

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 968**

21 Número de solicitud: 202430298

51 Int. Cl.:

B65D 81/24 (2006.01)
B29C 48/00 (2009.01)
B29C 48/16 (2009.01)
C09K 15/34 (2006.01)
C08L 67/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

16.04.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.10.2024

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

04.11.2024

Fecha de concesión:

14.03.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.03.2025

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.00%)
Carretera San Vicente del Raspeig, s/n
03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES

72 Inventor/es:

BELTRÁN SANAHUJA, Ana;
TODOLÍ TORRÓ, José Luis;
SÁNCHEZ ROMERO, Raquel;
PRATS MOYA, María Soledad;
CENITAGOYA ALONSO, Natalia y
VALDÉS GARCÍA, Arantzazu

54 Título: **Extracto, material de envasado que contiene dicho extracto, su procedimiento de fabricación y uso del mismo**

57 Resumen:

La presente invención preconiza un extracto antioxidante liofilizado fermentado y un material de envasado basado en policaprolactona (PCL) reforzado con el citado extracto antioxidante fermentado y encapsulado procedente de subproductos de piña, donde el extracto está presente en, al menos, un 10% de su peso total, constituyendo un material con una capacidad antioxidante de, al menos, 115 mg Trolox/100g material. Igualmente, es objeto de la presente invención, el procedimiento de fabricación del extracto y material de envasado que incluye, entre otras etapas, la extracción asistida por ultrasonidos, una fermentación del extracto de piña liofilizado, su encapsulación y la extensión de las capsulas que contienen el extracto de piña liofilizado en su interior con PCL. Ventajosamente, el material obtenido es usado en el envasado de alimentos grasos con el fin de aumentar su vida útil.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 984 968 B2

DESCRIPCIÓN

Extracto, material de envasado que contiene dicho extracto, su procedimiento de fabricación y uso del mismo

5

CAMPO DE LA INVENCION

Sector: Materiales para envasado de alimentos.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

En la actualidad, existe una tendencia creciente hacia el aprovechamiento y revalorización de componentes obtenidos a partir de la biomasa (plantas lignocelulósicas o residuos industriales y agrícolas); contribuyendo así a la gestión y revalorización de desechos y la contaminación ambiental. Estos subproductos son ricos en diferentes compuestos de interés como antioxidantes, antimicrobianos, fibras dietéticas, nanomateriales, colorantes, entre otros, tal como se recoge en los trabajos de Beltrán Sanahuja, A.; Ponce Landete, M.; Domingo Martínez, M.I.; Prats Moya, M.S.; Valdés García, A.: *Optimization of Volatile Compounds Extraction from Industrial Celery (Apium graveolens) By-Products by Using Response Surface Methodology and Study of Their Potential as Antioxidant Sources* (Foods 2021, 10, 2664. <https://doi.org/10.3390/foods10112664>) y Valdés A, Vidal L, Beltrán A, Canals A, Garrigós MC.: *Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Almond Skin Byproducts (Prunus amygdalus): A Multivariate Analysis Approach* (J Agric Food Chem. 2015 Jun 10;63(22):5395-402. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01011. Epub 2015 May 29. PMID: 26005743).

Algunos enfoques para su revalorización se han centrado en el desarrollo de nuevos materiales de envasado más respetuosos con el medio ambiente que permitan envasar los alimentos en las mejores condiciones para aumentar su vida útil, conforme indican Bangar S, Purewal S, Trif M, Maqsood S, Kumar M, Manjunatha V and Rusu A. en su trabajo *Functionality and Applicability of Starch-Based Films: An Eco-Friendly Approach* (Foods. 2021, 10(9), 2181).

En consecuencia y evitando el uso de materiales de envasado derivados del petróleo,

en las últimas décadas se han desarrollado y ensayado nuevos materiales biodegradables en forma de película flexible para el envasado de alimentos.

Además de los envases ambientalmente sostenibles, la última tendencia de
5 investigación se centra en el desarrollo de materiales con propiedades antifúngicas, antimicrobianas y antioxidantes, entre otras, siendo estos últimos alternativas muy prometedoras para prolongar la vida útil de alimentos con alto contenido graso.

En este sentido, los extractos etanólicos o acuosos de residuos vegetales pueden ser
10 una interesante fuente de sustancias antioxidantes. Es por ello por lo que recientemente se han desarrollado diferentes estudios empleando residuos de frutas para esta finalidad.

En este contexto, la piña es una buena opción ya que la producción mundial es bastante
15 alta, alrededor de 28 millones de toneladas por año. En la industria del procesado de piña, se genera una gran cantidad de residuos y subproductos como son la pulpa, el corazón, la cáscara y la corona. Hasta el momento, los residuos y subproductos de piña se han utilizado como fuente de bromelina, carbohidratos, aceites esenciales y polifenoles, entre otras aplicaciones. Algunos estudios han demostrado las posibilidades
20 del uso de la piña como fuente de compuestos antioxidantes en general y más concretamente son ricas en algunos polifenoles.

Siguiendo esta línea, la catequina, el ácido ferúlico, el ácido gálico y la epicatequina se han descrito como polifenoles abundantes en los residuos y subproductos de la piña, tal
25 como se recoge en el trabajo de Li T, Shen P, Liu W, et al. "*Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions*" (Int J Food Prop. 2014;17(8):1805-1817. doi:10.1080/10942912.2012.7321686).

Relacionado con la incorporación de los mencionados extractos a materiales de envase,
30 en dicho sector se emplean microcápsulas para proteger los compuestos activos de las altas temperaturas de procesado, disminuir su degradación y controlar la liberación de agentes activos desde el propio envase hasta el alimento durante el tiempo que este se encuentra envasado (aromas, antioxidantes, antimicrobianos, sabores, colorantes...) y para ello se hace uso de diferentes técnicas entre las que destaca principalmente la
35 técnica de atomización-secado. En cuanto a la aplicación de la técnica de secado por

atomización en antioxidantes obtenidos de subproductos de la piña, Lourenço y su equipo [V.D. 2021. *Optimization of natural antioxidants extraction from pineapple peel and their stabilization by spray drying*. Foods, 10, doi:10.3390/foods10061255] llevaron a cabo una extracción sólido-líquido de la corteza de la piña, empleando una relación
 5 cantidad de muestra/disolvente de extracción de 1/1 (w/w), a temperatura ambiente durante 25 min empleando una mezcla de etanol/agua (80/20) como disolvente de extracción. En estas condiciones, el extracto resultante mostró un contenido total en polifenoles (TPC) de $11,10 \pm 0,01$ mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/g de extracto seco, actividad antioxidante de $91,79 \pm 1,98$ μ mol Trolox/g de extracto seco por el
 10 método DPPH y $174,50 \pm 9,98$ μ mol de Trolox/ g extracto seco por el método FRAP (del inglés *Ferric Reducing Antioxidant Power*). El extracto rico en antioxidantes se sometió a estabilización mediante el proceso de atomización-secado a 150 °C de temperatura del aire de entrada utilizando maltodextrina (5% p/p) como agente encapsulante. Los resultados mostraron que la capacidad antioxidante de los compuestos encapsulados
 15 se mantuvo después de la encapsulación.

Una vez estabilizados los compuestos activos, con el fin de desarrollar un envase, éstos se incorporan a materiales que pueden ser biopoliméricos mediante técnicas convencionales empleadas en el sector del envasado como es el procesado mediante
 20 extrusión, con el fin de poder trasladar posteriormente la tecnología desarrollada a un nivel industrial. Como matrices poliméricas se pueden emplear diversos biopolímeros como por ejemplo (Policaprolactona (PCL), Políácido láctico (PLA) con distinta relación L/D-lactida, polihidroxialcanoatos (PHAs), derivados de la celulosa y mezclas entre ellos.

25 Para el caso concreto de la incorporación a matrices biopoliméricas de antioxidantes procedentes de la piña, cabe destacar el trabajo llevado a cabo por Lourenço y colaboradores (V.D.2020. *Application of edible alginate films with pineapple peel active compounds on beef meat preservation*. Antioxidants, 9, 1–15, doi:10.3390/antiox9080667) en el que se han desarrollado películas a base de alginato
 30 que contienen antioxidantes naturales de la corteza de piña. Dichos materiales activos se han aplicado para el control de la degradación microbiológica, preservación del color y como barrera a la oxidación de lípidos en filetes de carne de vacuno almacenada a 4°C durante 4 días. Previamente a su incorporación a la matriz biopolimérica, los
 35 compuestos extraídos en disolvente hidroalcohólico se estabilizan por el método de

atomización-secado. Las películas bioactivas muestran mayor actividad antioxidante que los materiales controles.

Además, los residuos de piña son ricos en celulosa, lignina, pectina y sus derivados, lo que los convierte en materiales adecuados para desarrollar un envase biodegradable. Rodsamran y Sothornvit evaluaron el uso de la corteza de piña como plastificante natural para la producción de películas comestibles en su trabajo "*Preparation and characterization of pectin fraction from pineapple peel as a natural plasticizer and material for biopolymer film*" (R. 2019. Food Bioprod Process, 118,198–206, doi:10.1016/j.fbp.2019.09.010).

Un aumento en la cantidad de extracto de cáscara de piña rico en pectina y polifenoles aumentó el valor de TPC, aportando, además capacidad antioxidante a la película desarrollada. En otro estudio llevado a cabo por Kumar (K.K. 2021. "*Pineapple peel extract incorporated poly(vinyl alcohol)-corn starch film for active food packaging: Preparation, characterization and antioxidant activity*". Int J Biol Macromol, 187, 223–231, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.136), se incorporó extracto de corteza de piña como antioxidante natural para producir películas de almidón-alcohol polivinílico (PVA), obteniendo propiedades térmicas y antioxidantes mejoradas en los materiales desarrollados.

Además, la celulosa extraída de las hojas de piña se ha empleado como agente de refuerzo en PLA mejorando la resistencia a la tracción del material. Por otro lado, la fermentación de subproductos y residuos por bacterias selectivas puede producir bioplásticos comúnmente llamados polihidroxialcanoatos (PHA). Los PHA son plásticos de base biológica y son biodegradables. En esta línea, Suwannasing y su equipo confirmaron que los desechos de la industria del procesamiento de piña se pueden utilizar para producir PHA.

Todos estos estudios ponen de manifiesto el potencial de los subproductos de piña en el desarrollo de materiales de envase, aunque es necesario avanzar en esta línea de investigación con el fin de mejorar las propiedades de los materiales desarrollados.

Por otro lado, cabe citar patentes tales como US6447826B1, CN106674575A, US10723536B2 y US2012276357A1, entre otras, que divulgan materiales para el

envasado de alimentos que aportan una capacidad antioxidante para mantener y/o alargar la vida útil del alimento contenido. Sin embargo, ninguno de dichos materiales divulgados incluye en su composición un refuerzo de extracto de piña.

5 En base a lo comentado anteriormente, la presente invención busca solventar las siguientes problemáticas:

1. La revalorización de los residuos y subproductos de piña favoreciendo la economía circular.
- 10 2. El aumento de vida útil de alimentos grasos debido a que, mediante el material de envase activo antioxidante desarrollado en base policaprolactona (PCL), permita retrasar y/o evitar las reacciones de degradación oxidativa en alimentos.

Por tanto, se describe en la presente solicitud de patente un producto que suponga una
15 nueva aplicación para los residuos y subproductos de piña, mediante la extracción de compuestos antioxidantes y su uso como aditivos a materiales de envase para aumento de vida útil de alimentos grasos envasados.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

20

La presente invención preconiza un extracto procedente de una fuente natural y el material de envasado que lleva incorporado dicho extracto en su formulación.

De forma que el extracto está liofilizado y fermentado, procede de subproductos de piña
25 y está formado por la siguiente composición:

- entre 600 y 1800 mg de ácido succínico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado,
- entre 0,03 y 0,09 mg de ácido gálico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado,
- 30 – entre 0,6 y 1,8 mg de ácido siríngico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado,
- entre 0,04 y 0,12 mg de ácido cumárico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado, y
- entre 0,225 y 0,680 mg de ácido ferúlico por 100g de extracto de piña liofilizado
35 fermentado,

de esta forma, el extracto es antioxidante con un contenido total de polifenoles (TPC) de, al menos, 2245 mg Trolox por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado.

5 Así, el material de envasado incluye policaprolactona (PCL) como biopolímero base reforzado con el extracto antioxidante previamente fermentado y encapsulado procedente de subproductos de piña, donde el extracto está presente en, al menos, un 10% de su peso total, constituyendo un material con un contenido total de polifenoles (TPC) de, al menos, 115 mg Trolox/100g material. Igualmente, es objeto de la presente
10 invención, el procedimiento de fabricación del extracto y el material de envasado obtenido a partir de dicho extracto, así como el uso del material obtenido en el envasado de alimentos grasos con el fin de aumentar su vida útil.

En este sentido, se entiende por subproductos de piña a aquellas partes de la piña que
15 no se aprovechan para su consumo y se consideran residuos o restos a desechar.

Los subproductos de piña que, preferentemente, se emplean en la composición del material de envasado de la presente invención corresponden al tronco de la piña. Así, el material de envasado es, preferentemente, transparente, formado por una película
20 flexible y presenta un espesor entre 0,080 mm y 0,120 mm.

En esencia, el procedimiento de fabricación del material de envasado desarrollado propone:

- 25
- La obtención, purificación y estabilización de un extracto antioxidante a partir de subproductos de piña;
 - La incorporación por extrusión del extracto antioxidante obtenido a una matriz de PCL para producir un material de envase activo, tipo película flexible, con capacidad antioxidante.

30

En este sentido, el procedimiento de fabricación del extracto de la presente invención está formado por las siguientes etapas:

- 35
- Molturado del subproducto de piña congelado y deshidratación del molturado a una temperatura entre 25°C y 40°C durante, al menos, 48h.

- Adición de una disolución acuosa de etanol con una concentración de, al menos el 50%, al subproducto de piña molturado y deshidratado obtenido en la etapa anterior.
- 5 - Extracción asistida por ultrasonidos, preferentemente en un sonotrodo, aplicando una amplitud de, al menos, 65%, y manteniendo la temperatura por debajo de 45°C. Por ejemplo, aplicando un tiempo de extracción de 5 minutos y, al menos, un número de ciclos igual a dos se mantiene la temperatura por debajo de 45°C.
- 10 - Centrifugación del subproducto de la piña. De forma opcional, dicha centrifugación se realiza durante, al menos, 10 minutos a una velocidad de, al menos, 4000 rpm.
- Recuperación del sobrenadante que corresponde al extracto de la piña,
- Eliminación de etanol contenido en el sobrenadante aplicando vacío y una temperatura máxima de 40°C, obteniendo el extracto de piña.
- 15 - Adición de levadura fresca al extracto de piña.
- Fermentación mediante agitación de la disolución obtenida en la etapa anterior en un sistema cerrado a una temperatura entre 32°C y 37°C durante, al menos, 3 días. Cabe señalar que por sistema cerrado nos referimos a, por ejemplo, un reactor cubierto. De manera opcional, en la fermentación se aplica una agitación
- 20 de, al menos, 200 rpm.
- Filtrado de la disolución, eliminando restos de levadura, obteniendo una disolución de extracto de piña fermentado.
- Congelación de la disolución de extracto de piña fermentado a una temperatura menor o igual a -20°C.
- 25 - Liofilización y obtención de un extracto de piña liofilizado en polvo. Preferentemente, en la liofilización se aplica una temperatura entre -55°C y -35°C y una presión entre 0,200 y 0,5 mbar durante aproximadamente 48h.

30 Así, la extracción asistida por ultrasonidos presenta un rendimiento de, al menos, el 45% y el extracto de piña liofilizado en polvo obtenido es antioxidante, está fermentado, y presenta un contenido total de polifenoles (TPC) de, al menos, 2245 mg Trolox por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado.

Opcionalmente, tras la etapa de liofilización por la que se obtiene el extracto de piña liofilizado fermentado se realizan las siguientes etapas para la obtención de un material

35

de envasado:

- Dispersión de una disolución de agente encapsulante junto con el extracto de piña liofilizado, y atomización-secado mediante una corriente de aire a temperatura mayor de 100°C, obteniendo unas capsulas sólidas que contienen el extracto de piña liofilizado en su interior. Así, el encapsulado obtenido es estable frente a la degradación de temperatura.
- Extrusión de las cápsulas sólidas que contienen el extracto de piña liofilizado en su interior con PCL para obtener un material de envasado. Preferentemente, la extrusión se lleva a cabo, al menos, a 60°C y con unas presiones y tiempos de inyección de 4 – 4 - 4 bar y 1 – 0,05 - 4 s, respectivamente.

Así, el extracto de piña liofilizado está presente en, al menos, un 10% en el material de envasado, mientras que el material de envasado obtenido presenta una capacidad antioxidante significativamente mayor, al menos 3 veces mayor, que un material obtenido basado en PCL, pero incorporando en su formulación extracto de piña sin fermentar.

Cabe señalar que en la dispersión de la disolución del agente encapsulante junto con el extracto de piña liofilizado puede participar también el glicerol (u otro similar como sorbitol). Ya sea con o sin glicerol, en una de las realizaciones de la invención - tal como se detalla posteriormente -, el agente encapsulante es una proteína de leche.

Ventajosamente, el uso de los subproductos de la piña en la composición del material de envasado posibilita la revalorización de dichos residuos, mientras que el empleo de este material permite el aumento de la vida útil de alimentos grasos gracias a su capacidad de retrasar y/o evitar las reacciones de degradación oxidativa.

Así, el material de envasado de la presente invención presenta preferentemente una forma de película flexible antioxidante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte

integrante de dicha descripción, un juego de figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

- La figura 1 muestra el espectro infrarrojo (FTIR) del extracto de piña liofilizado.
- 5 La figura 2 muestra el análisis termogravimétrico (TGA) del extracto de piña liofilizado.
- La figura 3 muestra el espectro FTIR del extracto de piña liofilizado fermentado.
- La figura 4 muestra el espectro FTIR de la proteína del suero de la leche comercial.
- Las figuras 5 y 6 muestran los espectros FTIR de las cápsulas con extracto de piña liofilizado sin fermentar y las cápsulas con extracto de piña liofilizado fermentado,
- 10 respectivamente.
- La figura 7 muestra los materiales de PCL con un 10% de extracto de piña liofilizado fermentado.
- La figura 8 muestra el espectro de un material control de PCL CAPA 6500.
- La figura 9 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 10% extracto
- 15 de piña liofilizado sin fermentar.
- La figura 10 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 15% extracto de piña liofilizado sin fermentar.
- La figura 11 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 10% extracto de piña liofilizado fermentado.
- 20 La figura 12 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 15% extracto de piña liofilizado fermentado.
- La figura 13 muestra el análisis termogravimétrico de un material control de PCL CAPA 6500.
- La figura 14 corresponde al análisis termogravimétrico del material PCL CAPA 6500 +
- 25 10% extracto de piña liofilizado sin fermentar.
- La figura 15 corresponde al análisis termogravimétrico del material PCL CAPA 6500 + 15% extracto de piña liofilizado sin fermentar.
- Las figuras 16, 17 y 18 muestran los espectros FTIR de un material de película flexible de PCL que incluye un porcentaje del 5, 10 y 15% de capsulas de extracto de piña
- 30 liofilizado sin fermentar, respectivamente.
- Las figuras 19, 20 y 21 corresponden a los termogramas de los materiales de PCL con un 5, 10 y 15% de cápsulas con extracto de piña sin fermentar.
- Las figuras 22, 23 y 24 muestran los espectros FTIR de los materiales preparados y ensayados en las figuras 19, 20 y 21, respectivamente.
- 35 Las figuras 25 y 26 muestran los termogramas de los materiales de PCL con un 10% y

15% de cápsulas con extracto de piña fermentado, respectivamente.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

- 5 Se detallan seguidamente ensayos realizados que ilustran la ventaja competitiva del material desarrollado en la presente invención.

Procedimiento experimental

- 10 1. Obtención de los extractos activos antioxidantes a partir de subproductos de piña.

El método de extracción convencional utilizado fue adaptado de Valdés García et al [detallado en *Potential of Industrial Pineapple (Ananas Comosus (L.) Merrill) By-Products as Aromatic and Antioxidant Sources*. Antioxidants 10, no 11 (4 novembre 15 2021): 1767. <https://doi.org/10.3390/antiox10111767>].

En primer lugar, para la realización de la extracción por el método convencional se toma muestra de corazón de piña congelado, se moltura y se deshidrata manteniendo la muestra a 40°C durante 48 h.

20

Tras ello, colocar $2g \pm 0,1g$ de piña molturada y deshidratada en un tubo de ensayo y añadir 4 mL de disolución acuosa de etanol al 50%.

El extracto se puede preparar mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonidos (EAU). Para ello, se pesan 1,5 g de piña triturada deshidratada y se añade un volumen 25 total de 13 mL de disolvente (Disolución acuosa de etanol 50 % peso) al tubo de extracción.

A continuación, se lleva a cabo la extracción en el sonotrodo empleando diferentes 30 condiciones con el fin de obtener las condiciones óptimas de extracción.

En la tabla 1 se muestran los resultados del ensayo experimental empleado para la optimización del proceso de extracción, donde se analizan las variables de amplitud (%), ciclos y el tiempo de extracción (minutos).

35

Los experimentos se generan en orden aleatorio para evitar sesgos en los resultados y

se llevan a cabo 5 puntos centrales ($t = 10$ minutos, $C = 05:05$, $A = 45\%$).

Para validar el diseño experimental se utilizaron como respuesta los valores de contenido total en polifenoles (TPC) y capacidad antioxidante medidos mediante los siguientes dos métodos: ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) y FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

Los resultados mostrados en la tabla 1 indican los valores de TPC y capacidad antioxidante medida por los dos métodos citados (ABTS y FRAP) para los extractos obtenidos mediante el empleo de la técnica de extracción asistida por ultrasonidos (EAU) en diferentes condiciones. Cabe señalar que la EAU es un método ventajoso respecto a otros métodos convencionales de extracción, ya que permite su escalado industrial.

15 Tabla 1

Muestra	Amplitud (%)	Ciclos	Tiempo (min)	Media TPC (mg GAE/ 100g piña)	Media FRAP (mg Trolox/ 100g piña)	Media ABTS (mg Trolox/ 100g piña)
1	20	2	10	51,49	103,68	79,77
2	45	5	10	49,27	101,83	73,47
3	45	7	15	52,31	100,25	78,34
4	20	5	5	55,81	104,68	78,49
5	70	5	15	56,66	110,05	79,73
6	20	7	10	53,29	99,24	77,40
7	45	5	10	53,63	101,45	76,97
8	45	2	5	43,36	100,91	74,85
9	45	7	5	42,02	101,77	74,78
10	70	2	10	53,34	117,12	82,40
11	70	7	10	48,65	108,46	79,47
12	70	5	5	47,33	115,01	81,034
13	20	5	15	49,02	109,22	79,75
14	45	5	10	46,97	104,01	75,96
15	45	5	10	36,31	107,19	73,68
16	45	2	15	39,60	102,78	73,54
17	45	5	10	43,53	109,59	74,25

Las condiciones óptimas de extracción por ultrasonidos obtenidas con cada método son las que se muestran en la tabla 2 donde se recogen los valores óptimos de cada método

(es decir, TPC, FRAP y ABTS), por separado y la combinación de las tres respuestas, y su coeficiente de correlación para los resultados de extracción asistida por ultrasonidos.

Tabla 2

5

	TPC+FRAP+ABTS	TPC	FRAP	ABTS
Amplitud óptima (%)	70,0	69,999	69,9336	70,0
Ciclos óptimos	2	7,0	3,60689	7,0
Tiempo óptimo (min)	5	15,0	5,29869	15,0
Coeficiente de correlación (%)	82,53	100	100	84,13

Tras la realización de los experimentos, las condiciones óptimas obtenidas para la extracción asistida por ultrasonidos mediante el uso del sonotrodo son: Amplitud: 70 %; Ciclos: 2 y Tiempo de extracción: 5 min.

10

En esas condiciones óptimas, se lleva a cabo la extracción asistida por ultrasonidos de la muestra por triplicado y se registra la temperatura al final de cada extracción.

15

Posteriormente, se toma un tubo de centrifuga y se transfiere el extracto de piña y el volumen de etanol del tubo de extracción del sonotrodo.

20

Se lava el tubo de extracción del sonotrodo con 1 ml de disolvente acuoso de etanol y se añade este volumen en el tubo de centrifuga, se equilibran los tubos y se centrifuga 15 minutos a 4500 rpm. Una vez centrifugado se guarda el sobrenadante y se lleva al rotavapor con un baño a 40°C para eliminar el etanol presente en la disolución. Una vez eliminado este disolvente, se trasvasa el extracto acuoso a los vasos del liofilizador. Se congelan a -20°C y se llevan al liofilizador a -55°C y 0,200 mbar durante aproximadamente 48h.

25

Finalmente, el extracto en polvo se debe conservar en el congelador, a una temperatura de -21°C. El rendimiento de extracción obtenido fue de $(45,1 \pm 1,7) \%$.

30

El parámetro relevante en la extracción por ultrasonidos es la amplitud aplicada, siendo vital mantener la temperatura por debajo de 45°C. Para mantener dicha temperatura se emplea, por ejemplo, un tiempo de extracción de 5 minutos y, al menos, un número de ciclos igual a dos.

El análisis de la composición de la fracción mineral en las muestras de extracto de piña liofilizado obtenidas empleando las condiciones óptimas descritas previamente, se realizó mediante la técnica de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

5

Para ello, en primer lugar, se lleva a cabo la digestión de la muestra empleando un horno microondas. Al tubo digestor se le añaden 0,5g de la muestra, 7 mL de disolución de HNO_3 al 65% y 1 mL de disolución de H_2O_2 al 30%. En ese caso, se prepararon adicionalmente 4 tubos que contenían agua y no contenían muestra (blancos). La digestión se llevó a cabo en 15 min partiendo de una temperatura inicial de 200°C hasta una temperatura final de 110°C, presión de 45 bares y a máxima potencia (1500W para Ethos y 1200W para unidades de inicio). Tras esto, se llevó la muestra hasta un peso final de 20 g con agua destilada. Una vez realizado el proceso de digestión, tanto los blancos como las muestras se filtran con un filtro de 0,23 μm para introducirlos en el ICP-MS.

Los valores medios de concentración de elementos hallados en las muestras de extracto de piña liofilizado preparado se recogen en la Tabla 3.

20 Tabla 3. Composición expresada en mg elemento / 100 g extracto liofilizado ($x \pm \text{SD}$; $n=6$).

	mg / 100 g extracto liofilizado
^{11}B	$1,51 \pm 0,06$
^{23}Na	$4,65 \pm 0,15$
^{24}Mg	144 ± 5
^{28}Si	$41,6 \pm 1,9$
^{31}P	$71,8 \pm 1,4$
^{32}S	$81,9 \pm 1,1$
^{39}K	1635 ± 52
^{44}Ca	$10,2 \pm 0,3$
^{55}Mn	$11,9 \pm 0,4$
^{56}Fe	$0,9 \pm 0,6$
^{63}Cu	$0,64 \pm 0,03$
^{66}Zn	$0,496 \pm 0,018$

⁸⁵ Rb	1,66 ± 0,06
⁸⁸ Sr	0,144 ± 0,005
⁹⁵ Mo	0,0011 ± 0,0002
¹³⁷ Ba	0,0282 ± 0,0011

Además, se cuantificaron los principales compuestos fenólicos mediante HPLC-MS (siglas en inglés que corresponden a la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas) empleando la siguiente metodología:

5

El análisis de polifenoles individuales en las muestras se llevó a cabo mediante UHPLC-MS/MS utilizando un sistema comercial UHPLC Agilent 1290 Infinity acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6490 (Santa Clara, CA, EE. UU.) con una fuente de iones Agilent Jet Stream en Modo de ionización negativa (NI).

10

La separación de analitos se realizó en una columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051-7201, EE. UU.), 3 × 100 mm, 2,7 µm, que se mantuvo a 25°C durante el análisis. En condiciones optimizadas, la fase móvil consistió en disolvente A (100,0% agua + 0,1 % ácido fórmico) y disolvente B (100,0% acetonitrilo + 0,1 % ácido fórmico) usando el siguiente gradiente: 5 min, 50% A y 50% B; 5,5 min, 80 % A y 20% B; 6 min, 80% A y 20% B; 7 min, 10% A y 90% B; a un caudal constante de 0,4 ml min⁻¹. Para todas las muestras, el volumen de inyección fue de 1 µL.

15

20 Se utilizó el modo de análisis de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para monitorear las transiciones de iones precursores a iones de producto dominantes. Los parámetros de fuente optimizados fueron los siguientes:

Positivo:

25 Temperatura de la cortina de gas 275 °C, flujo de gas 11 L min⁻¹, presión del nebulizador 40 psi, voltaje capilar 3500 V; voltaje de aceleración de la celda 4 V; voltaje fragmentador 380 V; el tiempo de permanencia varió entre 10 y 40 ms dependiendo del compuesto a analizar; resolución primer y segundo cuadrupolo 0,7 (unidad).

30 Negativo:

Temperatura de la cortina de gas 275 °C, flujo de gas 11 L min⁻¹, presión del nebulizador 40 psi, voltaje capilar 2800 V; voltaje de aceleración de la celda 4 V; voltaje fragmentador

380 V; el tiempo de permanencia varió entre 10 y 40 ms dependiendo del compuesto a analizar; resolución primer y segundo cuadrupolo 0,7 (unidad).

Se utilizaron varias transiciones específicas para determinar cada compuesto y, para cada transición, se optimizó la energía de colisión aplicada para detectar la mayor
5 intensidad posible.

Se utilizó una estación de trabajo de nombre comercial MassHunter (versión B.07.01) para la adquisición de datos. Para el procesamiento de datos se utilizaron el análisis cualitativo MassHunter (versión B.07.00) y el software de análisis cuantitativo (versión
10 B.07.00). Se seleccionaron las transiciones MRM más abundantes para cada analito como cuantificador y las otras transiciones como iones calificadores. Las curvas de calibración se realizaron en el rango de concentración de 50 a 0,0055 mg kg⁻¹.

Los resultados obtenidos de concentración (expresada en mg compuesto/100 g extracto
15 liofilizado piña) de ácido succínico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido cumárico y ácido ferúlico son los que se muestran en la tabla 4:

Tabla 4

	mg compuesto/100g extracto liofilizado piña	Valor Medio	Desviación estándar
Ácido succínico	1,19 1,19 1,21	1,198	0,014
Ácido gálico	0,03 0,03 0,03	0,030	0,002
Ácido siríngico	0,25 0,30 0,31	0,289	0,030
Ácido cumárico	0,08 0,08 0,08	0,0840	0,0003
Ácido ferúlico	0,25 0,24 0,24	0,245	0,003

20 La figura 1 muestra el espectro FTIR siglas que corresponden a “Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier”) del extracto liofilizado de piña, donde el eje de

abscisas corresponde al número de onda (expresado en cm^{-1}) y el eje de ordenadas corresponde a la intensidad de absorción:

En la figura 1 se identifican las principales bandas de absorción, las cuales corresponden a los siguientes grupos funcionales:

- 800-1400 cm^{-1} : Tensiones de flexión o estiramiento de carbohidratos
- 900-1150 cm^{-1} : Tensión estiramiento C-O y C-C
- 1200-1400 cm^{-1} : Flexión vibracional O-C-H, C-C-H, C-O-H de carbohidratos
- 10 - 600-900 cm^{-1} : huellas dactilares con deformación vibratoria del grupo C-H o CH_2 .
- 500-750 cm^{-1} : vibraciones de flexión $=\text{C-H}$ o de flexión C-C
- 700-720 cm^{-1} : Pigmentos (B-caroteno)
- 1338,5 cm^{-1} : C-OH Holocelulosa
- 1026,9 cm^{-1} : Tensiones de estiramiento C-O y O-H de los grupos éter e hidroxilo
- 15 de los polisacáridos
- 1234,2; 1341,2, 1414,5 cm^{-1} : Lignina; Tensiones de flexión vibracional O-C-H, C-C-H, C-O-H de los carbohidratos.
- 3000-3600 cm^{-1} : Tensiones de vibración y estiramiento O-H
- 3300-3400 cm^{-1} : Tensiones estiramiento N-H
- 20 - 2920-3100 cm^{-1} : $=\text{C-H}$; $-\text{C-H}$; CH_2 Carbonos alifático
- 1452,1 cm^{-1} : compuestos aromáticos
- 1593,9 cm^{-1} : Tensiones de estiramiento C=O, C=C
- 1714,4 cm^{-1} : Estiramiento C=O grupos acetilo, éster urónico de hemicelulosa o enlace éster de grupos carboxílico del ácido ferúlico y p-cumárico de la lignina
- 25 (ácidos carboxílicos, alcoholes y fenoles)
- 1600,2 cm^{-1} : Amidas

La figura 2 muestra el análisis termogravimétrico (TGA) del extracto liofilizado donde se representa en el eje de abscisas la temperatura (expresada en $^{\circ}\text{C}$) y en el eje de ordenadas la masa (expresada en %), mientras que en el eje de ordenadas secundario (derecha) se ha representado la primera derivada DTG (expresada en $\%/ \text{min}$). Así, en la figura 2 se observa un pico en torno a los 200°C correspondiente a la temperatura a la que se produce la máxima degradación del extracto, indicando que el extracto no es estable térmicamente por encima de los 200°C .

35

Además, se ha llevado a cabo un estudio de vida útil del extracto de piña liofilizado y

conservado al vacío en refrigeración, determinando su capacidad antioxidante mediante el método FRAP con el fin de verificar si se mantiene la capacidad antioxidante durante la conservación al vacío en refrigeración.

- 5 Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5 donde se indican la capacidad antioxidante, expresada en mg Trolox/ 100 g extracto piña liofilizado.

Tabla 5

	Mes 1	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 7	Mes 8	Mes 9
mg Trolox/ 100g aditivo	1022 ± 65	968 ± 12	1059 ± 41	997 ± 45	1031 ± 13	1080 ± 15	1047 ± 12

10

De los datos obtenidos se confirma que la capacidad antioxidante se mantiene, al menos, durante los 9 meses siguientes a la preparación del extracto de piña liofilizado y conservado al vacío en refrigeración.

- 15 Finalmente, se determinó el contenido en azúcares totales en el extracto liofilizado. Se obtuvo un valor medio de 2,084 mg de glucosa/g extracto liofilizado siendo el porcentaje de grados brix de 9,5-10,0% aproximadamente.

Purificación del extracto liofilizado obtenido a partir de subproductos de la piña

20

Para purificar el extracto que se obtiene de la piña se llevó a cabo una fermentación. Para ello, al extracto de piña liofilizado que se obtiene después del proceso de eliminación del etanol mediante el rotavapor, se le añadió levadura fresca de la marca Levital (2g por 150 mL de extracto), y se agitó con agitación magnética a 200 rpm a 32-
25 37°C durante 3 días. El vaso que contenía la disolución se cubrió con papel de aluminio para evitar la degradación de los polifenoles por la luz, es decir, la fermentación se realizó en un sistema cerrado.

30

Una vez pasados los 3 días se midió el porcentaje de grados brix para evaluar la cantidad de azúcares presentes en la disolución, obteniendo un porcentaje de 3,0-3,5%. El porcentaje inicial de grados brix era de 9,5-10,0%, por lo que se confirma que la fermentación ha conseguido reducir significativamente la concentración de azúcares.

Se filtró a vacío la disolución para eliminar los restos de la levadura, se congeló y se liofilizó preferentemente aplicando una temperatura de -55°C y una presión de 0,200 mbar durante aproximadamente 48h para conseguir el extracto seco liofilizado.

- 5 Se realizaron 4 métodos para evaluar el contenido total en polifenoles y la capacidad antioxidante y los resultados se muestran en la tabla 6. En este sentido DPPH corresponde a otro método de determinación de la capacidad antioxidante (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo).
- 10 Tabla 6. Datos de TPC y capacidad antioxidante de 3 muestras de extracto fermentado liofilizado (expresado en mg ácido gálico o Trolox/ 100g extracto fermentado liofilizado) de las muestras 1, 2 y 3 [La extracción se ha llevado a cabo mediante ultrasonidos aplicando las condiciones óptimas obtenidas previamente: Amplitud. 70%, tiempo: 5 minutos y número de ciclos = 2)]; y la comparación con los valores para el extracto liofilizado sin fermentar (muestra 4).

	TPC	FRAP	ABTS	DPPH
Extracto fermentado liofilizado, muestra 1	3562 ± 150	4838 ± 21	5783 ± 217	3698 ± 127
Extracto fermentado liofilizado, muestra 2	2245 ± 46	2860 ± 336	4309 ± 47	3097 ± 297
Extracto fermentado liofilizado, muestra 3	2873 ± 59	3375 ± 13	3223 ± 387	3527 ± 186
Extracto liofilizado sin fermentar, muestra 4	924 ± 75	1496 ± 25	1307 ± 27	1047 ± 24

- Tal como se puede observar, tanto la capacidad antioxidante, medido mediante FRAP, ABTS y DPPH, como el contenido total de polifenoles (TPC) es aproximadamente tres veces mayor en las muestras en las que se lleva a cabo el proceso de fermentación (muestras 1, 2 y 3).

- Los principales ácidos fenólicos también se analizaron en el extracto de piña fermentada liofilizado obteniendo los resultados que se muestran a continuación en la tabla 7:

25

Tabla 7: Concentración (mg compuesto/100 g extracto piña liofilizado fermentado) de ácido succínico, ácido gálico, ácido sirínigico, ácido cumárico y ácido ferúlico.

	mg compuesto/100g extracto piña liofilizado fermentado	media	s
Ácido succínico	1136,77	1120	20
	1124,85		
	1097,96		
Ácido gálico	0,06	0,063	0,002
	0,06		
	0,06		
Ácido sirínigico	1,17	1,201	0,079
	1,14		
	1,29		
Ácido cumárico	0,08	0,0800	0,0013
	0,08		
	0,08		
Ácido ferúlico	0,44	0,451	0,009
	0,45		
	0,46		

La figura 3 muestra el espectro FTIR del extracto de piña liofilizado fermentado, donde
 5 el eje de abscisas corresponde al número de onda (expresado en cm^{-1}) y el eje de ordenadas corresponde a la intensidad de absorción.

En la figura 3 se identifican las principales bandas de absorción, las cuales corresponden a los siguientes grupos funcionales:

- 10 - 800-1400 cm^{-1} : Tensiones de flexión o estiramiento de carbohidratos
- 900-1150 cm^{-1} : Tensión estiramiento C-O y C-C
- 1200-1400 cm^{-1} : Flexión vibracional O-C-H, C-C-H, C-O-H de carbohidratos
- 600-900 cm^{-1} : huellas dactilares con deformación vibratoria del grupo C-H o CH_2 .
- 500-750 cm^{-1} : vibraciones de flexión =C-H o de flexión C-C
- 15 - 700-720 cm^{-1} : Pigmentos (B-caroteno)
- 1338,5 cm^{-1} : C-OH Holocelulosa
- 1026,9 cm^{-1} : Tensiones de estiramiento C-O y O-H de los grupos éter e hidroxilo de los polisacáridos
- 1234,2; 1341,2, 1414,5 cm^{-1} : Lignina; Tensiones de flexión vibracional O-C-H,
- 20 C-C-H, C-O-H de los carbohidratos.
- 3000-3600 cm^{-1} : Tensiones de vibración y estiramiento O-H

- 3300-3400 cm^{-1} : Tensiones estiramiento N-H
- 2920-3100 cm^{-1} : =C-H; -C-H; CH_2 Carbonos alifático
- 1452,1 cm^{-1} : compuestos aromáticos
- 1593,9 cm^{-1} : Tensiones de estiramiento C=O, C=C
- 5 - 1712,5 cm^{-1} : Estiramiento C=O grupos acetilo, éster urónico de hemicelulosa o enlace éster de grupos carboxílico del ácido ferúlico y p-cumárico de la lignina (ácidos carboxílicos, alcoholes y fenoles). Esta banda se observa mayor en el caso del extracto fermentado al comparar con el extracto sin fermentar, lo que confirma la presencia más significativa de grupos fenólicos, tal como se observa
- 10 en los datos de capacidad antioxidante.
- 1585,2 cm^{-1} : Amidas

Estabilización del extracto liofilizado obtenido a partir de subproductos de la piña

- 15 Con el fin de encapsular el extracto liofilizado para estabilizarlo y protegerlo frente a la degradación por temperatura, se empleó proteína del suero de la leche comercial, de la marca ISOPURE (sin sabor) como agente encapsulante, adicionado glicerol al 10% en cada formulación generada con el fin de reforzar al agente de encapsulación.
- 20 La figura 4 muestra el espectro FTIR de la proteína del suero de la leche comercial utilizada, donde el eje de abscisas corresponde al número de onda (expresado en cm^{-1}) y el eje de ordenadas corresponde a la intensidad de absorción.
- Así, en la figura 4 se identifican las principales bandas de absorción, las cuales
- 25 corresponden a los siguientes grupos funcionales:

- 1513,8 cm^{-1} : Amida II (δ NH-, ν C-N) Enlace peptídico (CO-NH)
- 1630,5 cm^{-1} : Amida I (ν C=O-, ν C-N) Enlace peptídico (CO-NH)
- 1630,5 cm^{-1} : región amida primaria de las proteínas del suero
- 30 - 2928,4 cm^{-1} : vibraciones de estiramiento de los grupos enlace CH- CH_2 y CH- CH_3 de ácidos grasos presentes en los productos lácteos.
- 1200-1700 cm^{-1} : vibraciones de ácidos grasos, proteínas y polisacáridos.

- Se formularon tres dispersiones (P1, P2 y P3) formadas por el extracto de piña
- 35 liofilizado, preparado conforme a lo indicado previamente, a diferentes concentraciones

del agente encapsulante (proteína de leche, denominada WPI) tal como se muestra en la tabla 8. En todos los casos se adicionó un valor fijo del 5% p/v de extracto de piña liofilizado y la cantidad de glicerol añadida (10%).

- 5 Tabla 8. Composición de las diferentes formulaciones ensayadas para la estabilización del extracto de piña liofilizado.

	Tratamiento	Extracto liofilizado	WPI
	P1	5% p/v	3% p/v
	P2	5% p/v	6% p/v
10	P3	5% p/v	12% p/v

*WPI: Proteína de suero de leche

*Se añadió Glicerol al 10% p/v en todas las dispersiones

- Con el fin de proceder a la encapsulación del extracto liofilizado, previamente se calienta la proteína a 90°C en agua destilada y se mantiene en agitación durante 10 minutos, en frasco tapado para evitar la evaporación del agua. Posteriormente, opcionalmente se puede añadir el glicerol y se agita durante otros 10 minutos sin temperatura. Se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 40°C y se añade el extracto de piña liofilizado, manteniendo en agitación continua hasta su incorporación en el equipo de encapsulación.

- Para realizar la encapsulación se utilizó un equipo de atomización-secado - de referencia comercial Mini Spray Dryer B-290 (BUCHI Switzerland) - empleando las siguientes condiciones de trabajo: Temperatura de trabajo: $130 \pm 5^\circ\text{C}$, 100% de aspersion, flujo de 30 mL/min y 100 mL de solución total analizada. Las cápsulas obtenidas se almacenan a -20°C hasta su uso.

- En base a los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 9, es posible observar que el tratamiento P2 (6% p/v de proteína) mostró una mejor eficiencia de encapsulación (EE) y rendimiento de encapsulación (RE).

Tabla 9. Eficiencia y rendimiento de encapsulación.

Tratamiento	Concentración	Concentración	EE (%)	RE (%)
	Extracto (%)	WPI (%)		
P1	5	3	23 ± 3	44 ± 1
P2	5	6	69 ± 1	53 ± 3
P3	5	12	47 ± 4	48 ± 1

La eficiencia de encapsulación (EE) se calcula a partir de la relación entre el material activo encapsulado y el teórico o en disposición de ser encapsulado.

EE (%) = (Cantidad total de extracto en las microcápsulas/Cantidad total inicial de extracto) x 100

Por otro lado, el rendimiento de la encapsulación (RE) refleja el porcentaje de cápsulas obtenidas con respecto a la cantidad total de material (extracto activo + agente encapsulante) empleado.

10 Empleando las condiciones del tratamiento P2 (5% de extracto, 6% de WPI), se encapsuló el extracto liofilizado procedente de piña sin fermentar y el extracto liofilizado procedente de la piña fermentada.

15 Para determinar la eficiencia de extracción se realizó el ensayo TPC para la determinación de los polifenoles totales en el extracto inicial y en las cápsulas (Tabla 10).

20 Para realizar la extracción de los polifenoles de las cápsulas, se pesaron 200 mg de las microcápsulas, se añadió 1 mL de acetonitrilo y 1 mL de una solución de metanol: ácido acético: agua (50:8:42 v/v/v). Esta dispersión se agitó en vórtex durante 1 min y después se sometió a tratamiento por ultrasonidos dos veces durante 20 min. Se filtraron las muestras con filtros de 0,45µm. Una vez terminado el proceso se guardó el líquido y se almacenó en ausencia de luz y en refrigeración hasta su análisis.

25 Tabla 10. Eficiencia de encapsulación (%) para las cápsulas que contienen extracto de piña liofilizado fermentado y sin fermentar

	EE (%)
Extracto piña liofilizado sin fermentar	61 ± 3
Extracto piña liofilizado fermentado	50,9 ± 1,2

Además, se determinó la capacidad antioxidante tanto del agente encapsulante, como de las cápsulas con extracto de piña liofilizado sin fermentar y las capsulas con extracto de piña liofilizado fermentado.

5

Los resultados obtenidos son los que se muestran en la tabla 11:

Tabla 11. Capacidad antioxidante (mg trolox/100 g cápsulas) para las cápsulas que contienen extracto de piña liofilizado fermentado y sin fermentar

	FRAP	ABTS
Agente encapsulante (WPI)	87,1 ± 0,8	-
Cápsulas con extracto liofilizado sin fermentar	430 ± 9	485 ± 13
Cápsulas con extracto liofilizado fermentado	1651 ± 19	1667 ± 41

10

De los resultados de la tabla 11 se concluye que las cápsulas preparadas a partir de extracto liofilizado fermentado presentan una capacidad antioxidante hasta tres veces superior al valor medido para las capsulas de extracto liofilizado sin fermentar.

15 Las figuras 5 y 6 muestran los espectros FTIR de las cápsulas con extracto liofilizado sin fermentar y las cápsulas con extracto liofilizado fermentado, respectivamente. De nuevo, en ambos espectros se representa en el eje de abscisas el número de onda (expresado en cm^{-1}) y en el eje de ordenada la intensidad de absorción.

20 2. Preparación de los materiales con extracto antioxidante sin encapsular procedente de subproductos de la piña.

Los materiales se prepararon empleando la técnica de extrusión. En primer lugar, para la fabricación de probetas microinyectadas a escala laboratorio se utilizó una mini
25 extrusora de doble usillo de laboratorio MC 15 (Xplore) acoplada a una micro inyectora IM 5.5 (Xplore). Las formulaciones procesadas fueron basadas en el polímero PCL.

En concreto se fabricó un control, consistente únicamente en PCL (Capa 6500D, Ingevity) y probetas con diferentes porcentajes en peso de extracto de piña liofilizado
30 fermentado y sin fermentar (10 y 15 %).

El perfil de temperaturas utilizado en la extrusora fue de 60 – 65 – 70°C con una velocidad de husillos de 100 rpm un tiempo de residencia de 4 min con un aporte constante de nitrógeno para evitar posibles degradaciones.

- 5 En lo que respecta a las condiciones de inyección se utilizó una temperatura de inyección de 60°C. En las probetas se utilizó unas presiones de inyección y unos tiempos de inyección de 4 – 4 - 4 bar y 1 – 0,05 - 4 s, respectivamente. Se muestran, como ejemplo, en la figura 7 los materiales de PCL con un 10% de extracto liofilizado fermentado.

10

De los mencionados materiales, se muestran los espectros FTIR obtenidos (figuras 8 a 12), de forma que - siendo la figura 8 el material de control, donde el eje de abscisas corresponde al número de onda (expresado en cm^{-1}) y el eje de ordenadas corresponde a la intensidad de absorción - se confirma que tras el procesado por extrusión en los espectros de las figuras 9-12 se muestra presencia del extracto de piña liofilizado fermentado.

15

De nuevo, en los espectros FTIR de las figuras 8-12 se representa en el eje de abscisas el número de onda (expresado en cm^{-1}) y en el eje de ordenadas se representa la intensidad de absorción.

20

Se muestra a continuación la asignación de las principales bandas de absorción a los grupos funcionales correspondientes:

25

- 2941,9 cm^{-1} : Estiramiento $-\text{CH}_2$ asimétrico
- 2864,7 cm^{-1} : Estiramiento $-\text{CH}_2$ simétrico
- 1719,2 cm^{-1} : Estiramiento tensión carbonilo $-\text{C}=\text{O}$
- 1239,0 cm^{-1} : Estiramiento $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ asimétrico
- 1160,9 cm^{-1} : Estiramiento $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ simétrico

30

La figura 9 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 10% extracto liofilizado sin fermentar.

La figura 10 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 15% extracto liofilizado sin fermentar.

35

La figura 11 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 10% extracto

lío filizado fermentado.

La figura 12 corresponde al espectro FTIR del material PCL CAPA 6500 + 15% extracto lío filizado fermentado.

- 5 Como se puede observar en las figuras 9-12, en las que el eje de abscisas corresponde al número de onda (expresado en cm^{-1}) y el eje de ordenadas corresponde a la intensidad de absorción, las principales bandas de absorción que se observan son las mismas que aparecen en el espectro de la PCL CAPA 6500 control (figura 8), a excepción de la banda ancha que aparece en la zona de aproximadamente de 3000-
10 3500 cm^{-1} , relacionada con las tensiones de vibración y estiramiento del grupo funcional O-H que confirma la presencia del extracto antioxidante de piña lío filizado en el material.

Además, también se muestran en las figuras 14 y 15 los resultados del análisis termogravimétrico (TGA) de los materiales que incluyen un 10% de extracto lío filizado sin fermentar y un 15% de extracto lío filizado sin fermentar, respectivamente. En el
15 análisis TGA de las figuras 13-15 se representa en el eje de abscisas la temperatura (expresada en $^{\circ}\text{C}$) y en el eje de ordenadas la masa (expresada en %), mientras que en el eje de ordenadas secundario se representa la primera derivada del peso de la muestra respecto al tiempo.

20

Así, de nuevo, se confirma la presencia del extracto antioxidante de piña lío filizada en los materiales analizados en las figuras 14 y 15 donde se observa la presencia de la banda relacionada con la pérdida de masa en torno a los 200°C . Dicha banda no aparece en la figura 13 que corresponde a la muestra de control (cuyo espectro FTIR
25 corresponde a la figura 8).

Con el fin de conocer la capacidad antioxidante de los materiales desarrollados (procesados con extracto de piña tanto fermentado como sin fermentar, pero ambos sin encapsular), dichos materiales se analizaron mediante el método FRAP. Para ello, se
30 cortaron los materiales en trozos pequeños y se sumergieron en una disolución de etanol al 70%. Se tapó la disolución y se dejaron macerar durante 2 días en una estufa a 40°C .

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos del método FRAP (mg Trolox/100g
35 material) para los materiales de PCL con 10 y 15% de extracto de piña lío filizado sin

fermentar.

Tabla 12.

	PCL + 10% extracto piña lío filizado sin fermentar	PCL + 15% extracto piña lío filizado sin fermentar
Maceración EtOH 70%	76 ± 6	105 ± 1

5

También se evaluó la capacidad antioxidante de los materiales de PCL con 10 y 15 % extracto de piña lío filizado fermentado (sin encapsular), tanto por el método FRAP como por el método ABTS, tras el mismo procedimiento de maceración descrito anteriormente.

- 10 Los resultados del FRAP y ABTS (expresados en mg Trolox/100g material) para los materiales de PCL sin aditivos y con un 10% y 15% de extracto de piña lío filizado fermentado se muestran a continuación en la tabla 13.

Tabla 13

15

	FRAP	ABTS
PCL control sin aditivos	4,09 ± 0,03	12,2 ± 0,4
PCL + 10% extracto piña lío filizado fermentado	119 ± 7	139 ± 6
PCL + 15% extracto piña lío filizado fermentado	239 ± 12	295 ± 6

Tal como se puede observar tras los resultados obtenidos de capacidad antioxidante, el proceso de fermentación es indispensable para aumentar considerablemente la capacidad antioxidante de los materiales desarrollados.

20

3. Preparación de los materiales con extracto antioxidante encapsulado procedente de subproductos de la piña.

25

En primer lugar, se desarrollaron las películas flexibles de PCL incorporando, por extrusión, el extracto de piña sin fermentar encapsulado. En la tabla 14 se muestran los resultados relativos a la capacidad antioxidante de las películas flexibles que contienen cápsulas de extracto de piña lío filizado sin fermentar (5, 10 y 15% en peso de cápsulas):

Tabla 14. mg Trolox/100g película flexible con cápsulas de extracto de piña sin fermentar

Concentración de cápsulas	FRAP	ABTS
5%	14,8 ± 0,5	5,3 ± 0,6
10%	28,7 ± 0,3	32,29 ± 0,18
15%	44,8 ± 0,7	80 ± 4

Claramente, se observa un aumento en la capacidad antioxidante de los materiales a medida que aumenta la concentración de cápsulas en los mismos.

En las figuras 16, 17 y 18 se muestran los espectros FTIR de un material de película flexible de PCL con un porcentaje de 5, 10 y 15% de capsulas de extracto de piña liofilizado sin fermentar, respectivamente. El eje de abscisas de los espectros FTIR corresponde al número de onda (expresado en cm^{-1}) y el eje de ordenada corresponde a la intensidad de absorción.

Tal y como se puede observar en las figuras 16, 17 y 18, las principales bandas de absorción que se observan son las mismas que aparecen en el espectro de la PCL CAPA 6500 control (figura 8), a excepción de la banda ancha que aparece en la zona de aproximadamente de $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, relacionada con las tensiones de vibración y estiramiento del grupo funcional O-H presente en las figuras 16-18 que, de nuevo, confirma la presencia del extracto de piña en el material.

Así, se identifica la banda ancha correspondiente al grupo funcional OH en los siguientes números de onda:

	Número de onda (cm^{-1})
Proteína (agente encapsulante)	3276,4653
Cápsula de proteína con extracto sin fermentar	3276,4653
5% cápsulas extracto sin fermentar. Figura 16	3438,4566
10% cápsulas extracto sin fermentar. Figura 17	3438,4566
15% cápsulas extracto sin fermentar. Figura 18	3440,3850

Para confirmar la presencia de la cápsula de proteína en los materiales desarrollados, los picos más característicos de la proteína se asocian con un doble enlace y aparecen

próximos a los 1550 y 1650 cm^{-1} , asociados a Amida II y Amida I, respectivamente. También existe otro pico significativo sobre 3300 cm^{-1} asociado al estiramiento del enlace N-H de las proteínas. En este caso este pico aparece sobre 3400 cm^{-1} , con muy poca intensidad.

5

Las figuras 19, 20 y 21 corresponden a los termogramas de los materiales de PCL con un 5, 10 y 15% de cápsulas con extracto de piña sin fermentar en los que se observa que el material es estable hasta los 400°C, al igual que la PCL sola. En los termogramas se representa en el eje de abscisas la temperatura (expresada en °C) y en el eje de ordenadas la masa (expresada en %), estando representado en el eje de ordenadas secundario la primera derivada (DTG, expresada en %/min).

Es decir, se concluye que la incorporación de las cápsulas a la matriz polimérica no conduce a un empeoramiento de las propiedades térmicas del material, sino que las mantiene iguales que el material base de PCL sin cápsulas antioxidantes, algo que es muy importante para la aplicación de envase activo al que va destinado el material desarrollado.

La temperatura de inicio de degradación de la PCL es 378°C y su temperatura máxima de degradación es de 410°C. La temperatura de máxima degradación de la proteína usada como agente encapsulante es de 315°C y la del extracto activo de 196°C.

En segundo lugar, se desarrollaron las películas flexibles de PCL incorporando, por extrusión, el extracto de piña fermentado y encapsulado.

25

La tabla 15 muestra los resultados relativos a la capacidad antioxidante de los materiales desarrollados.

Tabla 15. mg Trolox/100g película flexible con cápsulas de extracto de piña fermentado

30

Concentración de cápsulas	FRAP	ABTS
5%	22,5 ± 0,7	30,5 ± 1,0
10%	40,5 ± 1,2	72,7 ± 1,5
15%	68,5 ± 3,1	113,1 ± 0,9

Claramente, se observa un aumento en la capacidad antioxidante de los materiales al

comparar los que contienen extracto fermentado con los materiales que incorporan extracto sin fermentar. Igualmente, la capacidad antioxidante aumenta a medida que aumenta la concentración de cápsulas en el material.

- 5 Las figuras 22, 23 y 24 muestran los espectros FTIR de los materiales preparados. De nuevo, tal y como se puede observar en las citadas figuras, en las que el eje de abscisas corresponde al número de onda (expresado en cm^{-1}) y el eje de ordenadas corresponde a la intensidad de absorción, las principales bandas de absorción que se observan son las mismas que aparecen en el espectro de la PCL CAPA 6500 control (figura 8), a
10 excepción de la banda ancha que aparece en la zona de aproximadamente de 3000-3500 cm^{-1} , relacionada con las tensiones de vibración y estiramiento del grupo funcional O-H que, de nuevo, confirma la presencia del extracto en el material.

- En cuanto a los análisis termogravimétricos (TGA) llevados a cabo sobre los materiales,
15 en las figuras 25 y 26 se observan los termogramas de los materiales de PCL con un 10 y 15% de cápsulas con extracto de piña fermentado en los que se observa que el material es estable hasta los 400°C, al igual que la PCL sola.

- En los termogramas TGA se representa en el eje de abscisas la temperatura (expresada
20 en °C) y en el eje de ordenadas la masa (expresada en %), estando representado en el eje de ordenadas secundario la primera derivada (DTG) (expresada en %/min).

- Se concluye que la incorporación de las cápsulas a la matriz polimérica no conduce a un empeoramiento de las propiedades térmicas del material, sino que las mantiene
25 iguales que el material base de PCL sin cápsulas antioxidantes, algo que es muy importante para la aplicación de envase activo al que va destinado el material desarrollado.

REIVINDICACIONES

1. Extracto caracterizado por que es un extracto de piña liofilizado fermentado que comprende:
- 5 - entre 600 y 1800 mg de ácido succínico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado,
 - entre 0,03 y 0,09 mg de ácido gálico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado,
 - entre 0,6 y 1,8 mg de ácido sirínigico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado,
 - 10 - entre 0,04 y 0,12 mg de ácido cumárico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado, y
 - entre 0,225 y 0,680 mg de ácido ferúlico por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado,
 - 15
- de forma que el extracto procede de subproductos de piña y es un extracto antioxidante con un contenido total de polifenoles (TPC) de, al menos, 2245 mg Trolox por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado.
- 20 2. Material de envasado caracterizado por que comprende policaprolactona (PCL) reforzada con el extracto antioxidante liofilizado fermentado, según reivindicación 1ª, el cual está encapsulado y donde el extracto está presente en, al menos, un 10% de su peso total, constituyendo un material con un contenido total de polifenoles (TPC) de, al menos, 115 mg Trolox/100g material.
- 25
3. Material de envasado, según reivindicación 2ª, caracterizado por que el subproducto de la piña está constituido por tronco de piña.
4. Material de envasado, según reivindicación 2ª, caracterizado por que es una película
- 30 flexible.
5. Material de envasado, según reivindicación 2ª, caracterizado por que es transparente y presenta un espesor entre. 0,080 mm y 0,120 mm.
- 35 6. Procedimiento de fabricación del extracto, conforme a la reivindicación 1ª,

caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- Molturado del subproducto de piña congelado y deshidratación del molturado a una temperatura entre 25°C y 40°C durante, al menos, 48h.
- 5 - Adición de una disolución acuosa de etanol con una concentración de, al menos, el 50% al subproducto de piña molturado y deshidratado obtenido en la etapa anterior,
- Extracción asistida por ultrasonidos aplicando una amplitud de, al menos, 65%, y manteniendo la temperatura por debajo de 45°C,
- 10 - Centrifugación del subproducto de la piña,
- Recuperación del sobrenadante que corresponde al extracto de la piña,
- Eliminación de etanol contenido en el sobrenadante aplicando vacío y una temperatura máxima de 40°C, obteniendo el extracto de piña,
- Adición de levadura fresca al extracto de piña,
- 15 - Fermentación mediante agitación de la disolución obtenida en la etapa anterior en un sistema cerrado a una temperatura entre 32°C y 37°C durante, al menos, 3 días,
- Filtrado de la disolución, eliminando restos de levadura, obteniendo una disolución de extracto de piña fermentado,
- 20 - Congelación de la disolución de extracto de piña fermentado a una temperatura menor o igual de -20°C,
- Liofilización y obtención de un extracto de piña liofilizado en polvo,

Donde la extracción asistida por ultrasonidos presenta un rendimiento de, al menos, el 45% y el extracto de piña liofilizado en polvo obtenido es antioxidante, está fermentado y presenta un contenido total de polifenoles (TPC) de, al menos, 2245 mg Trolox por 100g de extracto de piña liofilizado fermentado.

25

7. Procedimiento de fabricación del extracto, según reivindicación 6^a, caracterizado por que en la extracción asistida por ultrasonidos se aplica un tiempo de extracción de 5 minutos y, al menos, un número de ciclos igual a 2.

30

8. Procedimiento de fabricación del extracto, según reivindicación 6^a, caracterizado por que la centrifugación del subproducto de piña se realiza durante, al menos, 10 min a una velocidad de, al menos, 4000 rpm.

35

9. Procedimiento de fabricación del extracto, según reivindicación 6ª, caracterizado por que en la fermentación se aplica una agitación de, al menos, 200 rpm.
10. Procedimiento de fabricación del extracto, según reivindicación 6ª, caracterizado por
5 que en la liofilización se aplica una temperatura entre -55°C y -35°C y una presión entre 0,200 y 0,5 mbar durante aproximadamente 48h.
11. Procedimiento de fabricación del material de envasado, según la reivindicación 2ª, caracterizado por que tras la liofilización y obtención del extracto de piña liofilizado en
10 polvo, según reivindicación 6ª, se realizan las siguientes etapas para la obtención del material según cualquiera de las reivindicaciones de 2ª a 5ª:
- Dispersión de una disolución de agente encapsulante junto con el extracto de piña liofilizado, y atomización-secado mediante una corriente de aire a temperatura mayor de 100°C, obteniendo unas capsulas sólidas que contienen
15 el extracto de piña liofilizado en su interior.
 - Extrusión de las cápsulas sólidas que contienen el extracto de piña liofilizado en su interior con PCL para obtener un material de envasado,
- estando el extracto de piña liofilizado presente en, al menos, un 10% del material de envasado y donde el material de envasado presenta una capacidad antioxidante y un
20 contenido total de polifenoles tres veces mayor que un material obtenido sin la etapa de fermentación.
12. Procedimiento de fabricación del material de envasado, según reivindicación 11ª, caracterizado por que en la dispersión de la disolución de agente encapsulante junto
25 con el extracto de piña liofilizado se adiciona glicerol.
13. Procedimiento de fabricación del material de envasado, según reivindicación 11ª, caracterizado por que el agente encapsulante es una proteína de leche.
- 30 14. Procedimiento de fabricación del material de envasado, según reivindicación 11ª, caracterizado por que la extrusión se lleva a, al menos, 60°C y con unas presiones y tiempos de inyección de 4 – 4 - 4 bar y 1 – 0,05 - 4 s, respectivamente.
- 35 15. Uso del material de envasado, según cualquiera de las reivindicaciones 2ª a 5ª, en envasado de alimentos grasos para aumentar su vida útil.

