



Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos

Procesamiento y técnicas de análisis

L. Almilla-Beltrán, P. Buera,
B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo
Compiladoras

 **INTA** Ediciones

Colección
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN

Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos

Procesamiento y técnicas de análisis

*L. Alamilla-Beltrán, P. Buera, B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo
Compiladoras*



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

*INTA Ediciones
Estación Experimental Agropecuaria San Pedro
2022*

66:63 Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos : procesamiento y
Su16 técnicas de análisis / Compiladoras: L. Alamilla-Beltrán...[et al.] –
Buenos Aires : Ediciones INTA, Estación Experimental Agropecuaria
San Pedro, 2022.
295 p. : il. (PDF)

Otros compiladores: P. Buera, B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo

ISBN 978-987-679-329-2 (digital)

i. Alamilla-Beltrán, L. ii. Buera, María del Pilar. iii. Camacho-Díaz, B.H. iv.
Gabilondo, J.

AGROINDUSTRIA – SUBPRODUCTOS – TECNOLOGIA – PROCESAMIENTO

DD-INTA

Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899.

Se enmarca dentro del Programa Nacional de Agroindustria y agregado de valor y el Proyecto Específico 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios”.

Fue elaborado con la inestimable colaboración del Programa CYTED.

Diseño de tapa y diagramación:

Mariana Piola
Fedra Albarracín

*Este libro
cuenta con licencia*



Contenidos

Parte 1. Aprovechamiento de subproductos agroindustriales y disminución de pérdidas	7
Capítulo 1: Valorización de residuos de aguacate	8
Capítulo 2: Importancia de los fotoquímicos en los residuos de aguacate	18
Capítulo 3: Descartes de flores comestibles como fuente de compuestos bioactivos: caso rosas	26
Capítulo 4: Revalorización del suero de quesería. Productos lácteos funcionales	35
Capítulo 5: Desarrollo de biopolímeros innovadores a partir de residuos naturales	47
Capítulo 6: Ejemplo de proyecto de extensión: Negocio logístico para la cadena para la cadena hortofrutícola de pequeños parceleros en la región de Azúcar Buena, Valledupar, Colombia	59
Parte 2. Valorización de recursos regionales	66
Capítulo 7: Aprovechamiento de flores comestibles de la región como fuente de compuestos bioactivos: caso tagetes	67
Capítulo 8: Biomoléculas provenientes de la semilla de chíca: características y potencial aplicación en alimentos	75
Capítulo 9: Revalorización de la quinua y sus aplicaciones en la industria	95
Capítulo 10: Aplicaciones tradicionales y potenciales de recursos de bosques tropicales, y de cuatro especies en particular	105
Capítulo 11: Aprovechamiento y análisis de fuentes lácteas no convencionales para el desarrollo de alimentos innovadores	115
Capítulo 12: Alternativas para ampliar el potencial de gomas de fuentes regionales	128
Capítulo 13: Uso de hidrocoloide no convencional como modificador de viscosidad y textura: goma espina corona	137
Parte 3. Herramientas tecnológicas y analíticas	150
Capítulo 14: Optimización de la molienda de algarrobo para fomentar el uso no maderable de fuentes autóctonas. Aplicaciones alimentarias	151
Capítulo 15: Extrusión para el desarrollo de alimentos innovadores: Caso de productos a base de maíz	160
Capítulo 16: Evaluación de cambios fisicoquímicos en fibras de agave obtenidas por organosolv asistido por microondas	175
Capítulo 17: Reología y Textura. Aplicación en Productos Lácteos	187
Capítulo 18: Calorimetría diferencial de barrido como herramienta para promover el aprovechamiento de subproductos y recursos naturales	212
Capítulo 19: Encapsulación de compuestos bioactivos: métodos y caracterización	230
Capítulo 20: Técnicas de análisis microestructural de alimentos: análisis digital de imágenes en microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de barrido láser	252
Capítulo 21: Evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos en alimentos funcionales: modelos de digestión in vitro	265
Capítulo 22: Nuevas técnicas para la búsqueda de actividad antioxidante en mezclas naturales con aplicación en alimentos	276
Capítulo 23: Uso de herramientas estadísticas en el diseño experimental para el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios	284

Parte 3

Herramientas tecnológicas y analíticas

Capítulo 23

Uso de herramientas estadísticas en el diseño experimental para el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios

Víctor Manuel Zamora-Gasga¹, Abraham Wall-Mercado², Gustavo Adolfo González-Aguilar³, Antonio Segura-Carretero⁴, Sonia G. Sáyago Ayerdi^{1*}

¹Tecnológico Nacional de México, Campus Tepic, Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, División de Estudios de Posgrado, Nayarit. México.
*ssayago@ittpic.edu.mx; sonia.sayago@gmail.com

²Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Instituto de Ciencias Biomédicas, Chihuahua, México.

³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD-Hermosillo) Coordinación de Antioxidantes y Alimentos Funcionales. Hermosillo Sonora. México

⁴Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica. España

Resumen

El aprovechamiento de subproductos agroalimentarios es un área que presenta en la actualidad un gran auge, por el alto contenido de compuestos bioactivos que pueden llegar a presentar. A partir de los subproductos se pueden obtener compuestos de interés funcional para su utilización en la formulación de nuevos productos. El uso de herramientas estadísticas cobra un interés fundamental en el diseño experimental de procesos, que incluyen el mayor número de factores que puedan afectar la fabricación o desarrollo de un alimento. En este capítulo se aborda de manera sencilla algunas herramientas estadísticas que pueden utilizarse en el diseño de experimentos para el aprovechamiento de un subproducto agroalimentario, su óptimo uso, así como las ventajas y desventajas que puede presentar la aplicación de estas herramientas.

