño de partícula menor de 445 a 476 nm, en comparación al método control entre 524.8 y 645.7 nm.

El aumento no estadísticamente significativo del potencial zeta por el microondas y si estadísticamente significativo por el ultrasonido con respecto a sus controles, podría atribuirse a las diferencias en el tipo de residuo, al tamaño de las proteínas y su concentración en la fracción de proteínas aisladas. Por ejemplo, Onsaard *et al.* (2006) sugirieron que el aislado de proteínas de suero presentó un potencial zeta superior a las proteínas de coco por arriba de 5 unidades de pH, puesto que también la composición de los residuos ácido glutámico y ácido aspártico fue más alta y en estado ya ionizado ( $pK_a$ : 3.9-4.5).

El menor tamaño de partícula obtenido por ultrasonido y el potencial zeta más negativo probablemente podría generar un incremento en estabilidad a las dispersiones y la más alta resistencia a la agregación de la fase dispersa, debido a la mayor magnitud de las repulsiones electrostáticas. Entre las dos fracciones de proteínas aisladas por Onsaard *et al.* (2006), la fracción de menor tamaño también presentó mejores propiedades emulsionantes.

Adicionalmente, la polidispersidad por efecto del ultrasonido fue reducida con respecto al control ( $IP < 0.5$ ). Este efecto se podría atribuir a que las ondas de presión vigorosas transmitidas a través del ultrasonido que se propagó en la fase líquida de la leche de coco, pudo generar que las proteínas experimentaran la compresión y expansión de sus estructuras moleculares o separación en polipéptidos más pequeños. Por lo tanto, al obtenerse la crema, estas proteínas con baja polidispersidad en su tamaño presentaron fuerte interacción con el aceite, y la fuerza centrífuga no fue superior a esta interacción, por lo que se mantuvieron cuando se obtuvo la crema de coco por centrifugación. Lad y Murthy (2012) también sugieren que la desnaturalización de las cadenas de proteínas por la alta cavitación es el factor más responsable de la actividad superficial mejorada de las proteínas en emulsiones y su reducción del tamaño de partícula.

El control y el tratamiento por microondas generaron mayor polidispersidad. El IP obtenido en este estudio fue de 0.61, 0.51-0.54 y 0.24, para los tratamientos control, microondas y ultrasonido, respectivamente.

### 3.3.2 Tensión superficial dinámica en la interfase

En la Figura 3.3 se muestra los cambios en presión de la interfase aire: agua como respuesta del mecanismo de adsorción de proteínas dispersas y obtenidas por los métodos microondas y ultrasonido en comparación a su respectivo control.

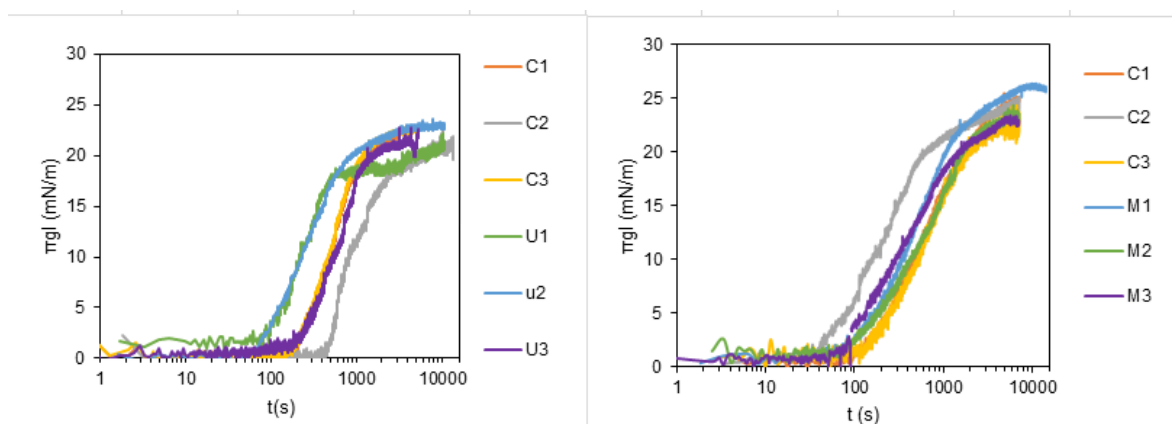


Figura 3.3. Aumento de la presión de la interfase aire: agua con respecto al tiempo (t), en presencia de las proteínas de coco y extraídas por los tratamientos (a): control (C) -ultrasonido (U), (b): control (C) -microondas (M). La tensión de interfase de referencia fue la del agua pura.

Como se puede observar, el inicio de la presión a mayores o menores tiempos de la fase 2, pudo deberse a alteraciones en la velocidad de difusión de las proteínas desde el seno del agua hacia la interfase, generadas por la polidispersidad, diferencias en la carga o la presencia de las impurezas previamente reportadas.

Adicionalmente, la polidispersidad probablemente pudo generar cambios en la concentración del tipo de proteína en la gota formada, que puede repercutir en cambios del inicio de esta fase. Esto último se sugiere porque varios estudios han demostrado a través de isothermas de adsorción que con una mayor concentración de proteína, el aumento de la presión se da a tiempos más bajos (Ybert y di Meglio, 1998; Kamel, 2012).

La variación en la velocidad de crecimiento de la presión ( $d\pi/dt$ ) de la fase 2, podría asociarse a cambios en la velocidad de crecimiento de la concentración en la interfase de las diferentes proteínas de la fracción estudiada. Cornec *et al.* (1999), demostraron para la  $\alpha$ -Lactoalbúmina una velocidad de crecimiento de  $d\pi/dt$  y de la

concentración mayor con respecto a la  $\beta$ -Lactoglobulina. Además, sugieren que la velocidad de crecimiento varía en función de la estabilidad termodinámica de las proteínas.