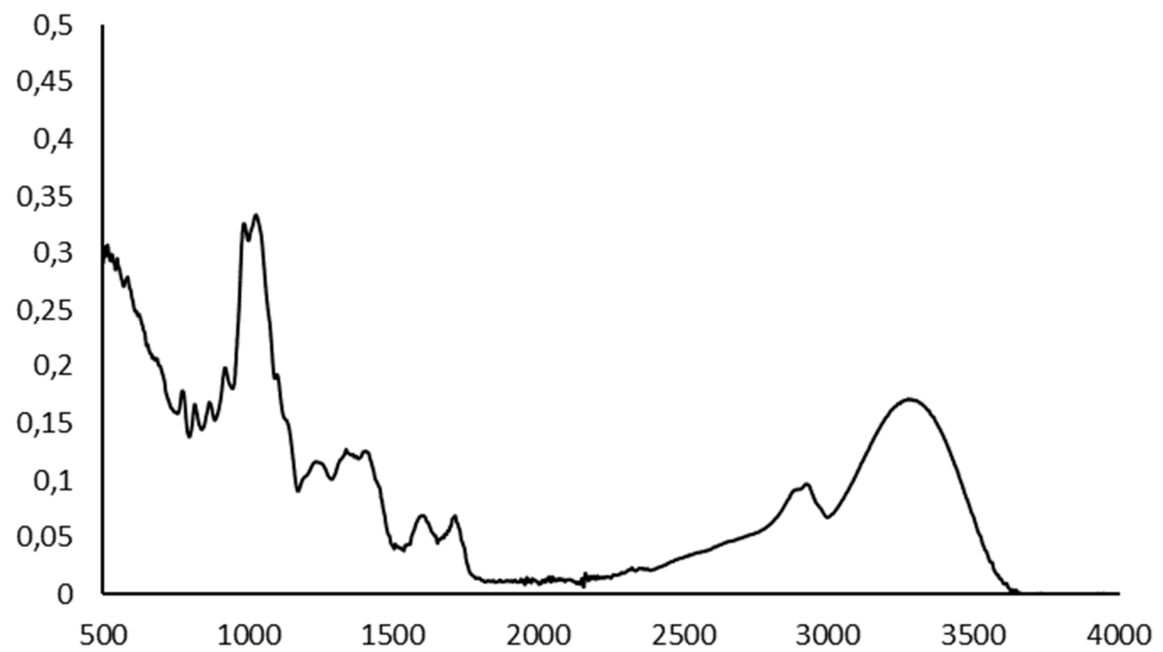


FIG. 1

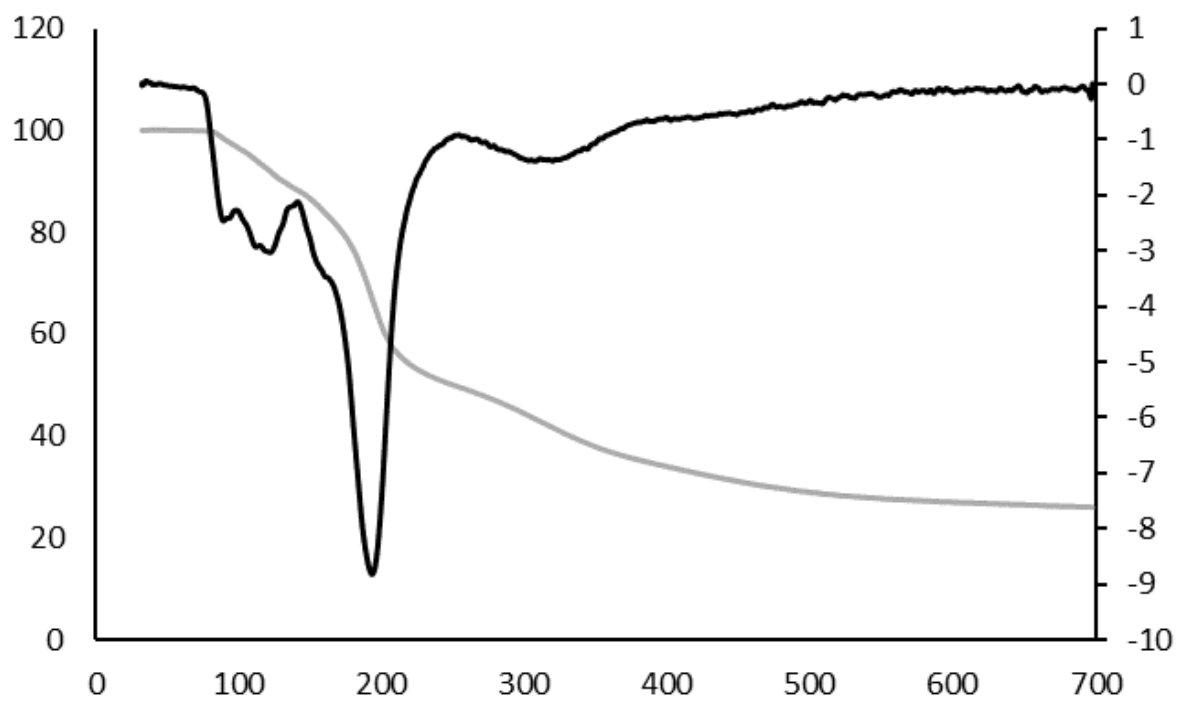


FIG. 2

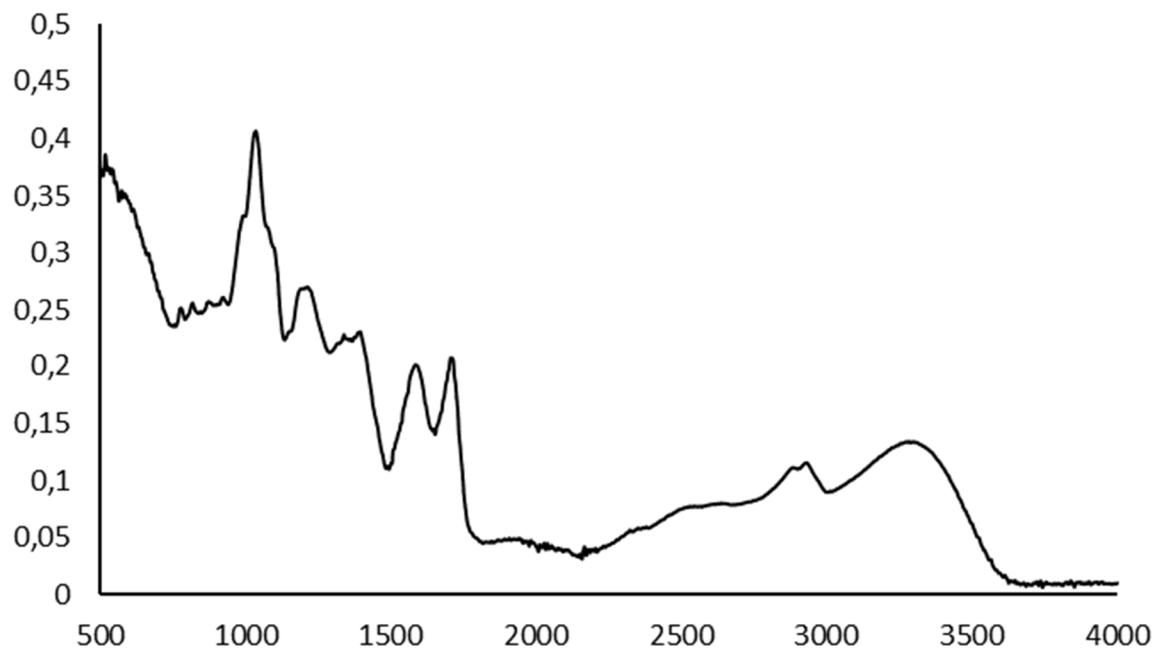


FIG. 3

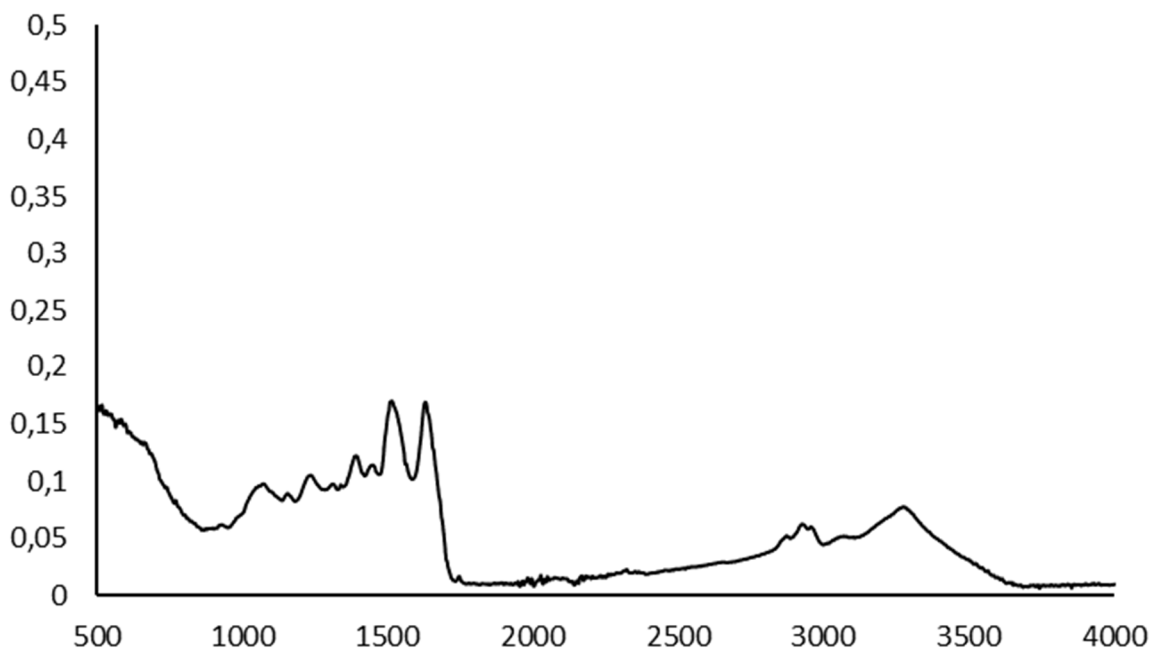


FIG. 4

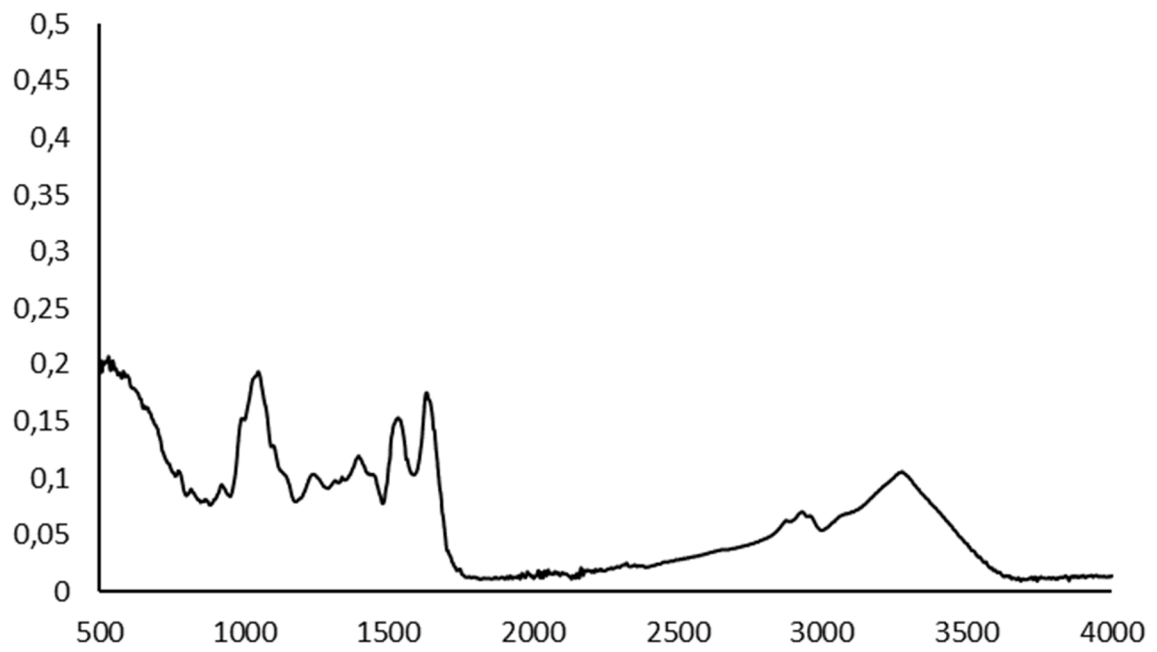


FIG. 5

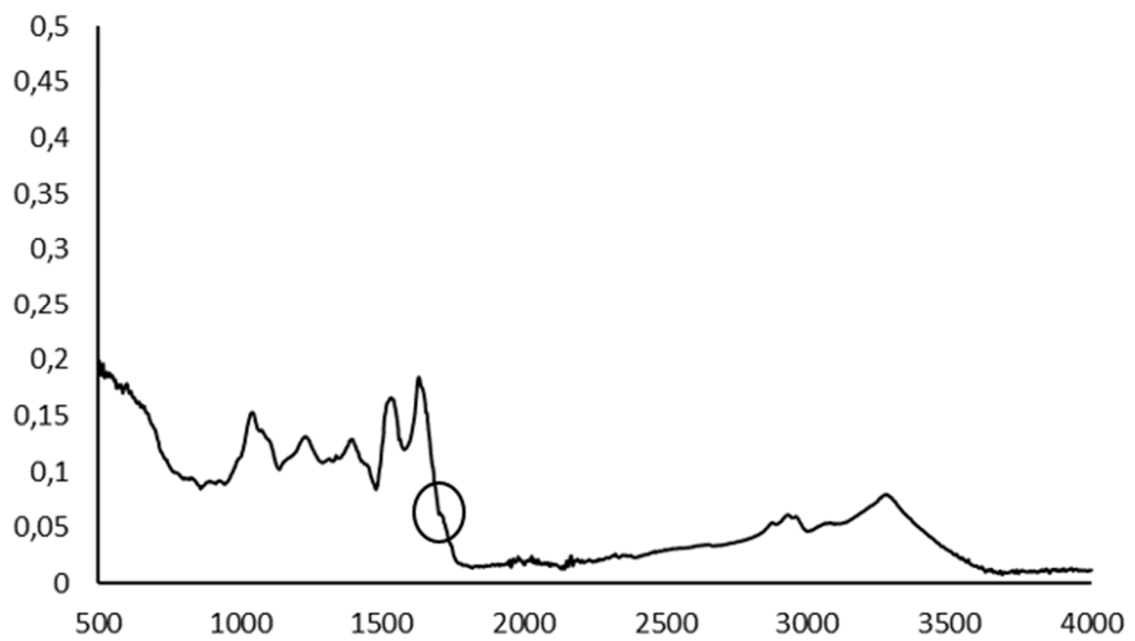


FIG. 6

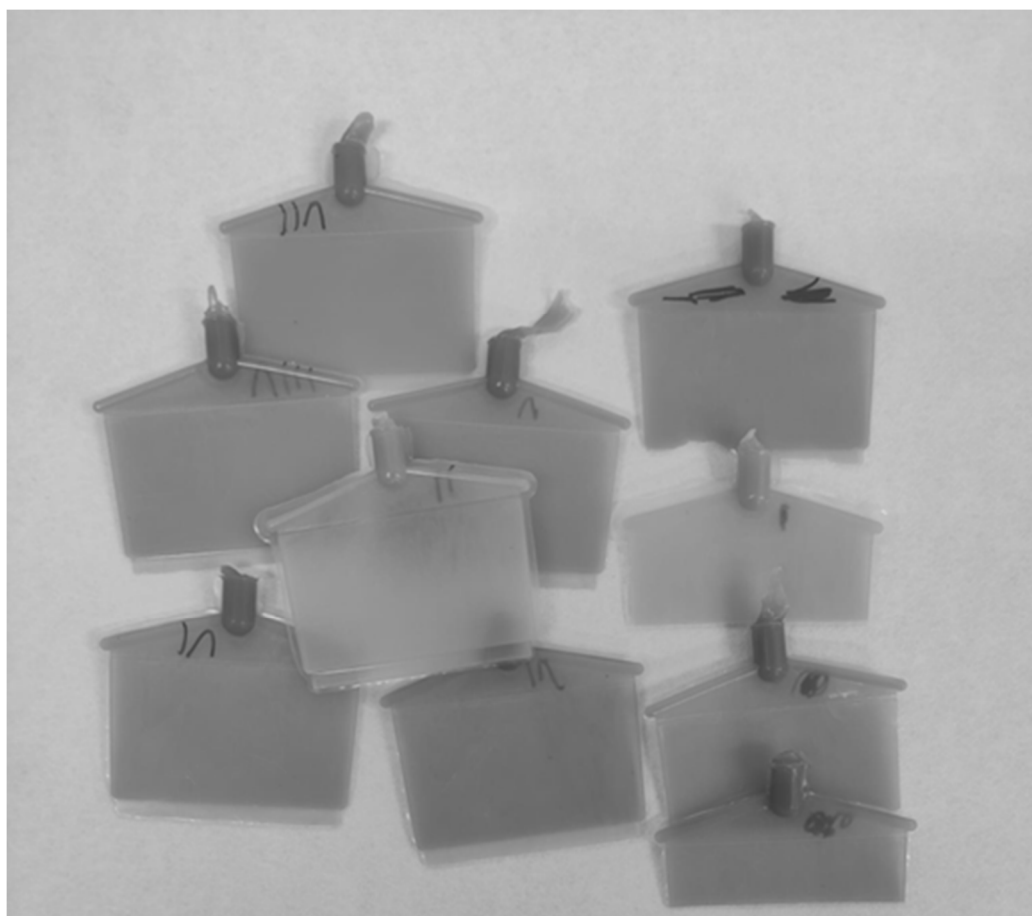


FIG. 7

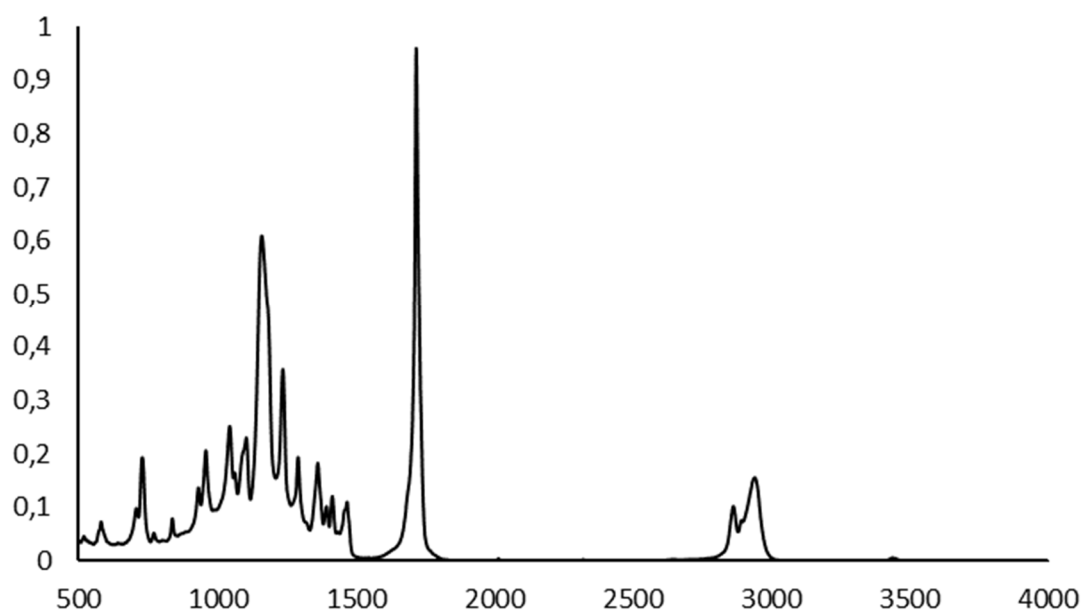


FIG. 8

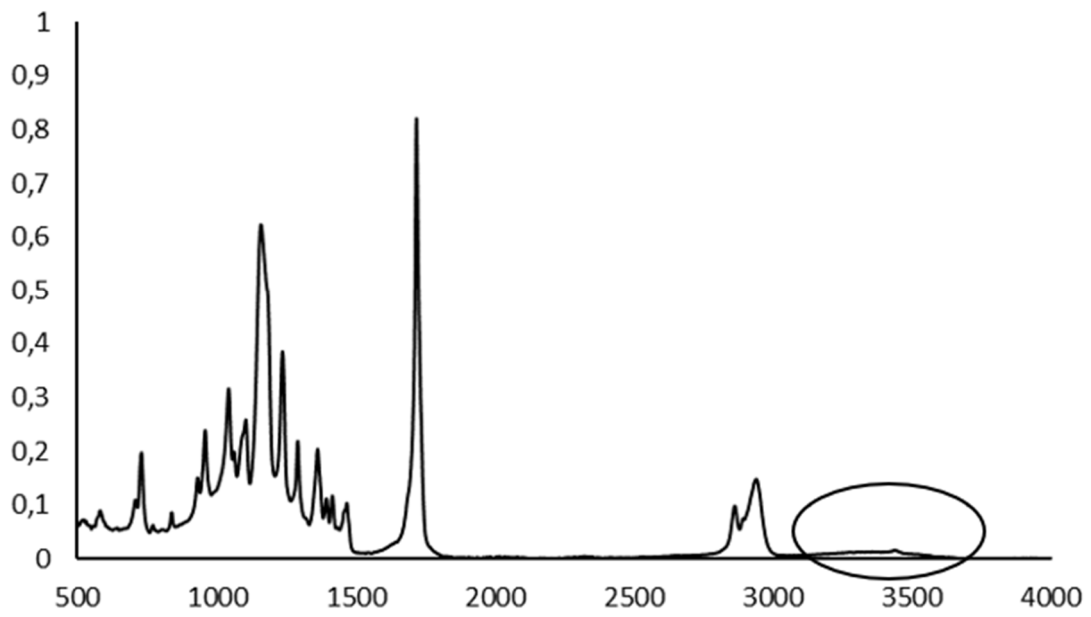