1. Introducción

Los alimentos industrializados comúnmente se formulan con mezclas de ingredientes, los cuales son transformados en una serie de pasos complejos. Cada una de estas operaciones unitarias está definida por muchos factores con efectos sinérgicos o antagónicos, que impactan la calidad del producto final. Esto conlleva a que los tecnólogos en alimentos manipulen a nivel piloto uno o varios factores, utilizando diseños experimentales dirigidos a obtener resultados óptimos con el mínimo tiempo y recurso (1). La Figura 1, ilustra cómo diversos factores "controlables" (X_1, X_2, X_3, X_4) interaccionan con otros "no controlables" ("ruido", Z_1, Z_2, Z_3, Z_4), ambos impactan en diversas variables o características (Y_1, Y_2, Y_3, Y_4) del producto final. La correcta selección de un diseño experimental depende de varios factores como son: la etapa de desarrollo del producto, la intención del investigador, la viabilidad del(os) experimento(s) o la rentabilidad comercial. Así, de acuerdo con los objetivos de un experimento, estos diseños se pueden clasificar como diseños de selección o tamizaje y diseños de optimización. En los siguientes párrafos se comentan las ventajas y desventajas de algunos diseños experimentales (Tabla 1), sus características (Secciones 2 y 3), algunas consideraciones teóricas para su uso (Sección 4) y algunos ejemplos de su aplicación en el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios (Sección 5).

2. Diseños de selección o tamizaje

La forma más sencilla de resolver problemas en el procesamiento y desarrollo de alimentos es enfocarse en un solo factor a la vez. La definición de "factor" y otros términos comúnmente utilizados en diseño de experimentos se describen en el Apéndice 1. Si bien el diseño de un solo factor a la vez puede parecer una forma ordenada y lógica del análisis de factores, realmente este tipo de diseño es altamente ineficiente y puede producir resultados poco precisos pues se asume que las interacciones entre las variables no son importantes o inexistentes (2). Por esto, la naturaleza multivariada en el desarrollo de un alimento industrializado, justifica el uso de diseños experimentales en los que se evalúa más de un factor.

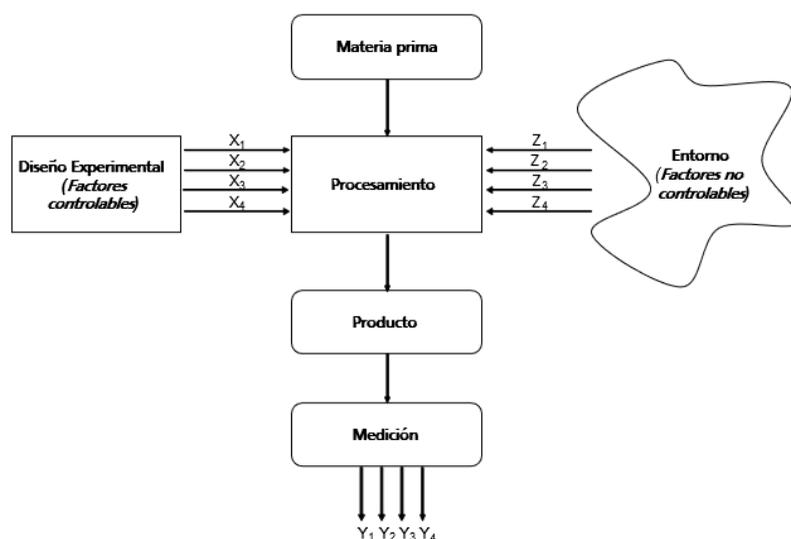


Figura 1. Fundamento de los diseños experimentales: Modelo de la caja negra

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diseños experimentales

Métodos de diseño de experimentos	Ventajas	Desventajas
Un factor a la vez	Fácil de usar y simple de entender.	No se pueden tener en cuenta las posibles interacciones entre las variables El número de corridas / muestras aumenta significativamente al aumentar el número de variables.
Factorial completo	Permite el estudio completo de las interacciones y efectos cuadráticos dentro de las variables. Permite el estudio de algunas interacciones y efectos cuadráticos dentro de variables.	El número de corridas / muestras aumenta significativamente al aumentar el número de variables. El número de corridas/muestras aumenta significativamente al aumentar el número de variables
Factorial fraccionado y Box-Behnken	Número reducido de corridas/muestras, en comparación con los diseños factoriales completos Diseños experimentales para factoriales de dos niveles están disponibles.	El grado de complejidad aumenta con el número para niveles Sistemas de nivel mixto requieren diseños complejos Los diseños factoriales fraccionarios con un alto grado de alias pueden resultar en una alta colinealidad entre las variables.
Diseño de Mezclas	Útil en el desarrollo de formulaciones ya que permite obtener un valor óptimo utilizando superficie de respuesta. Reducción significativa en el número de corridas / muestra.	En el desarrollo de la formulación no es posible incluir variables del proceso.
Diseños Taguchi	Optimización de las variables del proceso con la relación señal/ruído.	El diseño solo es útil para identificar un efecto principal significativo y no considera ningún efecto de interacción de dos factores.
Factorial completo de dos niveles.	El efecto principal y la interacción de factores pueden ser identificados.	El incremento del número de factores lleva al incremento geométrico del número de prueba. Por lo tanto, el diseño no es factible para seleccionar más de dieciséis factores.
Factorial fraccionado de dos niveles.	Se necesita menos número de ensayos experimentales en comparación con el diseño factorial completo para el mismo número de factores.	El efecto de las interacciones de los factores es muy limitado y puede estar mal orientado ya que no hay una medición del error en este diseño.
Diseño de Plackett-Burman	Se pueden examinar un gran número de variables con muy pocos ensayos experimentales.	El diseño solo es útil para identificar un efecto principal significativo y no considera ningún efecto de interacción de dos factores.

Así, los diseños de selección o tamizaje son útiles en la detección de los factores más influyentes y sus interacciones, ya que es claro que, aunque exista una gran cantidad de factores en el procesamiento de alimentos, no todos influyen en las variables respuesta. Este tipo de diseños puede examinar factores cualitativos, cuantitativos o un combinación de ellos (3).