La presión en la interfase debida el pseudoequilibrio alcanzado en la última de fase del perfil cinético no fue significativamente diferente por los tratamientos alternos con respecto a su control (Cuadro 3.15). Por consiguiente, las variables presentadas en el Cuadro 3.14 no tienen una relación con el tratamiento utilizado dentro de esta región de la cinética.

La diferencia no significativa sugiere que las proteínas después de los cambios conformacionales probablemente adquirieron una conformación comparable o al menos una carga superficial no significativamente diferente. Adicionalmente, esta actividad de superficie pudo no ser diferente, porque las principales proteínas que estabilizan la emulsión de la crema de coco, han sido identificadas y pertenecientes a la misma familia de las globulinas de coco, entre las cuales la 11S y la 7S son la de mayor relevancia (Tangsuphoom y Coupland, 2009a).

Cuadro 3.15. Presión superficial de la fracción de proteínas de coco (0.1%) en la interfase aire: agua obtenidas por los tratamientos control-ultrasonido y control-microondas.

Día	Tratamiento	Presión superficial (mN/m)
4	Control	23.91 <sup>B</sup> ± 1.01
	Microondas	23.85 <sup>B</sup> ± 1.35
5	Control	21.97 <sup>A</sup> ± 0.72
	Ultrasonido	21.74 <sup>A</sup> ± 1.44
Proteína (Bos y Van Vliet, 2001)		Presión superficial (mN/m)
Albúmina de suero bovino (0.1%, pH 6.7)		17.8
$\beta$ -Caseína (0.1%, pH 7.1)		22.0
Caseinato de sodio (0.3%, pH 6.7)		25.0

± Desviación estándar. Exponentes en una columna, en el mismo día y con la misma letra, indica que no hay diferencia significativa entre medias.



En relación con otros estudios, Thaiphanit *et al.* (2016) reportaron para las interfases aire: agua en presencia de una solución amortiguadora (fosfato 0.1 M) y aire: agua en presencia del concentrado de proteína dispersa en la solución amortiguadora, una tensión superficial de 53.5 y 35.8 mN/m, lo que equivale a un incremento de la presión superficial de 17.6 mN/m, el cual es un valor inferior al determinado en el presente estudio. A una concentración de 0.1% de proteínas dispersas en agua, Onsaard *et al.* (2006), determinaron un valor alrededor de 28 mN/m de presión superficial.

El aumento de la presión superficial por la presencia de las proteínas de coco (Cuadro 3.15), estuvo dentro del intervalo general de 15 a 25 mN/m atribuible a las proteínas. En comparación con las proteínas de alta aplicación industrial, los resultados fueron superiores a los reportados para la caseína y la albúmina sérica bovina, y cercanos al reportado para el caseinato de sodio. Desde luego, el descenso de la tensión o aumento de la presión superficial es una propiedad que es importante determinar porque reduce el trabajo mecánico para realizar emulsiones o espumas (Bos y Van Vliet, 2001).

### **3.3.3 Reología dilatacional en la interfase**

De la Figura 3.4 se evidencia que las proteínas dispersas en agua y en la interfase, poseen propiedades viscoelásticas con un comportamiento elástico y viscoso (módulos  $E'$ ,  $E''$ ), y no se demostró un efecto de los tratamientos alternos con respecto al control en la magnitud de dichos módulos.

En los tratamientos control y ultrasonido se observa menos dispersión del módulo  $E'$  entre las réplicas en todo el barrido de frecuencia, lo que posiblemente estuvo relacionado con la baja polidispersidad de las partículas entre 0.26 a 0.51 (Cuadro 3.14).