FIG. 9

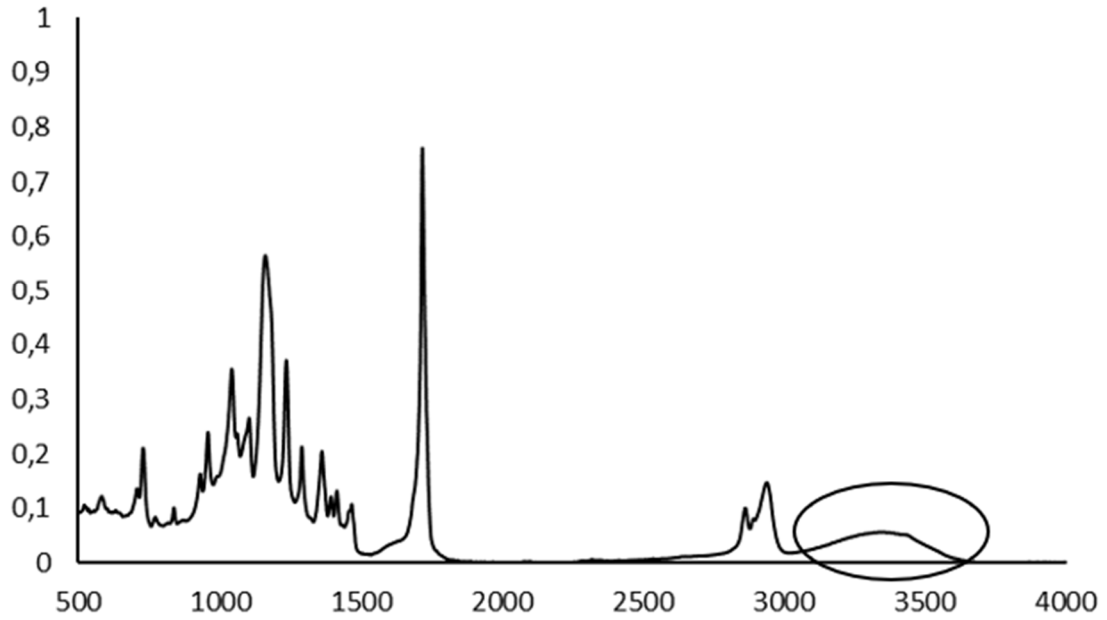


FIG. 10

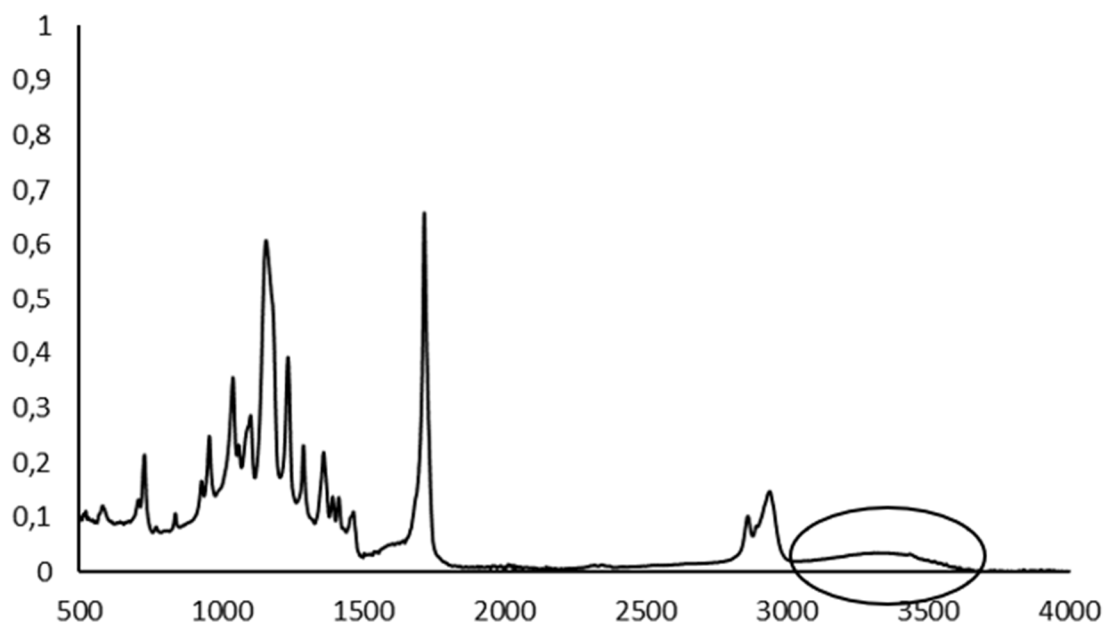


FIG. 11

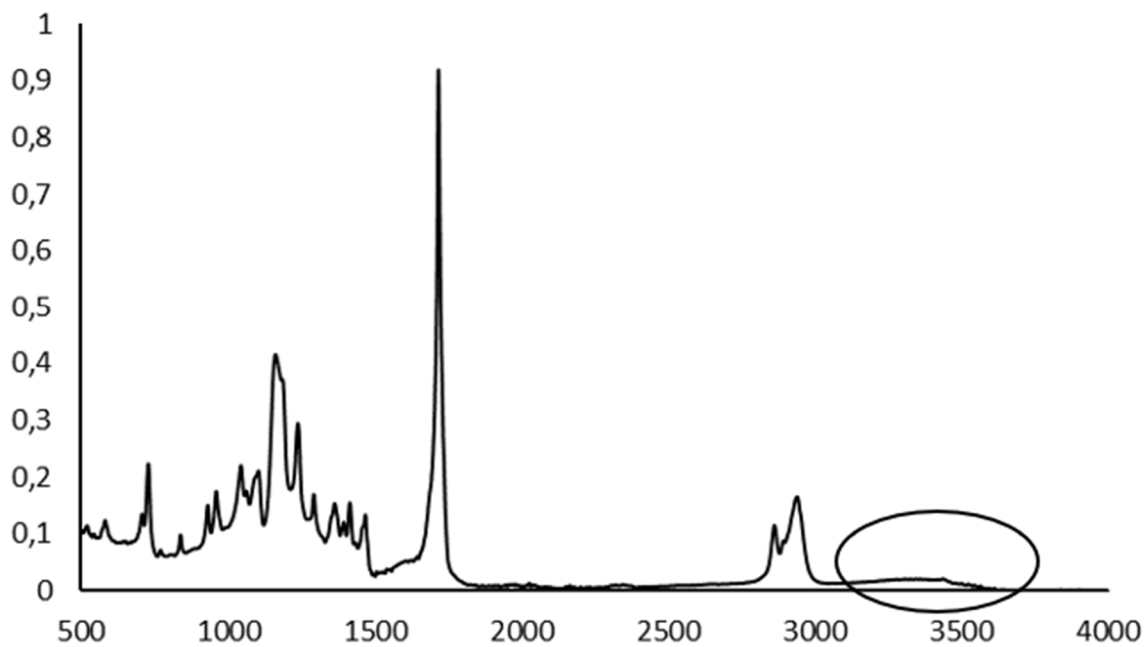


FIG. 12

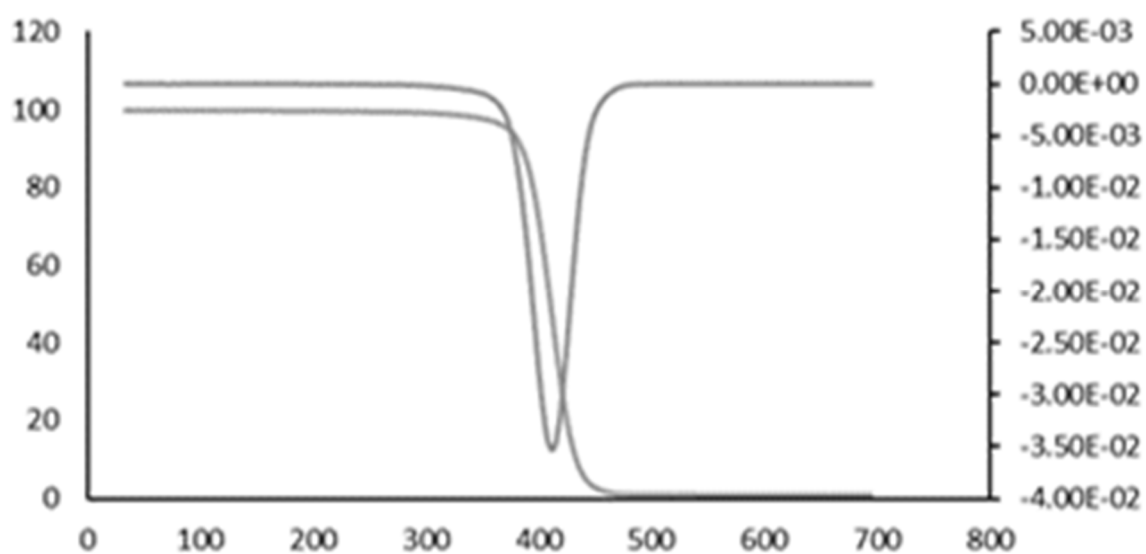


FIG. 13

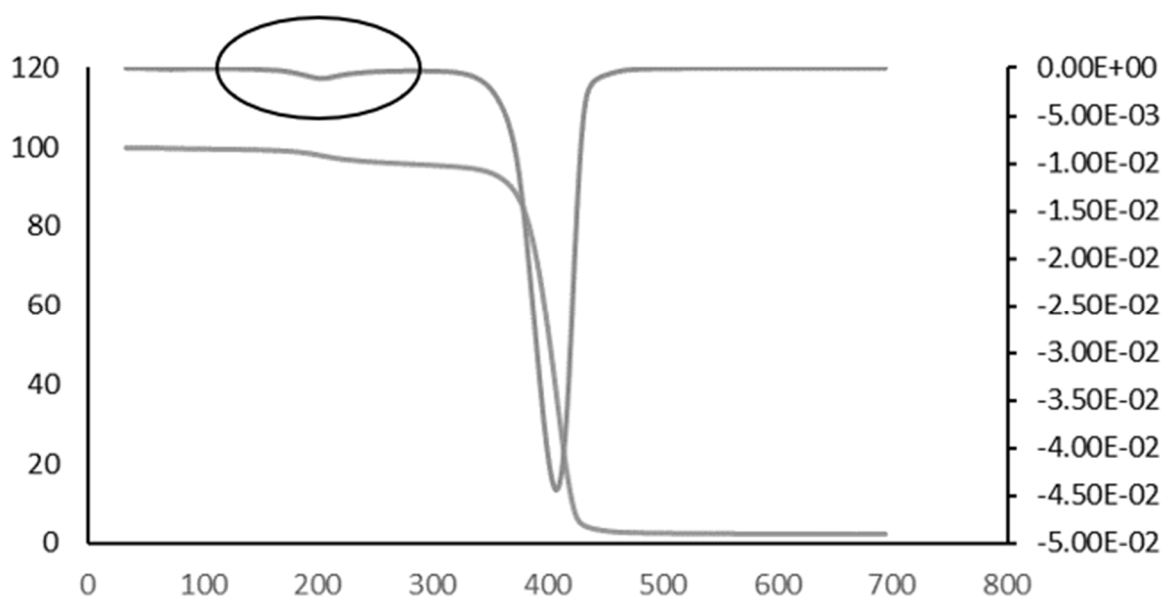


FIG. 14

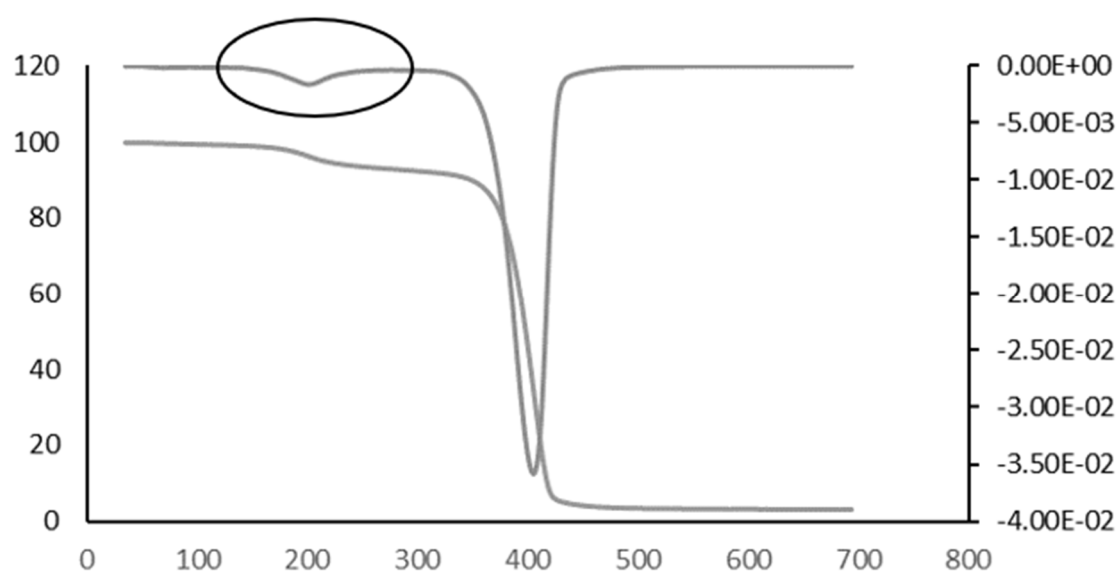


FIG. 15

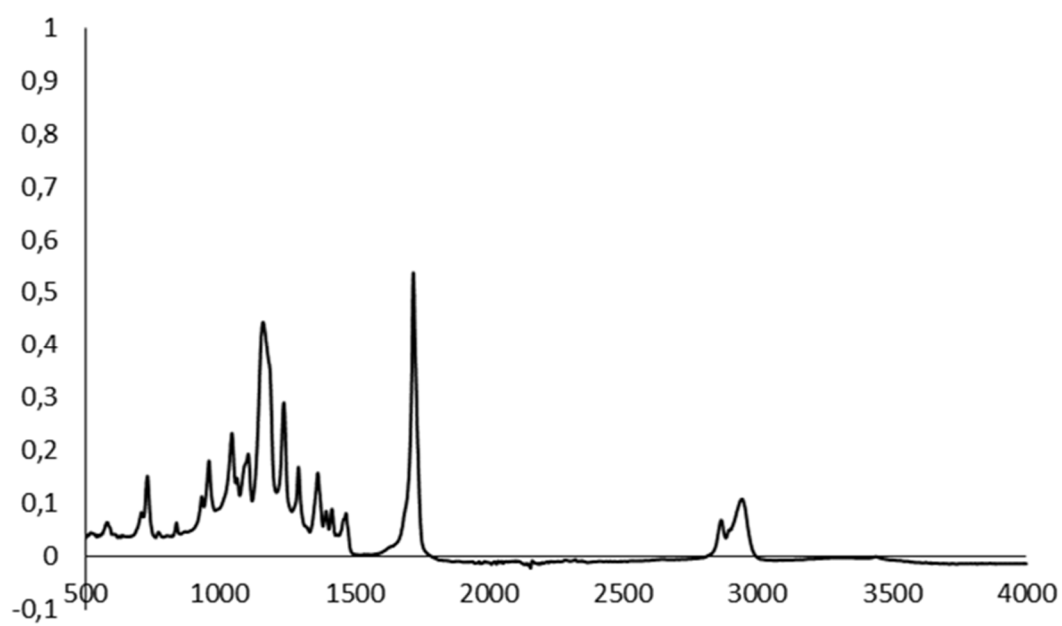


FIG. 16

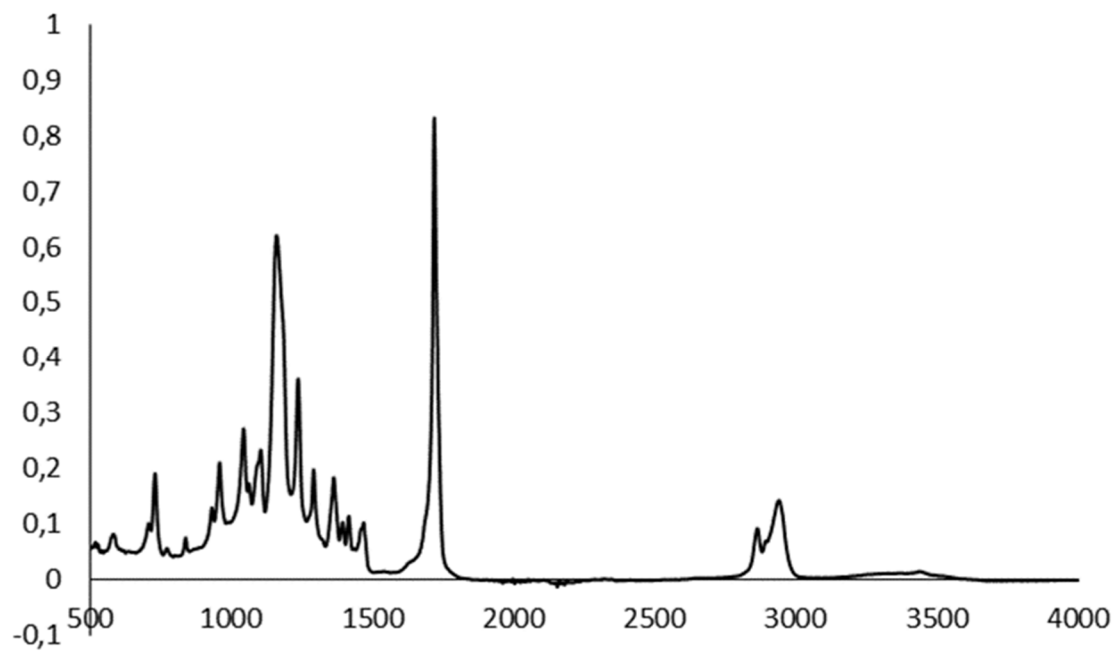


FIG. 17

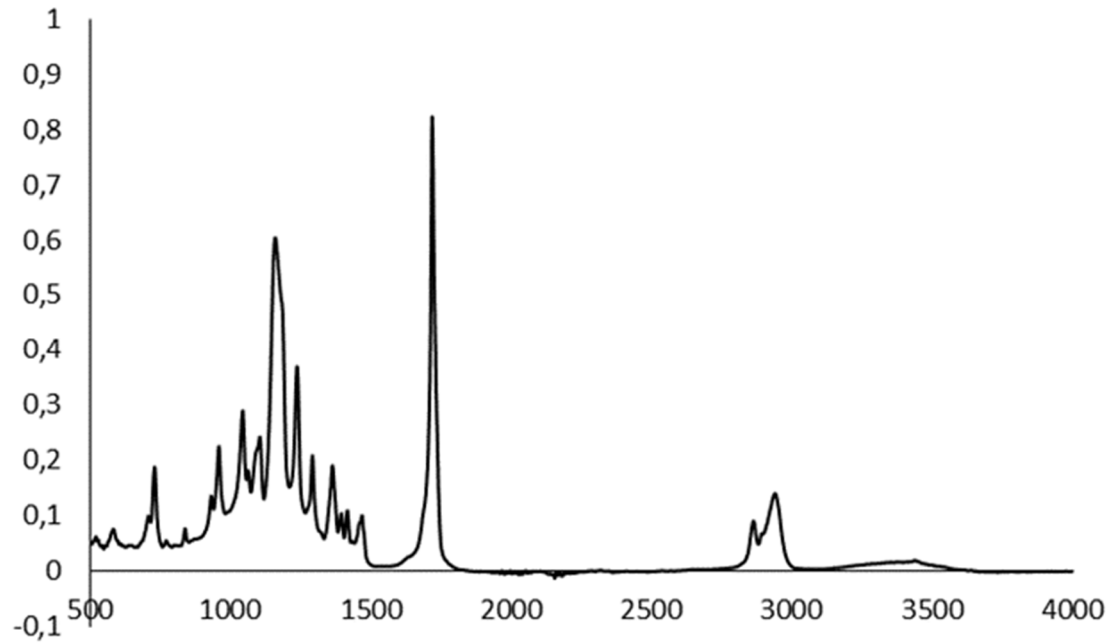


FIG. 18

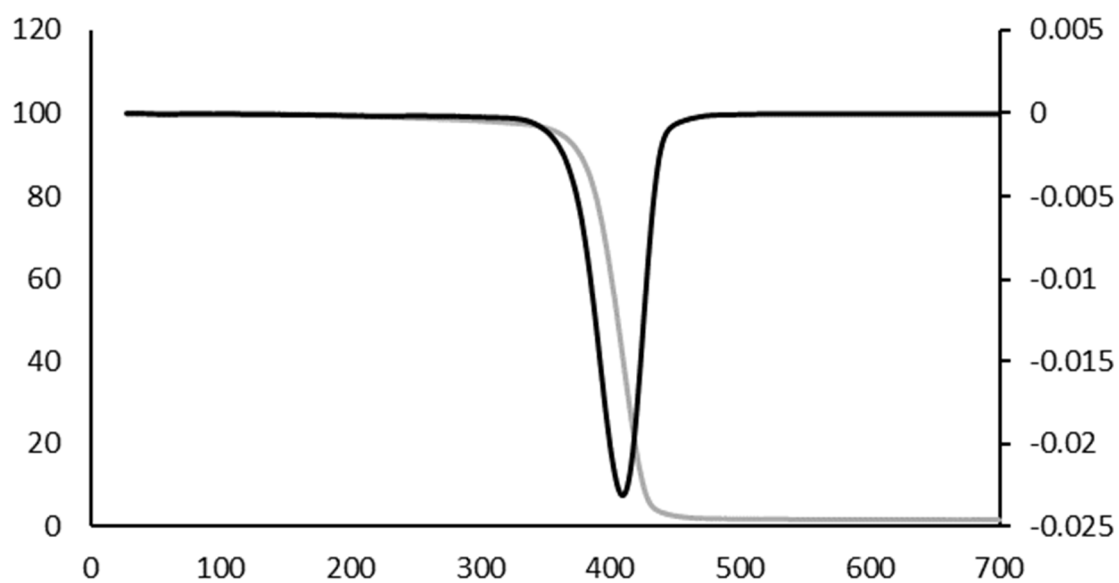


FIG. 19

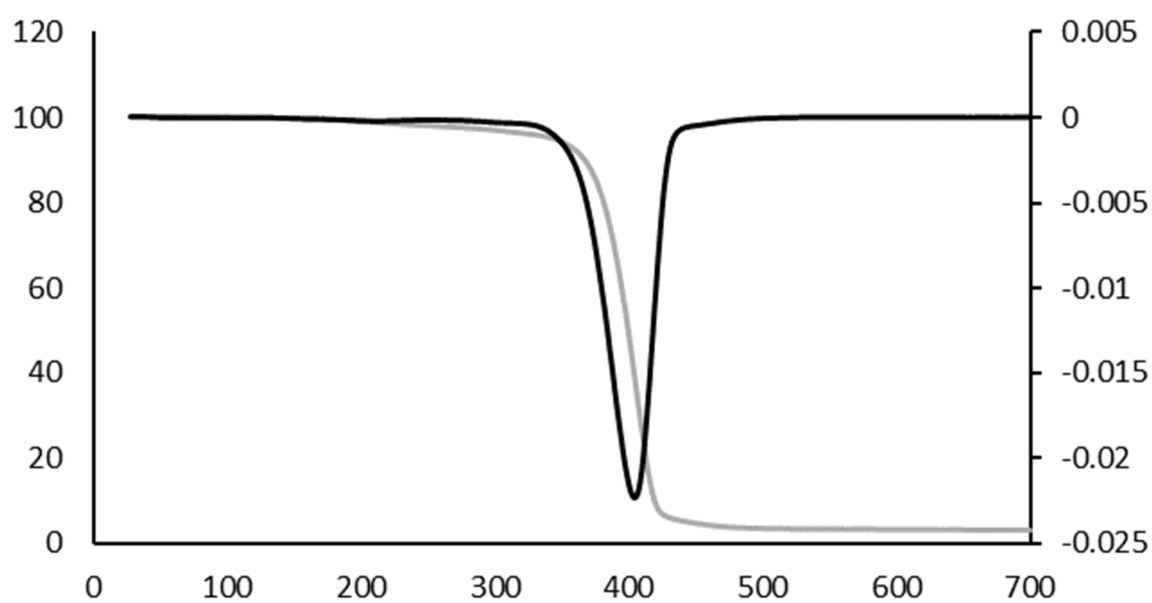


FIG. 20

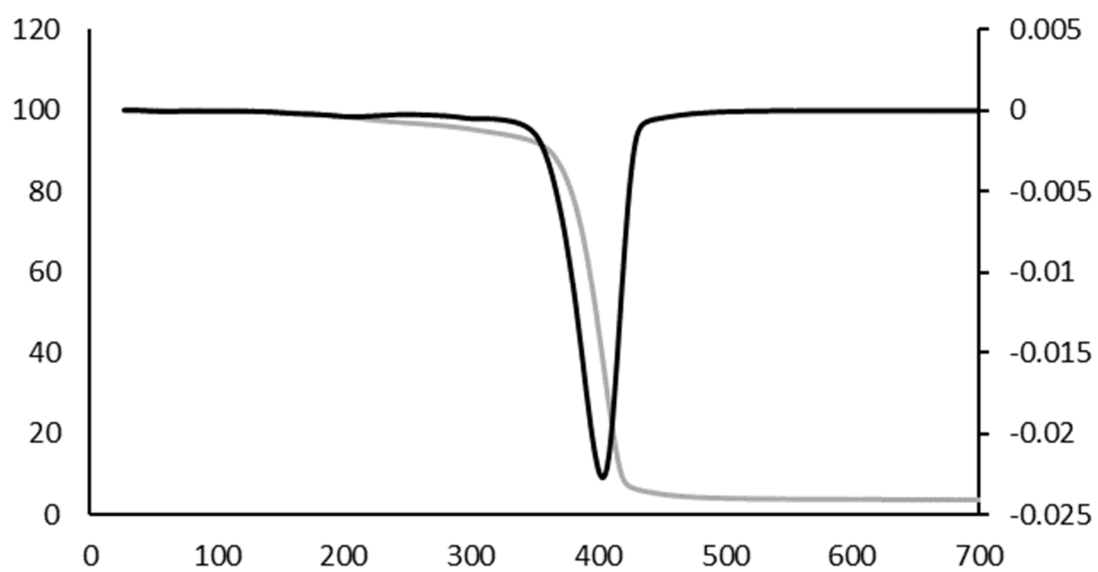


FIG. 21

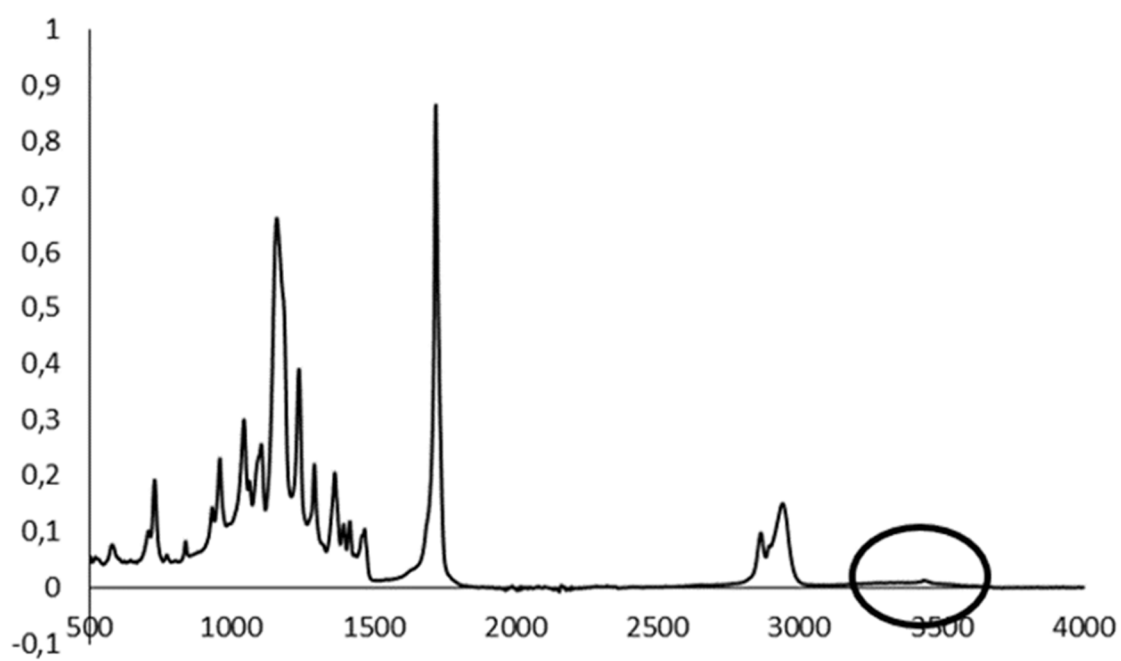


FIG. 22

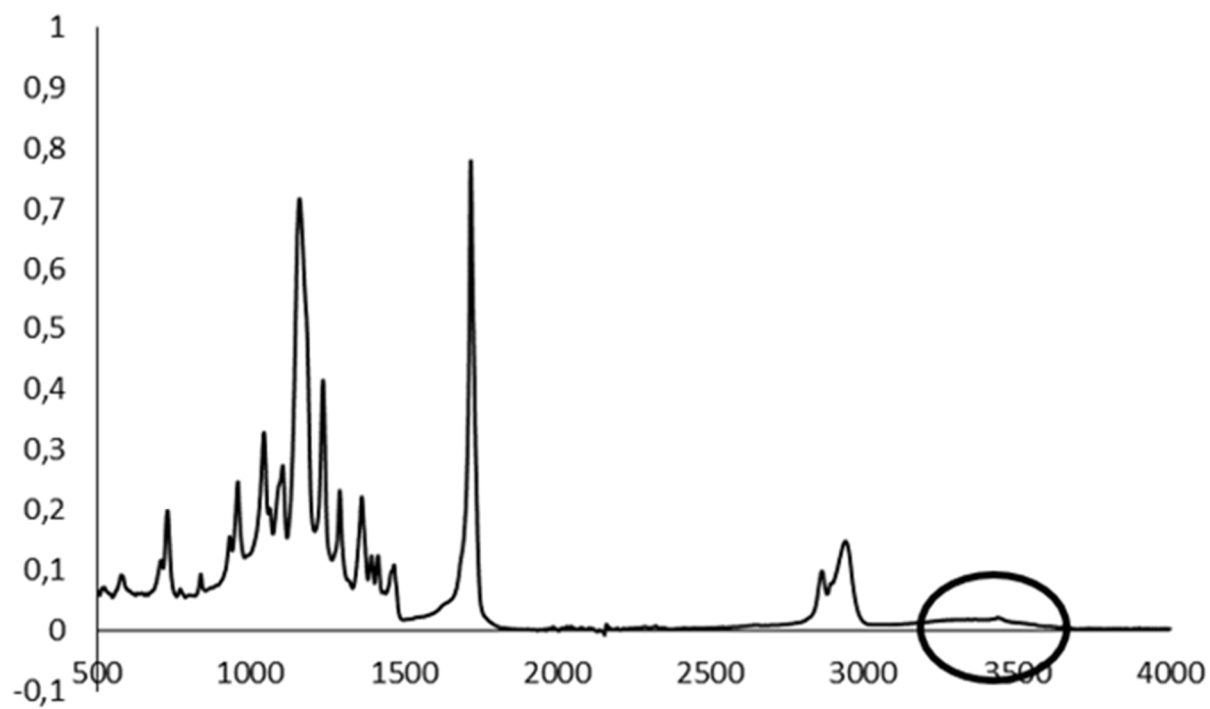


FIG. 23

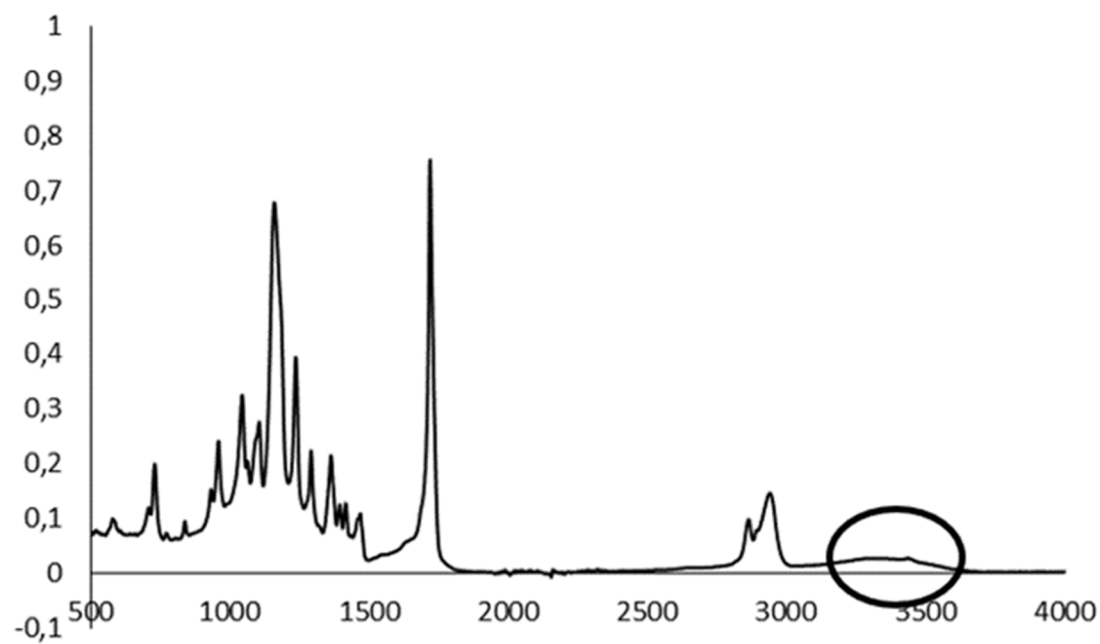


FIG. 24

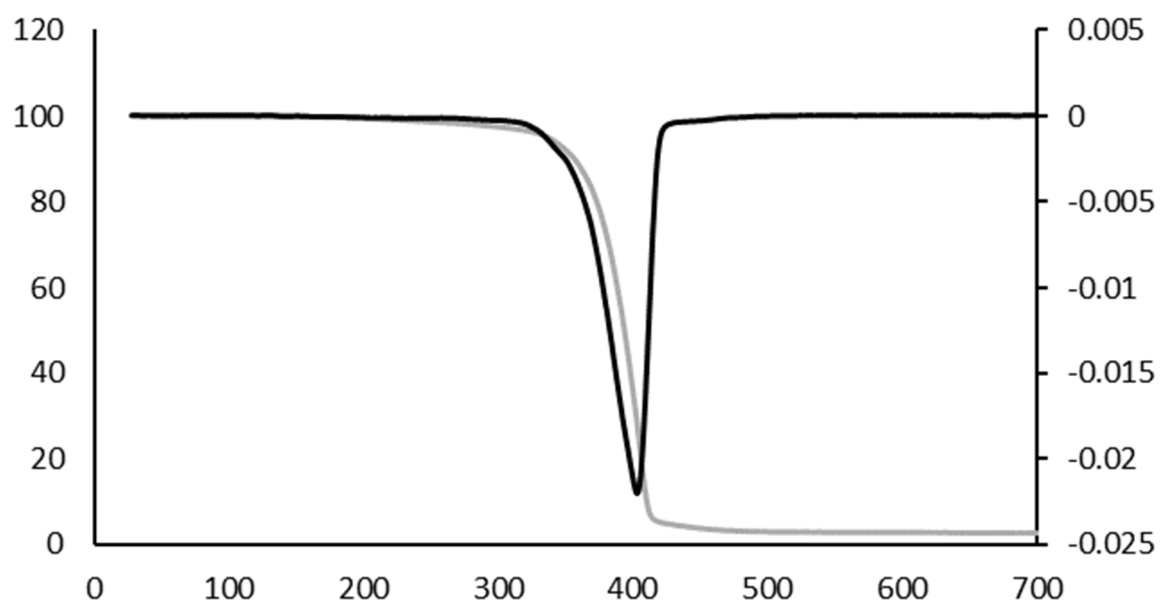


FIG. 25

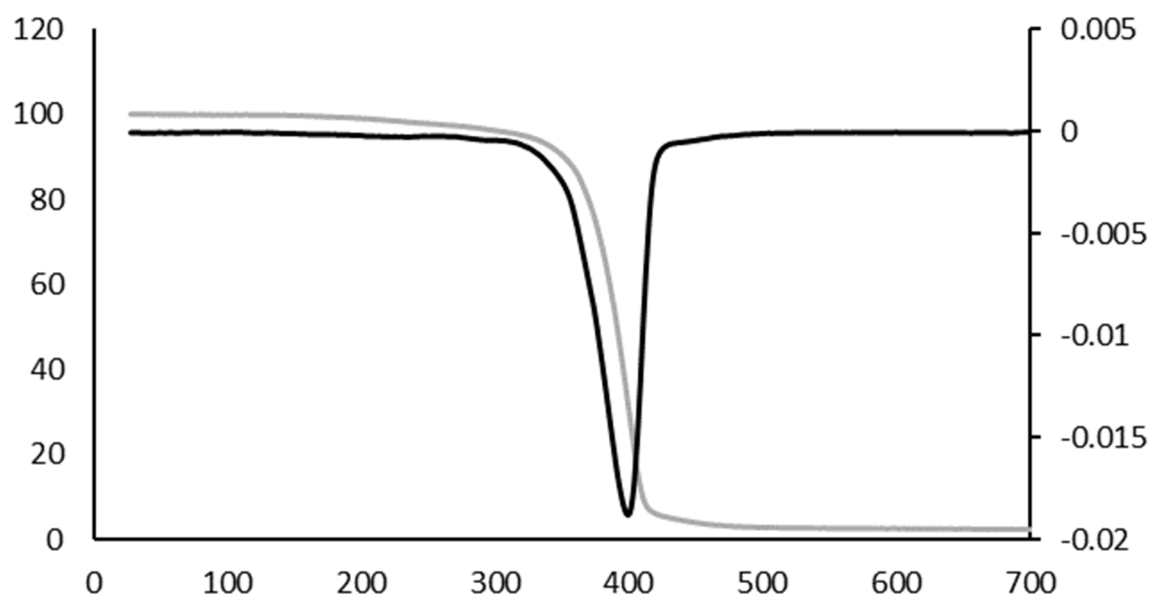


FIG. 26