2.1. Diseños factoriales completos

Los sistemas alimentarios, en la mayoría de los casos, son de naturaleza multivariable, con características sensoriales individuales derivados de procesos con diferentes variables a controlar. Los diseños factoriales completos son diseños equilibrados y ortogonales, que permiten la estimación de todos los factores principales y de la interacción de sus niveles (Ver definiciones en Apéndice 1) lo que implica un gran número de puntos de diseño o muestras(4). El número de experimentos a realizar se determina de acuerdo a la Ec (1):

$$n = m^k \quad \text{Ec (1)}$$

donde "n" es el número total de muestras, "k" es el número de factores y "m" es el número de niveles de cada factor(5). Los diseños factoriales pueden estudiar más de un factor en dos o más niveles. El número de factores y el número de niveles de cada factor se utilizan para clasificar los diseños factoriales. Por ejemplo, un diseño factorial de 2 X 2 significa que tiene dos factores cada uno en dos niveles y un diseño factorial de 2 X 2 X 2, significa que tiene tres factores cada uno con dos niveles. Es claro que el número de muestras aumenta exponencialmente con el aumento en el número de factores y sus niveles, lo que hace que sea extremadamente costoso realizar tales experimentos. Por ejemplo, el perfil sensorial de un producto alimenticio con cuatro variables independientes, cada una con un nivel bajo, medio y alto requerirá la evaluación de 81 muestras diferentes.

En la práctica los diseños factoriales completos más utilizados son los de dos niveles, y se utilizan para fines de selección proporcionando efectos principales e interacciones de los factores considerados con menos corridas. Para ilustrar lo anterior, la Tabla 2 muestra un diseño con tres factores y dos niveles sin replicas, se contabilizan o producen ocho 'tratamientos' (Ver definiciones en Apéndice 1). Una vez identificados los principales factores, estos se estudian con mayor detalle utilizando diseños experimentales que contienen factores con niveles más altos.

Tabla 2. Diseño factorial completo

Tratamiento	Factor			Efecto del parámetro
	A	B	C	
1	Alto	Bajo	Bajo	A (principal)
2	Bajo	Alto	Bajo	B (principal)
3	Bajo	Bajo	Alto	C (principal)
4	Alto	Alto	Bajo	AB (Interacción)
5	Alto	Bajo	Alto	AC (Interacción)
6	Bajo	Alto	Alto	BC (Interacción)
7	Alto	Alto	Alto	ABC (Interacción)
8	Bajo	Bajo	Bajo	I (Elemento de identidad)

2.2. Diseños factoriales fraccionados

En la etapa inicial de cualquier estudio, parece ser una buena alternativa un diseño factorial completo. Sin embargo, los diseños factoriales que involucran una gran cantidad de experimentos, no son económica ni prácticamente viables. Es así, que a menudo se utiliza una fracción del diseño factorial completo para obtener la información deseada. Los diseños factoriales fraccionados con dos niveles contiene solo una fracción del diseño factorial completo. En un diseño factorial fraccionado con dos niveles, el número de experimentos está dado por la Ec (2):

$$n = 2^{k-p} \quad \text{Ec(2)}$$

donde "p" representa la cantidad de veces que el diseño se reduce a la mitad y la cantidad de generadores de diseño utilizados, y "k" el número de factores(6). Estos diseños pueden considerar el análisis de más de dos factores con más de dos niveles. Si el lector desea profundizar en estos diseños,

se puede consultar los catálogos publicados por Li, Zhang (7) de diseños factoriales fraccionarios de tres niveles, categorizados por el número de corridas y factores. A pesar de que existen múltiples aplicaciones de estos diseños en el área de alimentos, su principal desventaja es que no puedan proporcionar estimaciones claras de los factores principales y de la interacción, ya que algunos de ellos pueden confundirse, según el grado de resolución del diseño experimental(7). El experimentador tendría que elegir en realizar un mayor número de experimentos, lo que implica utilizar una mayor cantidad de recursos para obtener un conocimiento profundo del experimento en contraposición, a obtener los efectos principales de los factores y sus interacciones.

2.3. Diseños de Plackett-Burman

Este diseño es una variante del diseño fraccionado, se utiliza cuando se desconoce por completo las variables que influyen sobre las características del producto final. Una alternativa para evaluar el efecto de los factores que contribuyen principalmente en el fenómeno (ignorando por completo las interacciones) con un número reducido de experimentos es el diseño de Plackett-Burman (6, 8). Esta herramienta establece un diseño para los factores $N-1$ en N experimentos, ya que N debe ser múltiplo de 4. Cuando el número de experimentos requerido por el diseño no es un múltiplo de 4, se pueden agregar factores imaginarios denominados "factores ficticios" para completar el diseño. Los factores ficticios se definen como variables virtuales, en las que la variación de un nivel a otro no representa un cambio físico(9). Los experimentos a veces se replican para determinar los errores del experimento. Normalmente, el modelo de polinomio de primer orden se ajusta al diseño de Plackett-Burman para estimar los efectos de varios factores (Ver definiciones en **Apéndice 1**). Los factores significativos del modelo estimado pueden ser identificados por análisis de varianza(10).

3. Diseños de optimización

La optimización es otra práctica del diseño experimental que confirma las condiciones óptimas para la obtención de una mejor respuesta. De acuerdo con Box, Hunter (11), el proceso de optimización se realiza después de haber identificado los factores más importantes en el proceso. Algunos de los diseños experimentales utilizados en la optimización son el diseño de Box- Behnken, el central compuesto, diseño de mezclas y diseños de Taguchi.

3.1. Diseño de Box-Behnken (DBB)

En un proceso en el que se han identificado previamente los factores de mayor influencia y se han definido los niveles extremos altos y bajos, es posible optimizar las condiciones para tener mayor respuesta utilizando un diseño de Box Behnken (DBB). El DBB consiste en un diseño factorial fraccionado con tres niveles y un diseño de bloque incompleto (12). La matriz de Box Behnken para tres factores es un diseño esférico y giratorio que, visto en un cubo, consiste en el punto central y los puntos medios de los bordes. En este diseño, todos los factores se estudian con tres niveles, y el número de experimentos necesarios para obtener el modelo se define como $N = 2k(k - 1) + C_0$, donde k es el número de factores y C_0 es el número de puntos centrales (13). Los efectos significativos del DBB en la respuesta pueden ser examinados por análisis de varianza y la respuesta óptima puede determinarse por el modelo de regresión con el cálculo de los parámetros de ajuste del modelo. El diseño central compuesto (se describe en la siguiente sección) tiene más niveles de factor que el DBB, por lo que éste se puede usar como una alternativa económica (14).