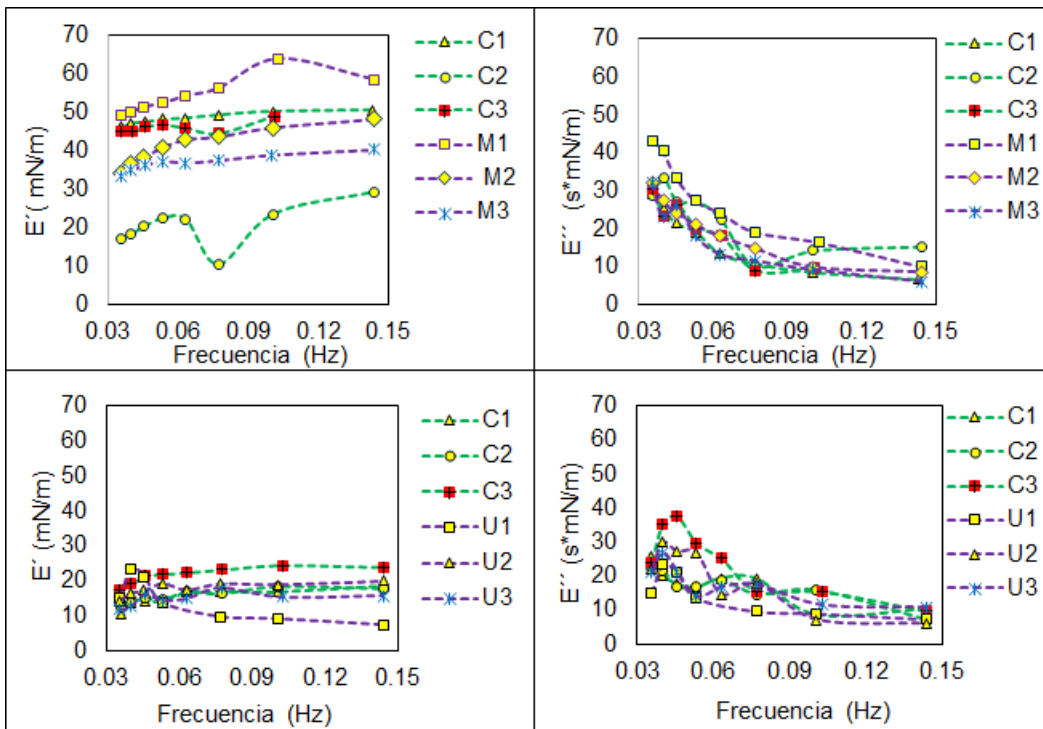


Figura 3.4. Módulo elástico y viscoso dilatacional de las proteínas obtenidas por los tratamientos control-microondas (A1-A2), control-ultrasonido (B1-B2) adsorbidos en la interfase aire-agua con una concentración al 0.1%.

En comparación con los tratamientos control y microondas, las variaciones del módulo de almacenamiento entre réplicas de un mismo tratamiento y a una misma frecuencia, se pueden también atribuir a las diferencias en las propiedades viscoelásticas en la superficie que pudieran tener cada proteína del conjunto de la fracción obtenida (ejemplos: globulinas, albúminas, subunidades, isomorfos), a la presencia de impurezas (carbohidratos o cenizas), como por la heterogeneidad en el tamaño de partícula. No obstante, la caracterización detallada de las proteínas recuperadas no fue el objetivo del presente trabajo.

Como se muestra en el Cuadro 3.16 para el tratamiento control y microondas el módulo elástico tendió a incrementarse y el viscoso a disminuir cuando la frecuencia de la deformación se aumentó, aunque por la variabilidad analítica las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el módulo viscoso.

Cuadro 3.16. Módulos elásticos ( $E'$ ), viscosos  $E''$  y  $\tan \phi$ , para los tratamientos control y microondas a diferentes frecuencias de la fracción de proteínas (0.1%).

Frecuencia (Hz)	Control	Microondas	Control	Microondas	Control	Microondas
	$E'$ (mN/m)		$E''$ (s mN/m)		$\tan \phi$	
0.036	36.26 <sup>a,1</sup> ± 16.41	38.93 <sup>a,1</sup> ± 9.02	29.52 <sup>a,2</sup> ± 0.88	35.69 <sup>a,2</sup> ± 6.27	0.99 <sup>c,3</sup> ± 0.59	0.92 <sup>a,3</sup> ± 0.05
0.040	36.89 <sup>a,1</sup> ± 16.01	40.62 <sup>a,1</sup> ± 8.29	27.33 <sup>ab,2</sup> ± 5.36	30.34 <sup>ab,2</sup> ± 9.07	0.95 <sup>c,3</sup> ± 0.74	0.74 <sup>b,3</sup> ± 0.07
0.045	38.04 <sup>a,1</sup> ± 15.35	41.97 <sup>a,1</sup> ± 8.27	24.86 <sup>ab,2</sup> ± 2.96	27.88 <sup>ab,2</sup> ± 4.84	0.78 <sup>c,3</sup> ± 0.48	0.67 <sup>b,3</sup> ± 0.02
0.053	39.13 <sup>a,1</sup> ± 14.47	43.50 <sup>a,1</sup> ± 7.90	22.20 <sup>ab,2</sup> ± 4.52	22.15 <sup>abc,2</sup> ± 4.73	0.68 <sup>c,3</sup> ± 0.47	0.51 <sup>c,3</sup> ± 0.02
0.063	38.88 <sup>a,1</sup> ± 14.56	44.67 <sup>a,1</sup> ± 8.83	18.00 <sup>bc,2</sup> ± 4.48	18.50 <sup>bc,2</sup> ± 5.49	0.56 <sup>c,3</sup> ± 0.40	0.41 <sup>cd,3</sup> ± 0.04
0.077	34.86 <sup>a,1</sup> ± 21.14	45.76 <sup>a,1</sup> ± 9.60	9.98 <sup>c,2</sup> ± 1.03	15.18 <sup>bc,2</sup> ± 3.81	0.46 <sup>c,3</sup> ± 0.44	0.33 <sup>de,3</sup> ± 0.02
0.101	40.87 <sup>a,1</sup> ± 15.00	49.6 <sup>a,1</sup> ± 12.87	10.81 <sup>c,2</sup> ± 3.08	11.84 <sup>c,2</sup> ± 4.00	0.32 <sup>c,3</sup> ± 0.25	0.24 <sup>ef,3</sup> ± 0.02
0.144	42.81 <sup>a,1</sup> ± 11.79	49.00 <sup>a,1</sup> ± 9.08	9.46 <sup>c,2</sup> ± 5.15	8.23 <sup>c,2</sup> ± 2.03	0.26 <sup>c,3</sup> ± 0.23	0.17 <sup>f,3</sup> ± 0.01

± Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias. <sup>1, 2, 3</sup> Exponentes en una misma fila, para una misma propiedad y con igual número, indica que no hay diferencias significativas entre medias.