3.2. Diseño de mezclas

La formulación del producto final resulta ser una etapa clave en la comercialización de alimentos, y determinar la proporción de mezcla de cada ingrediente involucrado en la formulación resulta ser una tarea difícil. Un diseño experimental que proporciona una solución a esta tarea es el diseño de mezcla. Este diseño se puede utilizar para determinar la proporción de mezcla óptima de ingredientes, que maximice o minimice las propiedades del producto final mediante modelos que pueden ser lineales, cuadráticos o cúbicos (15, 16). Varios estudios están disponibles con respecto al desarrollo de bebidas utilizando un diseño de mezcla. Cabe señalar en este punto que los resultados obtenidos de los estudios

sensoriales de alimentos, proporcionan información importante sobre la calidad y las características de los productos alimenticios que se pueden utilizar en varios aspectos, como el desarrollo de nuevos productos, la comprensión del consumidor, el perfil de sabor y sabor y el control de calidad (4).

3.3. Diseño central compuesto (DCC)

Box y Wilson (17) desarrollaron un diseño experimental que puede ser utilizado para el desarrollo de modelos lineales y cuadráticos que se conoce como DCC. Este es una buena alternativa al diseño factorial completo de tres niveles, ya que proporciona resultados comparables con un número menor de experimentos (4, 18). El DCC generalmente consiste en un diseño factorial completo o un diseño factorial fraccionado con dos niveles, puntos axiales o de estrella adicionales y al menos un punto central del diseño experimental (17). El número de experimentos requerido por este diseño está definido por la Ec (3):

$$n = 2^k + 2k + Co \quad Ec (3)$$

siendo que "k" es el número de factores y "Co" el número de puntos centrales (10). Una de las ventajas de esta herramienta es que se puede realizar de manera preliminar, como un paso para la evaluación de los factores como si se tratara de un diseño factorial completo de dos niveles. Por otra parte, este diseño contempla experimentos con todos los factores en el nivel negativo o positivo, lo cual es una desventaja porque las ejecuciones realizadas en condiciones extremas pueden inducir resultados insatisfactorios (13).

3.4. Diseño Taguchi

El éxito en experimentos y/o tecnología depende principalmente de un proceso o producto diseñado adecuadamente (19). El método de diseño de experimentos de Taguchi es una herramienta estadística simple que incluye un sistema de diseños tabulados (matrices) que permiten estimar un número máximo de efectos principales (ortogonal), con un número mínimo de ejecuciones experimentales (9). En general, propone el uso de diseños factoriales fraccionarios de dos niveles, que forman matrices ortogonales que se designan como L4, L8, L12, L16 y L32, en las que el índice numérico corresponde al número de experimentos que deben realizarse (19). Por ejemplo, la matriz L4 es un diseño factorial fraccional 2^{3-1} , cuyos niveles de la tercera variable están definidos por la relación de generación I = 123 o ABC. La matriz de Taguchi L12 es bastante diferente del diseño de Plackett Burman propuesto para evaluar 11 factores con 12 ensayos. El modelado que se realiza esencialmente relaciona la señal a ruido con las variables de control, en un enfoque de 'solo efecto principal'. Este enfoque permite estudiar problemas de múltiples respuestas y problemas dinámicos, mediante el manejo de factores de ruido (9).

4. Estrategias recomendadas para el uso de un diseño experimental

4.1. Selección del diseño

En la práctica, hay dos tipos de situaciones en las que el uso del diseño experimental en el procesamiento y desarrollo de alimentos es beneficioso. La primera situación es tratar de comprender los principales factores de control en el rendimiento del proceso, y la otra es, medir el valor óptimo para los factores dominantes (4, 10, 13). La Figura 2 ilustra un enfoque de selección de un diseño experimental. Antes de optar por la optimización, es aconsejable utilizar el diseño de cribado en un proceso que ahorrará tiempo y trabajo.

Cuando los números de factor son pequeños, el diseño factorial completo de dos niveles, puede ser la opción para la detectar los factores con mayor relevancia. Pero cuando los números de factor aumentan ($k > 5$), un diseño de Plackett-Burman o un diseño factorial fraccionado, se convierten en la opción para propósitos de detección. Se necesitan ensayos experimentales mínimos en un diseño de Plackett-Burman para detectar los factores impactantes. La segunda situación se presenta cuando entendemos que el rango variable de los factores seleccionados, puede contribuir al rendimiento total de diferentes maneras. El mejor valor para maximizar el rendimiento, es a veces demasiado teórico para lograrlo, de ahí que se haya aplicado el término óptimo. Los estudios de optimización intentan encontrar los niveles

más óptimos de los factores en el procesamiento de alimentos. Para la optimización, la elección de los niveles a investigar es crucial. Los diseños de Taguchi, el diseño central compuesto o el diseño de Box-Behnken se pueden utilizar para la optimización de un número pequeño de factores. Así mismo, es importante considerar que el diseño de Box-Behnken es una alternativa mucho más económica que otros diseños de optimización.

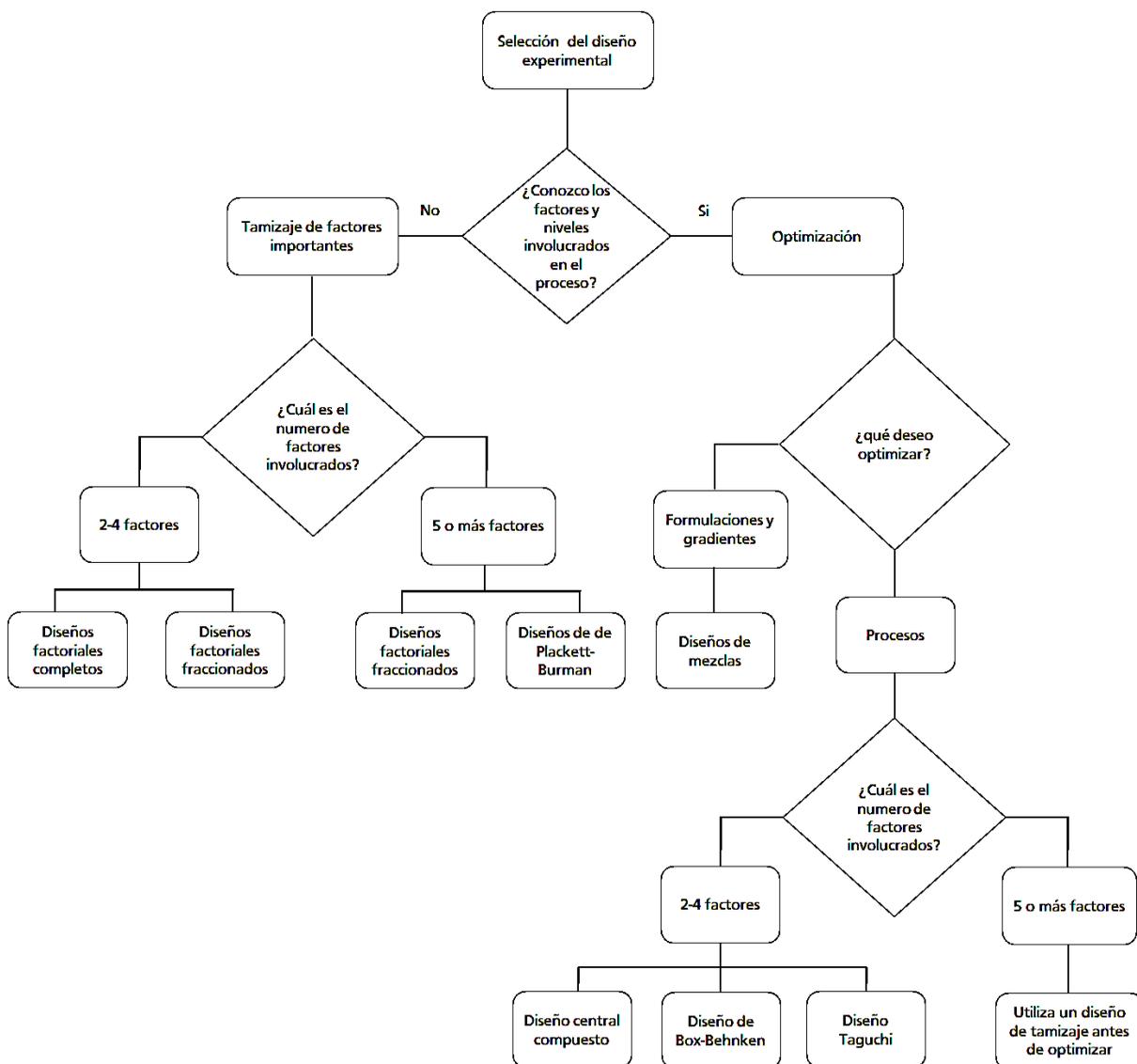


Figura 2. Diagrama de flujo para la selección de un diseño experimental. Adaptado de Sharif, Rahman (10)

4.2. Elección de un programa informático y matriz del diseño

En este punto, se debe generar la matriz del diseño de un estudio experimental. Existen algunas herramientas informáticas de diseño experimental especializado en el mercado, como el experto del DOE, Fusión Pro y Modde. Algunos programas estadísticos generales con compatibilidad de diseño experimental también pueden usarse para este propósito. La Tabla 3 muestra diferentes programas comerciales que se utilizan en el diseño y análisis de datos. La mayoría de los paquetes de informáticos, utilizan diferentes interfaces de usuario para que esta etapa sea fácil y conveniente. Para los usuarios principiantes, se recomienda familiarizarse con un programa antes del diseño y análisis de datos. Por tanto, es necesario un esfuerzo para comprender la interfaz y

así, lograr que el diseñar y analizar los datos sea fácil. Por ejemplo, el programa Statistica en su versión 12, mediante la opción "Experimental Design (DOE)" permite al usuario la creación apropiada de los diseños experimentales, seleccionar el número de factores y sus niveles (Ver definiciones en Apéndice 1), generando un número de experimentos aleatorios. La mayoría de estos programas permite a los usuarios analizar de manera sencilla sus experimentos, proporcionando resultados detallados de la falta de ajuste, el coeficiente, el valor de p y muchas otras estadísticas, gráficos para comprender los resultados. Sin duda, existen otros programas informáticos que no se consideran en el capítulo, considerando este hecho, ponemos a disposición del lector algunos revisiones de las aplicaciones de estas herramientas en diferentes áreas (20, 21).

Tabla 3. Ejemplos de paquetes informáticos para el diseño y análisis de experimentos

Nombre	Fabricante	Sitio web
JMP	SAS Institute Inc	http://www.sas.com
Minitab	Minitab Inc.	http://www.minitab.com
STATISTICA	StatSoft	http://www.statsoft.com
Matlab	The Mathworks Inc.	http://www.mathworks.com
Origin	Microcal Software	http://www.originlab.com/
Statgraphics	Startpoint Technologies	http://www.startgraphics.com
R project	Fundación R	https://www.r-project.org/

4.3. Ensayos experimentales

La etapa de experimentación a veces es tediosa, debido a los numerosos parámetros externos involucrados. La reproducibilidad y la precisión, deben verificarse antes de que los experimentos se lleven a cabo en un entorno particular. Es necesario mantener controladas las variables que influyen en el desarrollo del experimento, por ejemplo, la temperatura ambiente, la acidez del agua, la limpieza del material, el tamaño de las partículas y la recopilación de analistas. La aleatorización del experimento, es una forma importante que minimiza el efecto de aquellas variables que son difíciles de controlar. Además, se pueden presentar situaciones que requieran experimentos en más de un día. En estos casos, los experimentos se establecen en bloques (9). Por ello, la variabilidad y reproducibilidad del día a día en un día en particular debe considerarse antes de la ejecución del diseño experimental. Todo esto con la finalidad de establecer un proceso de recopilación de datos riguroso, a través de la medición con los instrumentos adecuados y con las medidas preventivas para obtener resultados confiables.