Se observó una tendencia similar para los módulos viscosos y elásticos con el tratamiento control y ultrasonido, aunque el cambio no fue estadísticamente significativo (Cuadro 3.17). El aumento del módulo elástico posiblemente se debe a que en los ciclos de compresión-expansión a bajas frecuencias, las moléculas de tensoactivo tienen suficiente tiempo para disminuir el gradiente de tensión superficial resultante de la deformación, pero al aumentar la frecuencia, la restauración de la tensión de la interfase llega a ser más lenta en comparación con el rápido cambio del área de interfase, conduciendo a mayores gradientes de tensión de superficie y con ello valores más altos de  $E'$ , como fue sugerido previamente por Fuentes-Prado y Martínez-Padilla (2014).

Cuadro 3.17. Módulos elásticos (E'), viscosos (E'') y tan  $\phi$ , para los tratamientos control y ultrasonido a diferentes frecuencias de la fracción de proteínas (0.1%).

	Control	Ultrasonido	Control	Ultrasonido	Control	Ultrasonido
Frecuencia (Hz)	E' (mN/m)		E''(s mN/m)		tan $\phi$	
0.036	13.43 <sup>a,1</sup> ± 3.46	12.26 <sup>a,1</sup> ± 1.79	24.13 <sup>b,2</sup> ± 1.67	19.47 <sup>ab,2</sup> ± 3.84	1.88 <sup>a,3</sup> ± 0.52	1.58 <sup>ab,3</sup> ± 0.20
0.038	15.5 <sup>a,1</sup> ± 3.03	13.32 <sup>a,1</sup> ± 2.82	25.74 <sup>b,2</sup> ± 8.25	23.99 <sup>a,2</sup> ± 7.87	1.64 <sup>ab,3</sup> ± 0.19	1.78 <sup>a,3</sup> ± 0.35
0.044	16.84 <sup>a,1</sup> ± 3.84	15.28 <sup>a,1</sup> ± 2.27	24.03 <sup>b,2</sup> ± 11.70	23.97 <sup>a,2</sup> ± 3.12	1.38 <sup>abc,3</sup> ± 0.34	1.58 <sup>ab,3</sup> ± 0.25
0.051	16.79 <sup>a,1</sup> ± 4.41	15.83 <sup>a,1</sup> ± 3.00	21.06 <sup>b,2</sup> ± 7.47	20.74 <sup>ab,2</sup> ± 6.48	1.24 <sup>abc,3</sup> ± 0.11	1.30 <sup>abc,3</sup> ± 0.29
0.060	18.65 <sup>a,1</sup> ± 3.23	15.08 <sup>a,1</sup> ± 2.23	21.14 <sup>b,2</sup> ± 3.47	15.03 <sup>ab,2</sup> ± 1.66	1.13 <sup>bcd,3</sup> ± 0.02	1.01 <sup>bcd,3</sup> ± 0.14
0.077	18.78 <sup>a,1</sup> ± 3.79	17.22 <sup>a,1</sup> ± 2.33	16.45 <sup>b,2</sup> ± 2.40	14.98 <sup>ab,2</sup> ± 4.61	0.90 <sup>cd,3</sup> ± 0.23	0.86 <sup>cd,3</sup> ± 0.17
0.101	19.89 <sup>a,1</sup> ± 4.00	16.47 <sup>a,1</sup> ± 2.14	13.33 <sup>b,2</sup> ± 4.01	9.24 <sup>b,2</sup> ± 2.21	0.67 <sup>cd,3</sup> ± 0.18	0.58 <sup>d,3</sup> ± 0.19
0.144	20.11 <sup>a,1</sup> ± 3.29	17.28 <sup>a,1</sup> ± 2.14	9.07 <sup>b,2</sup> ± 1.81	8.09 <sup>b,2</sup> ± 2.54	0.45 <sup>d,3</sup> ± 0.09	0.48 <sup>d,3</sup> ± 0.20

± Desviación estándar. Exponentes en una columna con la misma letra indica que no hay diferencia significativa entre medias. <sup>1, 2, 3</sup> Exponentes en una misma fila, para una misma propiedad y con igual número indica que no hay diferencias significativas entre medias.

A medida que aumentó la frecuencia, tan  $\phi$  tendió a disminuir para el tratamiento control-microondas y control-ultrasonido, este cambio fue estadísticamente significativo excepto para el control del microondas, debido a la variabilidad de las propiedades viscoelásticas. No obstante, en los tratamientos control y microondas el módulo elástico predominó sobre el viscoso en todo el intervalo de frecuencia, mientras que en los tratamientos control y ultrasonido después de 0.060 Hz (tan  $\phi$  < 1), lo que cual implica que la dispersión almacena gran parte de la energía deformándose elásticamente y disipa energía fluyendo como líquido.

El módulo elástico del control de la muestra 1(Cuadro 3.16) fue significativamente superior en todas las frecuencias al control de la muestra 2 (Cuadro 3.17), y también es de notar que en todas las frecuencias evaluadas predominó el comportamiento elástico (tan  $\phi$  < 1), la diferencias en la magnitud también se pueden visualizar más

fácilmente en la Figura 3.4 (A1: 37.60 a 45.91 mN /m; B1: 12.85 a 18.70 mN /m). Por lo cual, una pulpa de coco dura o de más alta madurez probablemente genera un comportamiento elástico mayor, con respecto a la pulpa de coco blanda con más baja madurez, y proteínas con inferior pureza, es decir, la madurez podría influir en las propiedades viscoelásticas, pero también, las proteínas con la menor pureza, las cuales tuvieron una menor concentración neta en la dispersión que pudiera contribuir al módulo elástico, de allí el descenso de su magnitud, A1 con respecto a B1 (Figura 3.4).