4.4. Análisis e interpretación de los datos

El primer paso del análisis de datos, debe concentrarse en la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas, en el ajuste del modelo, y el análisis de residuales, para posteriormente ir a un mayor análisis e interpretación. A veces, los investigadores encontrarán que los modelos matemáticos no son suficientes para considerar el rango experimental completo en estudio. Un modelo de orden superior, puede ser una forma de superar este problema. La evaluación del ajuste del modelo para el diseño experimental, se puede realizar por análisis de varianza. Una regresión estadísticamente significativa y una prueba negativa de falta de ajuste, representan una buena adecuación del modelo. Otra forma es mirar el valor residual, que consiste en evaluar si la variación que existe entre los datos puede describirse mediante los valores residuales en lugar de la ecuación de regresión. Esto puede interpretarse como la variación observada, debida a un error puro, lo que también cuestionará la calidad del modelo (6, 22). Un modelo bien ajustado, debería mostrar una distribución normal de residuos cuando se crea un gráfico visual, para facilitar la inspección del ajuste del modelo. Finalmente, la visualización de la ecuación del modelo predicho se puede obtener, mediante el gráfico de superficie de respuesta.

5. Aplicaciones en el aprovechamiento de sub-productos agroindustriales

La experiencia y el conocimiento de los tecnólogos en alimentos se aplican principalmente en ensayos a prueba y error, pero una forma mucho más eficiente es aplicar diseños experimentales. Sus aplicaciones se extienden desde el control de calidad de procesos industriales, hasta el análisis sensorial y aceptación de consumidores de productos formulados (23). La aplicación de cualquier diseño experimental normalmente conduce a la maximización de una o más características simultáneas en el producto resultante. Sin embargo, comúnmente se aplican varios diseños experimentales de forma consecutiva y ordenada, para elaborar un solo alimento. Por ejemplo, formular una bebida para maximizar uno de sus atributos (e.g. actividad antioxidante) con distintos ingredientes (factores) combinados a niveles convenientes (*1er diseño experimental*) para producir un conjunto de prototipos (formulaciones), en los que pueda evaluarse un segundo atributo sensorial (e.g. consistencia) con consumidores o paneles entrenados (2do. Diseño experimental), es una de las muchas estrategias combinadas.

Sin embargo, la utilidad de los diseños experimentales en el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios es algo incipiente. Algunas aplicaciones se describen en la Tabla 4 (24-37).

Tabla 4. Aplicaciones de los diseños experimentales en el aprovechamiento de subproductos agroindustriales

Subproducto	Objetivos del experimento	Diseño	Variables del diseño	Ref
Membranas de cascara de huevo	Producir concentrados peptídicos	Factorial completo	Relación enzima/sustrato, tiempo	24
Residuos de tilapia	Producir concentrado proteico	Factorial completo	T°C entrada, ToC salida, flujo	25
Subproducto de fruto de palma	Extracción de antioxidantes	Factorial fraccionado	pH, (EtOH), (sólido:líquido) T°C, tiempo	26
Cascara de plátano	Nano fibras de celulosa	Factorial fraccionado	T°C, pH, relación enzima/sustrato	27
Piel de salmón	Obtención de gelatina	Plackett-Burman	Hidrolisis enzimática y tiempo (pre-tratamiento), tiempo de pre-tratamiento, T°C y tiempo (Extracción)	28
Semilla de mango	Extracción de antioxidantes	Plackett-Burman	Tamaño de partícula, pH, (EtOH), tiempo, T°C, ciclos	29
Madera de <i>Eucalyptus globulus</i>	Producción de bioetanol	Box-Behnken	Cantidad de licor de maíz fermentado, suero de leche, levadura y Urea	30
Cascara de semilla de girasol	Extracción de antioxidantes	Box-Behnken	Concentración de MetOH, T°C, tiempo	31
Nisina/piel y semilla de aguacate	Optimizar capacidad antioxidante y antimicrobiana	Mezclas	Concentración de Nisina/piel y semilla de aguacate	32
Pasta desgrasada de aceituna	Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	Mezclas	(agua:metanol), T°C, amplitud, tiempo	33
Pulpa de manzana	Extracción de polifenoles asistida por ultrasonido	Diseño central compuesto	Energía ultrasónica, T°C, tiempo	34
Café gastado	Maximizar la glicosilación de lignocelulosa	Diseño central compuesto	Celulosa/hemicelulosa, tiempo,	35
Pulpa de cítricos	Producir pectidasa por fermentación en estado solido	Taguchi	Cantidad y tipo de pulpa cítrica, pH inicial, medio solido (paja de trigo o arroz)	36
Grano gastado de cerveza	Producción de peptidasas	Taguchi	Variedad de sustrato, tamaño grano, nivel de extracción de polifenoles	37

Por ejemplo, Santana *et al.* (24) optimizaron la obtención de un hidrolizado proteico (alcalasa/proteasa) a partir de membrana interna de cascara de huevo, con máxima capacidad antioxidante ($4 \mu\text{mol g}^{-1}$ de proteína) e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina ($\text{IC}_{50} 34.5 \pm 2.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) mediante un *diseño factorial completo* con trece experimentos independientes ($N=2k + 2k + n_0$) y análisis por superficie de respuesta, involucrando tres tipos de enzima, la relación enzima sustrato y el tiempo de hidrólisis como factores. Tibolla *et al.* (27), encontraron las condiciones

analíticas ideales (T°C (35-55), pH (6.0), relación enzima/sustrato (70 U de xilanasas g⁻¹sustrato)] para la obtención de nanofibras de celulosa a partir de salvado de lignificado de cáscara de plátano (15 % w/v en reacción) utilizando un diseño factorial fraccionado (2⁴⁻¹) con tres puntos centrales; los autores reportaron que el pH, particularmente entre 4 (-1) a 6 (+1) tuvo más influencia (p = 0.006) que la concentración de enzima o sustrato (p~0.03) en el tamaño de partícula mientras que el pH y que la temperatura influenciaron levemente el rendimiento (efecto ~14.0, p~0.063).