Al comparar a una misma frecuencia los módulos elásticos, viscosos y  $\tan \phi$  entre los tratamientos alternos y su control, se evidenció que no existía diferencia que pudiera ser estadísticamente significativa, por lo cual, los tratamientos alternos no tuvieron un efecto en las propiedades viscoelásticas de las proteínas en la superficie. No obstante, debido a sus propiedades viscoelásticas con un mayor comportamiento elástico le pudiera llegar a conferir a las emulsiones mayor estabilidad.

## CONCLUSIONES

Los tratamientos alternativos aumentaron el rendimiento de extracción de aceite y de proteína total en la crema de coco. La extracción asistida por microondas generó el más alto rendimiento de aceite (81.9%) en comparación el método de extracción húmeda (64.71%) o asistida por ultrasonido (70.14%), por lo cual, podría mejorar la eficiencia de los procesos industriales para separar simultáneamente aceite y proteína total con una mayor pureza (53.8%).

Los métodos húmedos asistidos incrementaron el contenido de fenoles en la crema, por lo tanto, debido a sus propiedades antioxidantes probablemente podrán aumentar el efecto protector de la oxidación del aceite o de la proteína y mejorar su calidad nutricional y de conservación.

La fracción de proteínas obtenidas por molienda húmeda o asistida aumentó la presión superficial, por lo que pueden utilizarse como agentes de superficie activa para la formulación de sistemas dispersos en alimentos. También presentaron propiedades viscoelásticas en las que predominó el comportamiento elástico que puede dar estabilidad cinética en los sistemas dispersos.

## RECOMENDACIONES

Dado que los tratamientos alternos son una combinación del método control más la aplicación de la radiación microondas o ultrasonido, se recomienda optimizar el método control de molienda húmeda por inmersión para reducir la polidispersidad en el tamaño de partícula de la emulsión de leche de coco. Por lo que se puede considerar realizar un tamizado de la pulpa de coco a diferentes contenidos de humedad, variar el tiempo de molienda de la mezcla pulpa de coco y/o la relación de agua.

Por otro lado, puesto que en el presente trabajo se utilizó hexano con el fin de cuantificar el máximo potencial de extracción de aceite de la crema de coco, se recomienda evaluar métodos alternos sin utilizar solventes, como la aplicación de la centrifugación o cambios de temperatura para desestabilizar la crema.

La clasificación de los fenoles y los cambios en las propiedades fisicoquímicas del aceite también deben ser evaluados en futuros estudios.

Se recomienda evaluar la técnica de precipitación isoeléctrica para la purificación de las proteínas y su efecto en las propiedades de superficie, así como esclarecer la concentración de cada proteína en la fracción obtenida.

## REFERENCIAS

- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S., Khan, M., Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 984–990.
- Agarwal, R. K., & Bosco, S. J. (2013). Optimization of aqueous extraction of virgin coconut oil using response surface methodology. *Cord (APPC)*, 29, 35–45. Retrieved April 19, 2019, from <https://library.apccsec.org/paneladmin/doc/20170814061442Ravindra%20Kumar.pdf>
- Ahmad, Z., Hasham, R., Aman Nor, N. F., & Sarmidi, M. R. (2015). Physico-chemical and antioxidant analysis of virgin coconut oil using West African tall variety. *Journal of Advanced Research in Materials Science*, 13, 1–10.
- Algar, A. F. C., & Mabesa, L. B. (2015). Isolation and partial characterization of a low molecular weight antimicrobial protein from coconut (*Cocos nucifera L.*) milk. *International Food Research Journal*, 22, 1813–1816.
- Almeida, B., Valli, E., Bendini, A., & Gallina Toschi, T. (2017). Semi-industrial ultrasound-assisted virgin olive oil extraction: impact on quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119, 1–7.
- Angelia, M. R., Garcia, R., Caldo, K. M. P., Prak, K., Utsumi, S., & Tecson-Mendoza, E. M. (2010). Physicochemical and functional characterization of Cocosin, the coconut 11S globulin. *Food Science and Technology Research*, 16, 225–232.
- AOAC. (2012). *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemist* (19th ed.). Washington, DC.
- ASTME 799-03. (2015). *Standard practice for determining data criteria and processing for liquid drop size analysis* (pp. 1–5). pp. 1–5. West Conshohocken: ASTM International.
- Baldursdottir, S. G., Fullerton, M. S., Nielsen, S. H., & Jorgensen, L. (2010). Adsorption of proteins at the oil/water interface-observation of protein adsorption by interfacial shear stress measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 41–46.
- Barrios, M. A. (1991). *Optimización y escalamiento de un proceso enzimático para la obtención de aceite de coco*. Tesis de Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bawalan, D. (2011a). Standards for virgin coconut oil. Annex 4. In *Processing Manual for Virgin Coconut Oil, its Products and by-Products for Pacific Island Countries and*



- Territories*. (pp. 108–112). New Caledonia: Secretariat of the Pacific Community.
- Bawalan, D. (2011b). VCO production technologies. Chapter 4. In *Processing Manual for Virgin Coconut Oil, its Products and by-Products for Pacific Island Countries and Territories* (pp. 17–27). New Caledonia: Secretariat of the Pacific Community.
- Bawalan, D., & Chapman, K. R. (2006). *Virgin Coconut Oil: Production Manual for Micro- and Village-scale Production*. (Annex 1, pp. 82–84). Bangkok, Thailand: Thammasat Press Co. Ltd.
- Benjamins, J., & Lucassen-Reynder, E. (2009). Interfacial rheology of adsorbed protein layers. In R. Miller & L. Liggieri (Eds.). *Interfacial Rheology* (pp. 254–297). Boston: Brill, Leiden.
- Beverung, C. J., Radke, C. J., & Blanch, H. W. (1999). Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry*, 81, 59–80.
- Bewley, J. D., & Black, M. (1985). Seeds. In J. Bewley (Ed.). *Seeds. Physiology of Development and Germination* (1st ed., pp. 1–27). Boston: Springer.
- Bos, M. A., & Van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91, 437–471.
- Chambal, B., Bergenståh, B., & Dejmek, P. (2014). Heat induced gels from coconut press cake proteins. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 562–570.
- Chanioti, S., & Tzia, C. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology. *Food Science and Technology*, 79, 178–179.
- Che Man, Y. B., Suhardiyono, Asbi, A. B., Azudin, M. N., & Wei, L. S. (1996). Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 683–686.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835.

- Ciriminna, R., Carnaroglio, D., Delisi, R., Arvati, S., Tamburino, A., & Pagliaro, M. (2016). Industrial feasibility of natural products extraction with microwave technology. *Chemistry Select*, *1*, 549–555.
- Mc Clements, M. (2004). The rheology of emulsion-based food products. In B. McKenna (Ed.), *Texture in Food: Solid Foods* (Vol. 2, pp. 3–28). Amsterdam: Elsevier.
- Clodoveo, M. (2019). Industrial ultrasound applications in the extra-virgin olive oil extraction process: history, approaches, and key questions. *Foods*, *8*, 121; doi:10.3390/foods8040121
- Comisión de Codex Alimentarius. (2015). Norma para aceites vegetales especificados CODEX STAN 210-1999. *Codex Alimentarius*, pp. 1–14. Retrieved August 05, 2019, from [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ah\\_UKEwi\\_I7md46PkAhVO1qwKHXhdCoEQFjABegQIABAC&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org%2Finput%2Fdownload%2Fstandards%2F336%2FCXS\\_210s\\_2015.pdf&usg=AOvVaw2oEBhhmpXhO80wEdirZfQQ](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ah_UKEwi_I7md46PkAhVO1qwKHXhdCoEQFjABegQIABAC&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org%2Finput%2Fdownload%2Fstandards%2F336%2FCXS_210s_2015.pdf&usg=AOvVaw2oEBhhmpXhO80wEdirZfQQ)
- Consejo Oleico Internacional (COI). (2009). Determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC. *COI/T.20/Doc.N°29*, pp. 1–8. Retrieved March 14, 2019, from [www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4142-met29esp%0A%0A](http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4142-met29esp%0A%0A)
- Cornec, M., Cho, D., & Narsimhan, G. (1999). Adsorption dynamics of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin at air – water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, *214*, 129–142.
- Dayrit, F. M. (2015). The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *92*, 1–15.
- de Mello, B. T. F., dos Santos Garcia, V. A., & da Silva, C. (2017). Ultrasound-assisted extraction of oil from Chia (*Salvia hispánica L.*) seeds: optimization extraction and fatty acid profile. *Journal of Food Process Engineering*, *40*, 1–8.
- Dia, V. P., Garcia, V. V., Mabesa, R. C., & Tecson-Mendoza, E. M. (2005). Comparative physicochemical characteristics of virgin coconut oil produced by different methods. *The Philippine Agricultural Scientist*, *88*, 462–475.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, *17*, 25–39.
- Edem, E. V., & Elijah, A. I. (2016). Optimization of Coconut (*Cocos nucifera*) milk extraction using response surface methodology. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, *5*, 384–394.

- Ekezie, F. G. C., Sun, D. W., & Cheng, J. H. (2017). Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: a review of latest developments. *Trends in Food Science & Technology*, *67*, 160–172.
- FAOSTAT. (2014). Production quantity of oil coconut. Retrieved March 6, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>
- FAOSTAT. (2017). Production quantity, area harvested and yield of coconut. Retrieved March 6, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>
- Fuentes-Prado, E., & Martínez-Padilla, L. (2014). Colloidal stability and dilatational rheology at the air–water interface of peptides derived from thermal-acidic treated wheat gluten. *Food Hydrocolloids*, *41*, 210–218.
- Granados-Sánchez, D., & López-Ríos, G. F. (2002). Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, *8*, 39–48.
- Gude, V. G. (2015). Synergism of microwaves and ultrasound for advanced biorefineries. *Resource-Efficient Technologies*, *1*, 116–125.
- Hadjittofis, E., Das, S. C., Zhang, G. G. Z., & Heng, J. Y. Y. (2017). Interfacial phenomena. In Y. Qiu, Y. Chen, G. G. Zhang, L. Yu, & R. V. Mantri (Eds.). *Developing Solid Oral Dosage forms: Pharmaceutical Theory and Practice* (2nd ed., pp. 225–252). Amsterdam: Elsevier.
- Harzallah, A., Bhourri, A. M., Amri, Z., Soltana, H., & Hammami, M. (2016). Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, *83*, 255–267.
- Herrera, M. (2012). Methods for stability studies. In R. Hartel, C. Peter, D. Rodriguez-Lazaro, & D. Topping (Eds.). *Analytical Techniques for Studying the Physical Properties of Lipid Emulsions* (pp. 15–60). New York: Springer.
- Huang, J., Liu, X. Q., Lan, Q., Lai, X., Luo, Z., & Yang, G. W. (2016). Proteomic profile of coconuts. *European Food Research and Technology*, *242*, 449–455.
- IndexMundi. (2018). Coconut oil production by country in 1000 MT. Retrieved March 6, 2019, from <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=coconut-oil&graph=production>
- Iswarin, S. J., & Permadi, B. (2012). Coconut milk' s fat breaking by means of ultrasound. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, *12*, 1–5.

- Jadhav, A. J., Holkar, C. R., Goswami, A. D., Pandit, A. B., & Pinjari, D. V. (2016). Acoustic cavitation as a novel approach for extraction of oil from waste date seeds. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *4*, 4256–4263.
- Jiang, Z., Li, Y., Han, Y., Teng, W., Zhang, Z., Sun, D., & Li, W. (2010). Identification of QTL underlying the filling rate of protein at different developmental stages of soybean seed. *Euphytica*, *175*, 227–236.
- Jin, T., Wang, C., Zhang, C., Wang, Y., Chen, Y.-W., Guo, F., Howard, A., Cao, M.-J., Fu, T.-J., McHugh, T., Zhang, Y. (2017). Crystal structure of Cocosin, a potential food allergen from coconut (*Cocos nucifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 7560–7568.
- Juliano, P., & Knoerzer, K. (2016). Application of megasonic waves for enhanced aqueous separation of oils. In K. Knoerzer, P. Juliano, & G. W. Smithers (Eds.). *Innovative Food Processing Technologies* (pp. 113–132). Amsterdam: Elsevier.
- Karbaschi, M., Lotfi, M., Krägel, J., Javadi, A., Bastani, D., & Miller, R. (2014). Rheology of interfacial layers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *19*, 514–519.
- Khoei, M., & Chekin, F. (2016). The ultrasound-assisted aqueous extraction of rice bran oil. *Food Chemistry*, *194*, 503–507.
- Kindermann, M., Weisa, K., Lippert, C., & Müllera, J. (2007). *Economic analysis of different processing methods for small-scale coconut oil production in the Philippines*. Conference on International Agricultural Research for Development. Germany: University of Kassel-Witzenhausen and University of Göttingen.
- Kumar, P. P., & Krishna, A. G. (2015). Physicochemical characteristics of commercial coconut oils produced in India. *Grasas y Aceites*, *66*, 1–8.
- Kwon, K., Park, K. H., & Rhee, K. C. (1996). Fractionation and characterization of proteins from coconut (*Cocos nucifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 1741–1745.
- Lad, V. N., & Murthy, Z. V. (2012). Enhancing the stability of oil-in-water emulsions emulsified by coconut milk protein with the application of acoustic cavitation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *51*, 4222–4229.
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: introduction. In K. G. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.). *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1543–1580). Berlin: Springer.
- Li, X., Martínez-Padilla, L. P., Xu, X.-Q., Zisu, B., & Juliano, P. (2018). Heating and

- megasonic interventions for improvement of aqueous-based oil extraction from fresh and cold stored coconut meat. *Journal of Food Engineering*, 222, 93–99.
- Li, Y., Radoui, M., Fabiano-Tixer, A., & Chemat, F. (2013). From laboratory to industry: scale-up, quality, and safety consideration for microwave-assisted extraction. In F. Chemat & G. Cravotto (Eds.). *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* (pp. 207–229). Boston: Springer.
- López-Villalobos, A., Dodds, P. F., & Hornung, R. (2001). Changes in fatty acid composition during development of tissues of coconut (*Cocos nucifera* L.) embryos in the intact nut and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 52, 933–942.
- Mahayothee, B., Koomyart, I., Khuwijitjaru, P., Nagle, M., & Müller, J. (2016). Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. *International Journal of Food Properties*, 19, 2041–2051.
- Mansor, T. T., Che Man, Y. B., Shuhaimi, M., Afiq, M. J., & Narul, F. K. (2012). Physicochemical properties of virgin coconut oil extracted from different processing methods. *International Food Research Journal*, 19, 837–845.
- Marina, A. M., Che Man, Y. B., Nazimah, S. A. H., & Amin, I. (2009a). Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 114–123.
- Marina, A. M., Che Man, Y. B., Nazimah, S. A. H., & Amin, I. (2009b). Chemical properties of virgin coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 301–307.
- Martínez-Padilla, L. P., Franke, L., Xu, X. Q., & Juliano, P. (2018). Improved extraction of avocado oil by application of sono-physical processes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 720–726.
- Mepba, H. D., & Achinewhu, S. C. (2003). Effects of processing on protein quality of milk and milk products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 15–25.
- Mepba, H. D., Achinewhu, S. C., & Ademiluyi, T. (2008). Solubility, emulsion and foaming properties of Coconut (*Cocos Nucifera*) protein concentrates. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 8, 192–203.
- Naik, A., Raghavendra, S. N., & Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Production of coconut protein powder from coconut wet processing waste and its characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 1290–1302.
- Nakajima, M., & Nabetani, H. (2000). Processing of oilseeds to recover oil and protein using

- combined aqueous, enzymatic and membrane separation techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 1–8.
- Nylander, T., Arnebrant, T., Bos, M., & Wilde, P. (2008). Protein / emulsifier interactions. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.). *Food Emulsifiers and Their Application* (pp. 89–171). New York: Springer.
- Onsaard, E., Vittayanont, M., Srigam, S., & Mc Clements, D. J. (2006). Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate. *Food Research International*, 39, 78–86.
- Patil, U., & Benjakul, S. (2017). Characteristics of albumin and globulin from coconut meat and their role in emulsion stability without and with proteolysis. *Food Hydrocolloids*, 69, 220–228.
- Patil, U., Benjakul, S., Prodpran, T., Senphan, T., & Cheetangdee, N. (2017). A comparative study of the physicochemical properties and emulsion stability of coconut milk at different maturity stages. *Italian Journal of Food Science*, 29, 145–157.
- Prades, A., Salum, U. N., & Pioch, D. (2016). New era for the coconut sector. What prospects for research? *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 23, 1–4.
- Quitain, A., Moriyoshi, T., & Goto, M. (2013). Coupling microwave-assisted drying and supercritical carbon dioxide extraction for coconut oil processing. *Chemical Engineering and Science*, 1, 12–16.
- Radiant (2019). Superior manufacturing solutions for premium. Natural products. Retrieved May 7, 2019, from <https://www.radiantinc.com/technology>
- Raghavendra, S. N., & Raghavarao, K. S. M. S. (2010). Effect of different treatments for the destabilization of coconut milk emulsion. *Journal of Food Engineering*, 97, 341–347.
- Rao, S., & Najam, R. (2016). Coconut water of different maturity stages ameliorates inflammatory processes in model of inflammation. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5, 244–249.
- Rethinam, P. (2005). Asian and Pacific Coconut Community activities, achievements and future outlook. In S. W. Adkins, M. A. Foale, & Y. M. S. Samosir (Eds.). *Proceedings of the international coconut forum held in Cairns held in Cairns* (pp. 15–21). Australia: ACIAR.
- Ribeiro, L. G. (2017). The scientific truth about a super functional food denominated coconut oil. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 18, 143–150.
- Rodrigues, S., Pinto, G. A., & Fernandes, F. A. (2008). Optimization of ultrasound extraction

- of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 95–100.
- Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2017). Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. *Food Chemistry*, 241, 364–371.
- Rombaut, N., Tixier, A. S., Bily, A., & Chemat, F. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6, 530–544.
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 402–420.
- Samson, S. J., Cater, C. M., & Mattil, J. F. (1971). Preparation and characterization of coconut protein isolates. *American Association of Cereal Chemists*, 48, 182–190.
- Santos, D. C., Carvalho, L. S., Lima, D. C., Leão, D. J., Teixeira, L. S., & Korn, M. G. (2014). Determination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP OES after ultrasound-assisted extraction procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34, 75–80.
- Seneviratne, K. N., Hapuarachchi, C. D., & Ekanayake, S. (2009). Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. *Food Chemistry*, 114, 1444–1449.
- Seow, C. C., & Gwee, C. N. (1997). Review Coconut milk: chemistry and technology. *International Journal of Food Science and Technology*, 32, 189–201.
- Siddalingaswamy, M., Rayaorth, A., & Khanum, F. (2011). Anti-diabetic effects of cold and hot extracted virgin coconut oil. *Journal of Diabetes Mellitus*, 1, 118–123.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Soria, A. C., Ruiz-Aceituno, L., Ramos, L., & Sanz, L. M. (2015). Microwave assisted extraction of polysaccharide. In G. K. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.). *Polysaccharides: bioactivity and biotechnology* (pp. 987–1008). Switzerland: Springer.
- Srivastava, Y., Semwal, A. D., Majumdar, A., & Y. (2016). Quantitative and qualitative analysis of bioactive components present in virgin coconut oil. *Cogent Food and Agriculture*, 2, 1–13.
- Sulaiman, S., Aziz, A. R., & Aroua, M. K. (2013). Optimization and modeling of extraction of solid coconut waste oil. *Journal of Food Engineering*, 114, 228–234.

- Sun-Waterhouse, D., Thakorlal, J., & Zhou, J. (2011). Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*, 1575–1585.
- Svenia, P., Krishnakumar, I., Ratheesh, M., Asha, S., Sandya, S., & Rajmohan, V. (2017). Polyphenolic fraction of virgin coconut oil inhibits the inflammatory response in oxidized LDL activated human peripheral blood mononuclear cells by modulating TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathways. *European Journal of Integrative Medicine*, *10*, 59–65.
- Tamm, F., Saucer, G., Scampicchio, M., & Drusch, S. (2012). Pendant drop tensiometry for the evaluation of the foaming properties of milk-derived proteins. *Food Hydrocolloids*, *27*, 371–377.
- Tangsuphoom, N., & Coupland, J. N. (2008). Effect of pH and ionic strength on the physicochemical properties of coconut milk emulsions. *Journal of Food Science*, *73*, E274–E280.
- Tangsuphoom, N., & Coupland, J. N. (2009a). Effect of surface-active stabilizers on the surface properties of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids*, *23*, 1801–1809.
- Tangsuphoom, N., & Coupland, J. N. (2009b). Effect of thermal treatments on the properties of coconut milk emulsions prepared with surface-active stabilizers. *Food Hydrocolloids*, *23*, 1792–1800.
- Tec Edmonton (2014). Radient Technologies. An overnight success, 13 years in the making. Retrieved May 7, 2019, from <https://www.tecedmonton.com/radient-technologies-an-overnight-success-13-years-in-the-making/>
- Thaiphanit, S., & Anprung, P. (2016). Physicochemical and emulsion properties of edible protein concentrate from coconut (*Cocos nucifera* L.) processing by-products and the influence of heat treatment. *Food Hydrocolloids*, *52*, 756–765.
- Thaiphanit, S., Schleining, G., & Anprung, P. (2016). Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, *60*, 252–264.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: a clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 100–109.
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 159–178.
- Ybert, C., & di Meglio, J. M. (1998). Study of protein adsorption by dynamic surface tension



measurements: diffusive regime. *Langmuir*, 14, 471–475.

Yoon, S. H., Kim, I. H., Kim, S. H., & Kwon, T. W. (1991). Effects of enzyme treatments and ultrasonification on extraction yields of lipids and protein from soybean aqueous process. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 23, 673–676.

Zhang, H. F., Yang, X. H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 672–688.