Icyer *et al.* (2015) utilizaron un diseño de mezclas y un análisis de superficie de respuesta para maximizar la obtención de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante a partir de pasta de aceituna desgrasada; los autores sustentaron esta decisión debido a que las condiciones de extracción supersónica (T°C, amplitud/ tiempo) varían en relación al tipo y concentración del solvente utilizado. Los autores reportaron que utilizando metanol acuoso al 51.1 %, una temperatura de 60 °C, amplitud del 13.71 % por 21.05 minutos se extraía la mayor cantidad de compuestos fenólicos (~50 mg/g). Por último, Anvari y Khayati (36) aplicaron un diseño ortogonal L16 (método Taguchi) para evaluar la influencia de 5 factores distintos (tipo de sustrato, pH inicial, relación C:N del medio y pulpa cítrica) en la producción de pectinasa a partir del cultivo en fase sólida de *Aspergillus niger* (PTCC 5010) y encontrando que el tipo y concentración de pulpa cítrica fue el factor más relevante; los autores utilizaron este método para reducir sustancialmente el número de combinaciones a 16 pues el diseño factorial completo correspondiente resultaría en 256 combinaciones (4³ 2² = 256).

6. Conclusiones

Existe un amplio espectro de herramientas estadísticas que pueden ser utilizadas por los investigadores, al momento de utilizar un subproducto agroalimentario para la obtención de compuestos bioactivos para el desarrollo de alimentos. Es importante destacar, que generalmente, se deben contemplar dos etapas para cada desarrollo, un diseño de selección, y posteriormente, un diseño de optimización. La combinación de ambos, es una práctica que mejora sustancialmente la efectividad de los diseños, el decidir, cuál utilizar definitivamente delimitará el alcance y propiedades en el desarrollo de nuevos productos. Estas herramientas estadísticas, así como los modelos de optimización, facilitan la investigación cuando se desea llevar a cabo el diseño de un alimento funcional o nutraceuticos a partir de distintos subproductos derivados de la agroindustria. Por lo que es de vital importancia, para tener validez científica y tecnológica, el uso apropiado de estas herramientas estadísticas y reducir el trabajo experimental, reduciéndose significativamente los tiempos de experimentación y los costos.

Referencias

1. Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., & Escalera, L.A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-77.
2. Olsson, M., Gottfries, J., & Wold, S. (2004). D-optimal onion designs in statistical molecular design. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 73(1), 37-46.
3. Dejaegher, B., & Vander Heyden, Y. (2011). Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 56(2):141-58.
4. Yu, P., Low, M.Y., & Zhou, W. (2018). Design of experiments and regression modelling in food flavour and sensory analysis: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 202-215.
5. Hibbert, D. (2012). Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 910, 2-13.
6. Montgomery, D.C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John Wiley.
7. Li, Z., Zhang, T., & Zhang, R. (2013). Three-level regular designs with general minimum lower-order confounding. *Canadian Journal of Statistics. = Revue Canadienne De Statistique*, 41, 192-210.
8. Plackett, R., & Burman, J.P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.
9. Ferreira, S., Caires, A.O., Borges, T., Lima, A.M., Silva, L.O., & Santos, W.N. (2017). Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal*, 131, 163-169.

10. Sharif, K.M., Rahman, M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M., Sahena, F., & Zaidul, I. (2014). Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, *124*, 105-116.
11. Box, G.E., Hunter, J.S., & Hunter, W.G. (2005). *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery*. New York. Wiley-Interscience.
12. Brereton, R., Jansen, J., Lopes, J., Marini, F., Pomerantsev, A., Rodionova, O., Roger, J.M., Walczak, B., & Tauler, R. (2017). Chemometrics in analytical chemistry—part I: history, experimental design and data analysis tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*, 5891-5899.
13. Ferreira, S., Junior, M.M., Felix, C.S., Silva, D.L., Santos, A.S., Neto, J.H., Souza, C.T., Junior, R.A., & Souza, A.S. (2019). Multivariate optimization techniques in food analysis - A review. *Food chemistry*, *273*, 3-8 .
14. Candioti, L., Zan, M.M., Câmara, M.S., & Goicoechea, H. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, *124*, 123-38 .
15. Toker, O.S., Do an, M., Canıylmaz, E., Ersöz, N.B., & Kaya, Y. (2012). The Effects of Different Gums and Their Interactions on the Rheological Properties of a Dairy Dessert: A Mixture Design Approach. *Food and Bioprocess Technology*, *6*, 896-908.
16. Handa, C., Lima, F.S., Guelfi, M., Georgetti, S.R., & Ida, E. (2016). Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food chemistry*, *197 Pt A*, 175-184 .
17. Box, G., & Wilson, K.B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the royal statistical society series b-methodological*, *13*, 1-38.
18. Tarley, C.R., Silveira, G., Santos, W.N., Matos, G., Silva, E., Bezerra, M.A., Miró, M., & Ferreira, S. (2009). Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*, *92*, 58-67.
19. Rao, R.S., Kumar, C.G., Prakasham, R.S., & Hobbs, P. (2008). The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnology Journal*, *3*, (4):510-23.
20. Musina, O., Putnik, P., Koubaa, M., Barba, F., Greiner, R., Granato, D., & Roohinejad, S. (2017). Application of modern computer algebra systems in food formulations and development: A case study. *Trends in Food Science and Technology*, *64*, 48-59.
21. Nunes, C.A., Alvarenga, V., Sant'Ana, A.D., Santos, J., & Granato, D. (2015). The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. *Food research international*, *75*, 270-280.
22. Pimentel, M.F., & Neto, B.B. (1996). Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova*, *19*, 268-277.
23. Bower, J.A. (2013). *Statistical methods for food science: introductory procedures for the food practitioner*. Wiley-Blackwell.
24. Santana, A., Melo, A., Tavares, T., & Ferreira, I.M. (2016). Biological activities of peptide concentrates obtained from hydrolysed eggshell membrane byproduct by optimisation with response surface methodology. *Food & function*, *7*(11), 4597-4604.
25. Paris, L.D., Haab, J.C., Sary, C., Bernardi, D.M., Boscolo, W.R., & Signor, A. (2016). Production and spray drying of protein hydrolyzate obtained from tilapia processing by-products. *Acta Scientiarum-technology*, *38*, 89-97.
26. Wong, W.H., Lee, W.X., Ramanan, R.N., Tee, L.H., Kong, K., Galanakis, C., Sun, J., & Prasad, K. (2015). Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. *Industrial Crops and Products*, *63*, 238-248.
27. Tibolla, H., Pelissari, F. M., Rodrigues, M. I. & Menegalli, F. C. (2017). Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial crops and products*, *95*, 664-674.
28. Fan, H., Dumont, M.J., & Simpson, B.K. (2017). Extraction of gelatin from salmon (*Salmo salar*) fish skin using trypsin-aided process: optimization by Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Journal of food science and technology*, *54*(12), 4000-4008.
29. Torres-León, C., Rojas, R., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R., & Aguilar, C.N. (2017). Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave. *Food and Bioprocess Processing*, *105*, 188-196.
30. Kelbert, M., Romani, A., Coelho, E., Pereira, F.B., Teixeira, J.A., & Domingues, L. (2015). Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements. *Industrial crops and products*, *64*, 16-24.

31. Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., & Sztyk, E. (2011). Optimization of extraction conditions of antioxidants from sunflower shells (*Helianthus annuus* L.) before and after enzymatic treatment. *Industrial Crops and Products*, *33*(1), 123-131.
32. Calderón-Oliver, M., Escalona-Buendía, H. B., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., & Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, *65*, 46-52.
33. Icyer, N.C., Toker, O.S., Karasu, S., Tornuk, F., Bozkurt, F., Arici, M., & Sagdic, O. (2016). Combined design as a useful statistical approach to extract maximum amount of phenolic compounds from virgin olive oil waste. *LWT-Food Science and Technology*, *70*, 24-32.
34. Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C.M., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, *17*(6), 1066-1074.
35. Scully, D.S., Jaiswal, A.K., & Abu-Ghannam, N. (2016). An investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. *Bioengineering*, *3*(4), 33.
36. Anvari, M., & Khayati, G. (2014). The effect of citrus pulp type on pectinase production in solid-state fermentation: Process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Journal of BioScience & Biotechnology*, *3*(3).
37. Kotlar, C.E., Agüero, M.V., & Roura, S.I. (2012). Statistical optimization of a novel low-cost medium based on regional agro-industrial by-products for the production of proteolytic enzymes by *Bacillus cereus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *42*(5), 406-425.

Apéndice 1. Conceptos básicos en diseño de experimentos

Término	Definición
Control o línea base	Punto de referencia
Corrida	Un experimento llevado a cabo en valores específicos para cada factor
Efecto	Magnitud del cambio en la respuesta al variar los factores
Efecto principal	El resultado de un factor único
Experimento	Una investigación planificada y controlada
Factor	Variable experimental bajo estudio (e.g. temperatura, tiempo, pH)
Interacción	El resultado de un factor combinado con otro(s)
Modelo	Ecuación matemática que define la respuesta en función de los factores estudiado
Niveles	Valores específicos de los factores para un experimento dado
Respuesta	Variable que es medida que depende principalmente de los factores en estudio
Treatment	La aplicación de configuraciones combinadas
Unidad de muestreo	Unidad individual muestreada de una población
Unidad experimental	Unidad de muestreo que se asigna en el experimento para recibir un tratamiento
Variable	Cualquier característica del experimento que puede variar (conocida o desconocida)

En este volumen se abordan distintos aspectos clave para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales y la valorización de recursos regionales.

Esta publicación surgió de las exposiciones y debates que tuvieron lugar en el marco de la Red Iberoamericana LACFUN-CYTED 415RT0495, del Área Desarrollo Sostenible, entre 2015 y 2019. En esta red participaron investigadores de ocho países (Argentina, Bolivia, Brasil Chile, Colombia, España, México y Uruguay) y además dos empresas (Rocío del Campo y Biofe, ambas de la Provincia de Santa Fe, Argentina) y se combinó con las actividades de un Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS), financiado por CONICET (Argentina) y el CIN (Consejo Interuniversitario Nacional). Han sido invitados para contribuir a este libro los referentes internacionales relacionados con los temas abordados, relacionados con los grupos participantes. Especialmente, materializando el intercambio inter-redes, se ha invitado a miembros de la Red Iberoamericana de Alimentos Autóctonos Subutilizados (ALSUB-CYTED, 118RT0543), coordinada por la Dra. Sandra Sayago, a contribuir con un capítulo sobre análisis multivariado.

El desarrollo sostenible se basa en la necesidad de que exista un delicado equilibrio entre tres aspectos: el impulso económico de una región, la conservación del medio ambiente y el bienestar de la sociedad involucrada. Se plantea como uno de los objetivos de la FAO para contribuir a la seguridad alimentaria (ODS 2).

Las reuniones, que se realizaron en varios de los países miembros de la Red, tuvieron como objetivo el estudio y la difusión de los beneficios de la recuperación de subproductos agroindustriales y el aprovechamiento de recursos regionales para la producción de alimentos. Estos aspectos favorecen también la soberanía alimentaria, que es uno de los componentes de la seguridad alimentaria.



Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social
CIN Consejo Interuniversitario Nacional



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina