

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**ESTUDIO SOBRE EL USO DE LACTOSUERO DE QUESO PANELA PARA
RECUPERAR LACTOSA Y FORMAR CO-CRISTALES DE LACTOSA-
FLAVONOIDES**

POR:

I.Q. VÍCTOR EMMANUEL LUJÁN TORRES

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

JUNIO 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 20 de junio de 2022.
Oficio: 20/CA/SIP/22

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P r e s e n t e:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“Estudio sobre el uso de lactosuero de queso Panela para recuperar lactosa y formar co-cristales de lactosa-flavonoides”**, presentada por el estudiante **I.Q. Víctor Emmanuel Luján Torres** alumno del programa de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
“Por la Ciencia para Bien del Hombre”

Yarely Leal Ramos

Dra. Martha Yarely Leal Ramos
Asesora de tesis

Dr. Samuel Bernardo Pérez Vega
Asesor de tesis

Dr. Nestor Gutiérrez Méndez
Director de tesis

Dr. Iván Salmerón Ochoa
Asesor de tesis

Sergio Martínez
Monteagudo

Digitally signed by Sergio Martínez
Monteagudo
DN: cn=Sergio Martínez
Monteagudo, o=FCQ
email=s.martinez@uach.mx, c=MX
Date: 2022.06.20 20:57:28 -0600

Ph.D. Sergio I. Martínez Monteagudo
Asesor de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado

***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

1 de junio de 2022

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Estimado Dr. Ildebrando por medio de este conducto le informo que el **I.Q. Víctor Emmanuel Luján Torres** estudiante de la maestría en Ciencias en *Ciencia y Tecnología de Alimentos* ha concluido satisfactoriamente el escrito de tesis del trabajo **“Estudio sobre el uso de lactosuero de queso Panela para recuperar lactosa y formar co-cristales de lactosa-flavonoides”** Por lo que en mi carácter de Director de Tesis le liberó su escrito de tesis, para que sea turnado a los correspondientes asesores para comentarios, correcciones o retroalimentación. Hago notar que el proyecto originalmente se registró con el nombre de “Efecto de la precipitación ácida de proteínas de lactosuero sobre el proceso de cristalización espontánea y no espontánea de la lactosa y formación de co-cristales de lactosa, proteínas y flavonoides.” Sin embargo, por ajuste de objetivos el nombre cambio al descrito previamente.

En este trabajo de tesis participan los siguientes investigadores como sus asesores:

Dra. Martha Yarely Leal Ramos (FCQ-UACH), PhD. Sergio Martínez Monteagudo (NMSU), Dra. Ivan Salmerón Ochoa (FCQ-UACH) y Dr. Samuel Bernardo Pérez Vega (FCQ-UACH)

Sin otro particular quedo de usted

Atentamente,



D.C. NESTOR GUZMÁN MENDEZ

Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a la vida y a la suerte, por permitirme seguir en el camino.

A mi familia por siempre estar a mi lado.

A mi director de tesis, el Doctor Néstor Gutiérrez Méndez, por brindarme su confianza y su experiencia.

A mis asesores que fueron una guía invaluable durante este proyecto.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron en la jornada.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua a través de la Facultad de Ciencias Químicas por permitirme culminar con este proyecto a pesar de las dificultades.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por permitirme realizarme profesionalmente mediante sus programas y financiamientos.

A quien confió en mí.

Gracias.

DEDICATORIAS

Para mi familia que es lo primero, para los amigos que siempre estuvieron y a todas esas coincidencias que la vida arrojó en silencio.

ÍNDICE

Tabla de contenido	
AGRADECIMIENTOS	<i>i</i>
DEDICATORIAS	<i>ii</i>
ÍNDICE	<i>iii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>vi</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>ix</i>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
2 ANTECEDENTES	6
2.1 Queso Panela	6
2.2 Lactosuero	6
2.2.1 Caracterización y extracción de lactosuero.....	8
2.3 Lactosa.....	9
2.4 Formas de la lactosa	11
2.4.1 α -Lactosa monohidratada	11
2.4.2 Formas estables e inestables de α -lactosa anhidra	11
2.4.3 β -lactosa	12
2.4.4 Lactosa amorfa.....	12
2.5 Propiedades químicas y físicas de la lactosa	12
2.6 Cristalización de lactosa.....	14
2.6.1 Supersaturación	15
2.6.2 Nucleación.....	16
2.6.3 Formación y crecimiento de los cristales de lactosa	18
2.6.4 Cristalización espontánea y cristalización inducida	20
2.6.5 Purificación de cristales de lactosa (efecto de impurezas)	23
2.6.6 Co-cristalización	24
2.6.7 Interacción de polifenoles y macromoléculas como proteínas o polisacáridos	25
2.6.8 Flavonoides	25
2.6.9 Rutina	27
2.6.10 Quercetina.....	28
3 JUSTIFICACIÓN	30
4 HIPÓTESIS	30

5	OBJETIVO.....	31
5.1	Objetivo general.....	31
5.2	Objetivos particulares.....	31
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1	ETAPA 1: Cristalización de lactosa a partir de lactosuero de queso panela bajo condiciones de pH ácido y neutro, así como bajo condiciones de agitación mecánica	32
6.1.1	Diagramas metodológicos	32
6.1.2	Materiales	34
6.1.3	Equipos	34
6.1.4	Diseño de experimentos y análisis estadístico	35
6.1.5	Fabricación de Queso Panela y obtención de lactosuero	36
6.1.6	Concentración del lactosuero	37
6.1.7	Cristalización espontánea de la lactosa	38
6.1.8	Cristalización inducida por agitación.....	39
6.1.9	Composición de los cristales recuperados	40
6.1.10	Rendimiento de cristalización y porcentaje de cristalización de lactosa	41
6.1.12	Pureza de los cristales y tipo de lactosa cristalizada	42
6.2	ETAPA II: Formación de co-cristales de lactosa-flavonoides a partir de lactosuero de queso panela y la adición de quercetina o rutina	44
6.2.1	Diagrama metodológico	44
6.2.2	Materiales	45
6.2.3	Equipos	46
6.2.4	Diseño de experimentos y análisis estadístico	46
6.2.5	Proceso de co-cristalización.....	47
6.2.6	Seguimiento del proceso de cristalización y caracterización de los cristales.	48
6.2.7	Cuantificación de polifenoles totales en los cristales de lactosa.	48
6.2.8	Actividad antioxidante de los co-cristales.....	49
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
7.1	Etapa 1: cristalización de lactosa a partir de lactosuero de queso panela bajo condiciones de pH ácido y neutro, así como bajo condiciones de agitación mecánica	51
7.1.1	Seguimiento de cristalización espontanea e inducida a pH acido y neutro.....	51
7.1.2	Distribución de tamaños de los cristales de lactosa	54
7.1.3	Rendimiento y composición de cristales	60
7.1.4	Pureza de cristales y tipo de lactosa cristalizada	64
7.2	Conclusiones de la etapa 1.....	69
7.3	ETAPA 2: Formación de co-cristales Lactosa-Proteína- Flavonoide, a partir de suero acidificado de producción de queso panela.	71
7.3.1	Seguimiento del proceso de co-cristalización	71
7.3.2	Tamaño de cristales	74
7.3.3	Rendimiento y composición de cristales.....	76
7.3.4	Pureza de cristales y tipo de lactosa cristalizada	79
7.3.5	Actividad antioxidante de co- cristales	93
7.4	Conclusiones etapa 2	97
8	Conclusiones totales.....	98
9	BIBLIOGRAFÍA	99

10	ANEXOS	107
10.1	Anexo 1. Tablas de composición.....	107
10.2	Anexo 2. Curvas de calibración.....	108
10.3	Anexo 3. Análisis estadístico	110
10.3.1	Análisis estadístico de seguimiento de cristalización Etapa 1	110
10.3.2	Análisis estadístico de seguimiento cristalización Etapa 2	118
10.3.3	Análisis estadístico de composición de cristales y rendimiento Etapa1	124
10.3.4	Análisis estadístico de composición de cristales y rendimiento Etapa 2.....	133

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Composición de la leche entera pasteurizada utilizada para la elaboración de queso Panela.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 2. Composición de la leche entera (LALA) pasteurizada utilizada en este estudio.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 3. Parámetros cinéticos del proceso de cristalización espontánea o inducida por agitación a diferentes pHs.</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 5. Parámetros cinéticos del proceso de cristalización de lactosa a partir de suero de queso Panela sin flavonoides y adicionado con flavonoides (0.5 mg mL⁻¹).....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 6. Composición y rendimiento del proceso de cristalización de lactosa a partir de lactosuero de queso Panela adicionado o no (control) con quercetina o rutina</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 7. Análisis de espectroscopia Raman para cristales de lactosa, co-cristales de lactosa-rutina y co-cristales de lactosa-quercetina.</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 8. Análisis de espectroscopia FTIR para cristales de lactosa, co-cristales de lactosa-rutina y co-cristales de lactosa-quercetina.</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 9. Composición promedio del lactosuero de queso de la elaboración de queso Panela.</i>	<i>107</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Correlación entre cenizas y lactosa en las leches de 23 especies (Sloan y Jenness, 1970).....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Correlación entre lactosa y caseína en las leches de 23 especies (Sloan y Jenness, 1970).....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3. (a) Formula estructural de la lactosa. (b) Formas alfa (α) y (β) de la lactosa (Zadow, 2012)</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4. Forma de Tomahawk de cristales de α-lactosa monohidratada (Durham, 2009)..</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5. Solubilidad (C_s), súper solubilidad (S), y amplitud de la zona metaestable (MZW) de la lactosa (Tomado de Sánchez-García,2021).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 6. a) Tratamiento acido cristalización espontanea, b) tratamiento Neutro cristalización espontanea, c) Tratamiento Acido cristalización, d) Tratamiento Neutro cristalización inducida. Eje y diferencia de absorbancia (Δ-abs) y eje x tiempo (t) =diferencia de absorbancia.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 7. Distribución de los tamaños de cristales de lactosa cristalizados de forma espontánea a pH ácido (línea roja discontinua) y pH neutro (línea azul).</i>	<i>55</i>
<i>Figura 8. Distribución de los tamaños de cristales de lactosa inducidos mediante agitación mecánica a pH ácido (línea naranja discontinua) y pH neutro (línea azul).</i>	<i>55</i>
<i>Figura 9. Comparación en la distribución de los tamaños de cristales de lactosa producidos por un proceso espontáneo (líneas azul y morada) o un proceso inducido mediante agitación mecánica (líneas naranjas y azul claro).</i>	<i>56</i>
<i>Figura 10. Microscopías de los cristales de lactosa (1 g disuelto en 2 mL de etanol) obtenidos por cristalización espontánea o cristalización inducida por agitación en pH neutro o ácido.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 11. Precipitación de proteínas durante su concentración. A la izquierda se muestra el lactosuero de queso Panela pH \sim4, mientras que a la derecha se muestra el lactosuero de queso Panela pH \sim7.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 12. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de cristales de lactosa obtenidos de suero acidificado bajo un proceso de cristalización espontánea (Cr. Ac. ESP) o un proceso de cristalización inducido por agitación (Cr. Ac IND). Así como los termogramas de estándares de cristales de α-lactosa y β-lactosa.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 13. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de cristales de lactosa obtenidos de suero pH neutro bajo un proceso de cristalización espontánea (Cr. Ne. ESP) o un proceso de cristalización inducido por agitación (Cr. Ne IND). Así como los termogramas de estándares de cristales de α-lactosa y β-lactosa.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 14. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de cristales de lactosa obtenidos de suero pH ácido (Cr. Ac.) o de lactosuero pH neutro (Cr. Ne.) bajo un proceso de cristalización espontánea (ESP) o un proceso de cristalización inducido por agitación (IND).....</i>	<i>68</i>

<i>Figura 15. Seguimiento del proceso de co-cristalización de lactosa-flavonoides a partir de lactosuero de queso Panela y la adición de rutina o quercetina.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 16. Comparativo de la distribución de tamaños (micrómetros) observada en la cristalización de lactosa a partir de lactosuero (control, línea naranja), adicionada con rutina (línea morada) o quercetina (línea verde).</i>	<i>74</i>
<i>Figura 17. Imágenes de cristales de lactosa (A), co-cristales de lactosa-quercetina (B) y co-cristales de lactosa-rutina. Imágenes tomadas capturadas de muestras de 1 g de muestra 2 ml de etanol.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 18. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de co cristalización de flavonoides. A) Co-cristal LPQ (Lactosa-Proteína-Quercetina) y control de lactosa. B) Co-cristal LPR (Lactosa - Proteína -Rutina) y control de lactosa.</i>	<i>81</i>
<i>Figura 19. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de co cristalización y estándares de flavonoides. A) Co-cristal LPQ (Lactosa-Proteína-Quercetina) y estándar de quercetina. B) Co-cristal LPR (Lactosa - Proteína -Rutina) y estándar de rutina.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 20. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de estándares. A) Estándar de flavonoides Rutina y Quercetina. B) Estándar de α y β Lactosa.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 21. Resultados obtenidos del análisis por espectroscopía raman realizado a los cristales de lactosa (parte superior), co-cristales de lactosa- quercetina (figura de en medio) y co-cristales de lactosa- rutina (figura del fondo).</i>	<i>86</i>
<i>Figura 22. Espectroscopia por FTIR. realizado a los cristales de lactosa, co-cristales de lactosa-rutina (parte superior, color naranja), co-cristales de lactosa quercetina (parte media, color amarillo) y lactosa control (parte inferior, color rojo).</i>	<i>91</i>
<i>Figura 23. Espectroscopia por FTIR. realizado a los estándares de quercetina (color azul) y los estándares de rutina (color violeta)</i>	<i>92</i>
<i>Figura 24. Capacidad de captación del radical libre DPPH por parte del ácido ascórbico, cristales de lactosa sin flavonoides (control), co-crustales de lactosa-rutina y co-cristales de lactosa-quercetina. La línea negra representa el ajuste de regresión, las líneas rojas representan las bandas de predicción al 95%, y las líneas azules representan las bandas del intervalo de confianza de la regresión al 95%.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 25. Ejemplos de las pruebas colorimétricas con el radical DPPH y soluciones de cristales de lactosa sin flavonoides (control) y con los flavonoides quercetina o rutina encapsulados en su estructura cristalina</i>	<i>96</i>
<i>Figura 26. Curva de calibración construida a partir de concentraciones de BSA conocidas para la cuantificación de proteínas.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 27. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.</i>	<i>109</i>
<i>Figura 28. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de ácido ascorbico para actividad antioxidante.</i>	<i>109</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

DBO: Demanda Bioquímica De Oxígeno

DQO: Demanda Química De Oxígeno

p/p: Peso /Peso

α -lactosa: Alfa Lactosa

β -lactosa: Beta Lactosa

pH: Potencial Hidronio

L: Litros

NaCl: Cloruro de Sodio

KCl: Cloruro de Potasio

DSC: Distribución de cristales

°C: Grados Celsius.

C: Carbono.

H⁺: Ion hidronio

OH⁻: Ion hidroxilo

μ m: Micro metro

mg: Miligramo

cm: Centímetro

CSD: Distribución de Cristales

° K: Grados Kelvin

s: Segundos

K/s: Grados Kelvin sobre Segundo

ANOVA: Análisis de varianza.

% w/w: Porcentaje peso/peso

wf: Cantidad (peso) de los cristales recuperados

wi: Cantidad (peso) de la lactosa presente en el lactosuero concentrado

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl radical

RSA: Radical scavenging activity (Actividad de eliminación de radicales)

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de pH ácido y neutro, en la recuperación de lactosa a partir de lacto suero de la producción de queso panela y la formación de co-cristales de lactosa-proteína-flavonoide. La lactosa es un ingrediente altamente utilizado en la industria farmacéutica y de alimentos. Y esta puede ser recuperada del lactosuero mediante técnicas de cristalización. La cual consiste en llevar el lactosuero a un estado de super saturación para posteriormente fomentar la formación de núcleos y el crecimiento de cristales, para finalizar con el refinamiento y recuperación de la lactosa. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo en su primera etapa fue el estudio de como la acidificación del lactosuero de queso Panela influye en el proceso de cristalización de lactosa, particularmente en lo referente a su rendimiento de cristalización, pureza, distribución y tamaño de cristales. Además, en la segunda etapa de este trabajo, se evaluó la factibilidad de formar co-cristales de lactosa, proteína y polifenol a partir de lactosuero de queso Panela. Donde flavonoides como Rutina y Quercetina fueron incorporados para formar co-cristales de lactosa-proteína-flavonoides. Para la primera etapa se evaluó el efecto de pH ácido (3.8) y neutro (6.9) en el lactosuero concentrado a un 45% de sólidos disueltos en combinación de rutas de cristalización espontánea e inducida por agitación (120 rpm) durante 72 horas de proceso. Encontrando que los cristales obtenidos a partir de tratamientos ácidos (pH 3.8) alcanzan una mayor pureza y la cristalización inducida permite obtener cristales en menor tiempo y un tamaño de partícula más homogéneo independientemente del pH. Con respecto a la segunda etapa, se adicionaron flavonoides como Rutina y Quercetina, en una concentración de 5 mg/mL^{-1} al lactosuero concentrado, previo a la cristalización inducida, para poder generar los co-cristales de lactosa-proteína-flavonoides. En los cuales se encontró que la presencia de flavonoides durante la cristalización de lactosa probablemente induce la generación de núcleos por la interacción del flavonoide con la lactosa y con los remanentes de proteína. De tal forma que se induce una cristalización secundaria que permite el encapsulamiento de los flavonoides dentro de la estructura de los cristales de lactosa. Donde la quercetina tuvo una mayor interacción para formar co-cristales que la rutina.

ABSTRACT

In the present work, was evaluated the effect of acid and neutral pH on the recovery of lactose from the whey of panela cheese production and the formation of lactose-protein-flavonoid co-crystals. Lactose is a highly used ingredient in the pharmaceutical and food industries. And this can be recovered from whey by crystallization techniques. Which consists of bringing the whey to a state of supersaturation to later promote the formation of nuclei and the growth of crystals, to finish with the refinement and recovery of lactose. Therefore, the objective of this work in its first stage was the study how the acidification of Panela cheese whey influences the crystallization process of lactose, particularly in relation to its crystallization yield, purity, distribution, and crystals size. In addition, in the second stage of this work, the feasibility of forming co-crystals of lactose, protein and polyphenol from Panela cheese whey was evaluated. Where flavonoids such as Rutin and Quercetin were incorporated to form co-crystals of lactose-protein-flavonoids. For the first stage, the effect of acid pH (3.8) and neutral pH (6.9) was evaluated in concentrated whey at 45% dissolved solids in combination of spontaneous crystallization routes and induced by stirring (120 rpm) during 72 hours of process. Finding that the crystals obtained from acid treatments (pH 3.8) reach a higher purity and the induced crystallization allows crystals to be obtained in less time and a more homogeneous particle size regardless of the pH. Regarding the second stage, flavonoids such as Rutin and Quercetin were added at a concentration of 5 mg/mL-1 to the concentrated whey, prior to induced crystallization, to generate the lactose-protein-flavonoid co-crystals. In which it was found that the presence of flavonoids during lactose crystallization probably induces the generation of nuclei by the interaction of the flavonoid with lactose and with the protein remnants. In such a way that a secondary crystallization is induced that allows the encapsulation of the flavonoids within the structure of the lactose crystals. Where quercetin had a greater interaction to form co-crystals than Rutin.

1 INTRODUCCIÓN

La lactosa es un ingrediente altamente utilizado en la industria farmacéutica y de alimentos. Algunas de sus principales ventajas es su bajo índice glicémico, bajo valor calórico y menor dulzor que la sacarosa. Además, este azúcar presenta importantes características que lo hacen ideal para su uso como ingredientes. Por ejemplo, los cristales de lactosa poseen un excelente grado de compresibilidad, plasticidad y solubilidad (de Souza, Bergamasco, da Costa, Feng, Faria, & Gimenes, 2010). La lactosa se recupera principalmente del lactosuero, el cual es un subproducto derivado de la manufactura del queso. La composición de (de Souza, Bergamasco, da Costa, Feng, Faria, Gimenes, et al., 2010) el lactosuero varía dependiendo del tipo de queso del cual se obtiene. Sin embargo, de manera general el lactosuero contiene 4.5–6% lactosa, 0.1–1% de proteína y trazas de lípidos (0.065%) (Das, Sarkar, Sarkar, Bhattacharjee, & Bhattacharjee, 2015). El lactosuero obtenido de quesos fermentados tiene un pH ácido (≥ 5.5), mientras que el lactosuero recuperado de quesos no fermentados tiene un pH parecido al de la leche (≥ 6.6) (Walstra, Wouters, & Geurst, 2006). En México, los quesos que más se producen son el queso Fresco (79,270 Ton.) y el queso Panela (48,947 Ton.), siendo ambos quesos no fermentados. Por lo tanto, el lactosuero que más abunda en México es el derivado del queso Fresco y del queso Panela el cual suele ser catalogado como un suero dulce con $\text{pH} \geq 6.6$ (González-Córdova et al., 2016; SIAP-SAGARPA, 2019).

La lactosa se obtiene mediante un proceso de cristalización a partir de lactosuero concentrado. Como primer paso, el lactosuero se descrema para remover las trazas de grasa. Oportativamente, las proteínas del suero son precipitadas por acidificación utilizando ácido cítrico, láctico ó acético. Cuando las proteínas del suero alcanzan un pH cercano al cinco, estas flocculan, por lo que se pueden separar por centrifugación (Sánchez-García, Bhangu, Ashokkumar, & Néstor, 2018; Walstra et al., 2006). Este método de separación de las proteínas es rápido, fácil de implementar en la industria y es de relativamente bajo costo. Alternativamente, las proteínas de la leche se pueden separar parcialmente mediante ultrafiltración usando membranas de 0.01 a $1 \mu\text{m}$ \varnothing (corte del poro 3 a 20 kDa) y presiones de 0.1 a 5 bar. En la ultrafiltración se obtiene

un retenido y un permeado. El retenido de lactosuero ultrafiltrado suele contener 20% de sólidos, entre los cuales sobresalen las proteínas (12.12 g/100g) y cierto contenido de lactosa (3.2 g/100g). El permeado de lactosuero ultrafiltrado contiene 6% de sólidos de los cuales la lactosa es mayoritaria (5.6 g/100g). Sin embargo, el permeado también contienen proteínas (0.2%) y sales cantidades pequeñas. Las sales y las proteínas se pueden eliminar mediante un proceso de nanofiltración o electrodiálisis, aunque ambos métodos tienen un alto costo de operación (Cuartas-Urbe et al., 2009). Una vez que las proteínas y los lípidos del suero se remueven, el lactosuero es concentrado mediante evaporación hasta que alcance 40–65% de sólidos. En este punto la lactosa se encuentra en estado supersaturado en el lactosuero evaporado, pero al enfriarse el lactosuero se induce la cristalización espontánea de la lactosa (Sánchez-García et al., 2021).

La presencia de proteínas del suero, aun en trazas, ha demostrado que afecta significativamente el proceso de cristalización de la lactosa (Huppertz & Gazi, 2015; Sánchez-García, García-Vega, Leal-Ramos, Salmeron, & Gutiérrez-Méndez, 2018; Y. I. Sánchez-García, N. Gutiérrez-Méndez, R. E. Orozco-Mena, V. H. Ramos-Sánchez, & M. Y. Leal-Ramos, 2019). Por ejemplo, se ha reportado que la presencia de proteínas acorta la distribución de tamaños en los cristales de lactosa y acelera la velocidad de cristalización (Sánchez-García, García-Vega, et al., 2018). Además, se ha reportado que las proteínas del suero disminuyen la pureza de los cristales de lactosa y reducen el rendimiento de cristalización (R. Bund & A. Pandit, 2007; Yanira I. Sánchez-García et al., 2019). Trabajos previos también han confirmado mediante espectroscopía Raman la incorporación de proteínas dentro de la estructura de los cristales de lactosa. Estos resultados sugieren la formación de co-cristales de lactosa y proteína (Yanira I. Sánchez-García et al., 2019). No obstante, toda la información generada sobre el efecto de las proteínas y la cristalización de la lactosa, aun no se ha descrito el impacto que tiene el precipitar o no las proteínas del lactosuero en el proceso de cristalización de la lactosa. Lo anterior debido a que prácticamente todos los estudios realizados sobre el efecto de las proteínas y la cristalización de lactosa se han desarrollado en soluciones modelo (agua-lactosa-proteínas) y no en lactosuero.

Por otra parte, en los últimos años ha existido un creciente interés de los consumidores por alimentos y aditivos alimentarios más saludables, como los flavonoides. Los flavonoides son derivados de bezo-pirona que contienen dos anillos de benceno ligados con tres carbonos comúnmente ciclados con oxígeno. En las plantas, los flavonoides las protegen contra los herbívoros, microorganismos y contra la radiación ultravioleta (Abbas et al., 2017; Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002). En los humanos, se ha demostrado que los flavonoides tienen efectos benéficos tal como efectos antioxidantes, antimicrobiano, antiinflamatorio, anticancerígeno, antidiabético y anti alérgico (Abbas et al., 2017). Los flavonoides al igual que muchos otros polifenoles pueden interactuar con las proteínas para formar complejos de flavonoides-proteínas. Las interacciones de proteínas con flavonoides pueden ocurrir a partir de interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos o puentes de hidrógeno. De la misma forma, se ha reportado que los flavonoides pueden interactuar con los carbohidratos formando puentes de hidrógeno entre los grupos –OH de los flavonoides y los átomos de oxígeno del enlace glicosídico en disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Asimismo, se asume que pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas entre sacáridos y flavonoides (C. Le Bourvellec & Renard, 2012). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue el estudio de como la acidificación del lactosuero de queso Panela, influye en el proceso de cristalización de lactosa, particularmente en lo referente a su rendimiento de cristalización, pureza, distribución y tamaño de cristales. Además, en este trabajo se evaluó la factibilidad de formar co-cristales de lactosa, proteína y polifenol a partir de lactosuero de queso Panela. Donde flavonoides como Rutina y Quercetina fueron incorporados para formar co-cristales de lactosa-proteína-flavonoides.

2 ANTECEDENTES

2.1 Queso Panela

El panorama de la producción de queso en México es variado. Productores tecnificados pueden producir más de 5000 litros de leche por día. En contraste, las pequeñas queserías procesan solo de 60 a 1000 litros diarios. Según se informa, existen alrededor de 10,000 productores de queso a pequeña escala en México (FAO-FEPALE, 2012). Al concluir noviembre de 2016, la industria de quesos produjo 342 mil toneladas con un valor en el mercado de 15 mil 823 millones de pesos. Las principales variedades de quesos fueron; Fresco (17.0%), Panela (14.0%) y Doble crema (13.0%) (SAGARPA-SIAP, 2016). En el 2018, la elaboración de derivados y fermentos lácteos como quesos, crema y yogurt, alcanzó un volumen de un millón 150 mil toneladas, con un valor de 52 mil 104 millones de pesos. Por su parte, la industria de quesos produjo 418 mil 650 toneladas con un valor en el mercado de 21 mil 293 millones de pesos. De los cuales las principales variedades fueron el queso fresco con 79,279 toneladas, el queso panela con 48,947 toneladas y la doble crema 67,597 toneladas (SAGARPA-SIAP, 2018). Respecto al queso panela, se le considera como un queso fresco suave mexicano artesanal elaborado a partir de leche pasteurizada de vaca descremada o parcialmente descremada, con poca o ninguna acidificación del cultivo iniciador y con rendimientos promedio habituales de 13-14 kg de queso por 100 l de leche pasteurizada (NOM-243-SSA1-2010, 2010).

2.2 Lactosuero

El suero es el principal subproducto de la industria láctea que se produce durante la fabricación de queso y caseína a partir de la leche durante el proceso de coagulación (Das et al., 2016). Comúnmente en la industria láctea el suero es clasificado en dos grupos según su proceso de fabricación. El primer tipo de suero es el denominado suero dulce, el cual se obtiene de durante la fabricación quesos no fermentados. El segundo tipo de suero es el denominado suero ácido, el cual deriva de productos lácteos fermentados ó acidificados, como la mayor parte de quesos y como el yogurt griego, o el petit suisse (Chandrapala et al., 2015). Estos dos tipos de lactosuero son

diferentes en su contenido de minerales, concentración de proteínas y contenido de lactosa, lo que los hace tener propiedades funcionales diferentes (Bordenave-Juchereau, Almeida, Piot, & Sannier, 2005).

El suero dulce concentrado y desmineralizado es utilizado en una variedad de productos de la industria alimentaria como en bebidas en polvo, barras nutritivas, sopas, productos de panadería, recubrimientos de confitería, helados y productos lácteos congelados (Królczyk, Dawidziuk, Janiszewska-Turak, Solowiej, & sciences, 2016). Los concentrados y aislados de proteína de suero de leche también se usan como ingredientes alimenticios en varios productos alimenticios como el jamón, natilla, dulces, confiterías, palitos de cangrejo, pasteles, fórmulas infantiles, bebidas deportivas, y alimentos formulados (Chandrapala et al., 2015). Además, existe un creciente interés en el uso del lactosuero y sus derivados en el desarrollo de alimentos funcionales o productos nutracéuticos. Por esta razón, la industria farmacéutica y alimenticia tiene un gran interés en desarrollar productos utilizando lactosuero como fuente de materia prima.

En promedio, se obtienen de 8 a 9 litros de lactosuero de la manufactura de un kilogramo de queso, el cual se fabrica a partir de 10 litros de leche. Los componentes más importantes del suero lácteo son la lactosa y las proteínas solubles. Por lo general, el lactosuero contiene 5–6% de lactosa, 0.8–1% de proteína (lo que representa el 20% de las proteínas totales en la leche) y 0.06% de grasa (de Souza, Bergamasco, da Costa, Feng, Faria, Gimenes, et al., 2010). En los últimos años se ha incrementado la producción de quesos a nivel mundial con un crecimiento anual del 2.6 %. En consecuencia, el volumen de lactosuero generado también ha aumentado, el cual se estima que es de alrededor de 190 millones de ton/año. A pesar del alto valor nutricional y económico del lactosuero, se estima que más del 50 % de este subproducto no se aprovecha y se arroja al medio ambiente; lo que genera graves problemas de contaminación de suelos, cuerpos de agua y mantos freáticos (Yadav et al., 2015)

El lactosuero que deriva de la producción de queso (incluyendo al queso Panela) es altamente contaminante cuando se vierte al drenaje público o a sistemas acuíferos. Esta contaminación se debe a que el suero contiene una alta cantidad de materia orgánica, incluyendo grasas, proteínas y lactosa. Sin dejar de lado el mal olor que se emana de los canales de aguas residuales en regiones con alta concentración de productores de queso (Salas-Vargas, Brunett-Pérez, Espinosa-Ortiz, & Martínez-García, 2021). La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) del lactosuero oscila entre 30,000 a 50,000 mg/litro. Mientras que la demanda química de oxígeno del suero lácteo se encuentra entre 60,000 a 80,000 mg/litro (Macwan, Dabhi, Parmar, Aparnathi, & Sciences, 2016). El problema de contaminación del suero no es exclusivo de México, ya que se ha estimado que en Europa solo se aprovecha el 75% del lactosuero, y probablemente menos del 50% en el resto del mundo (Macwan et al., 2016). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2014) en el mundo se produjo 22,651,605 toneladas de queso, lo que generó 220 millones de toneladas de suero. No obstante, del total de suero producido a nivel mundial, solo 3,151,924 toneladas de suero se utilizaron para generar productos alimenticios. En consecuencia, se calcula que alrededor del 47% del suero de queso se vierte al desagüe y llega a ríos y suelos, provocando graves problemas de contaminación (Martín-del-Campo et al., 2019). Aun cuando ya se ha reportado que este subproducto cuenta con un alto potencial para ser materia prima valiosa para la producción de sustancias bio activas y alimentos de valor agregado (Macwan et al., 2016)

2.2.1 Caracterización y extracción de lactosuero

La separación del lactosuero se lleva a cabo después de la coagulación de la leche. Posterior a la coagulación se rompe mecánicamente el gel de leche o “cuajo”, lo que permite la separación del suero por medio de filtración simple. Al momento de la elaboración del queso se presentan dos tipos de lactosuero: el primario y el secundario. El lactosuero primario corresponde al líquido drenado de color amarillo-verdoso obtenido después del corte de la cuajada. El lactosuero secundario tiene un

color blanco lechoso semejante a la leche. Este tipo de lactosuero se recupera cuando el suero no se separa inmediatamente después del corte y se deja fermentar junto con la cuajada por un par de horas. El lactosuero primario y el secundario representan el 90-95 % y 5-10 % respectivamente del volumen total de lacto suero generado en el proceso de quesos como el queso asadero (Mazorra Manzano, Ramírez Montejo, Lugo Sánchez, González Córdoba, & Vallejo Córdoba, 2019).

La composición del suero láctico fermentado (ácido) es por mucho más complicada que la composición del suero lácteo dulce, esto debido a la presencia de metabolitos microbianos y niveles altos de nitrógeno no proteico (Durham, 2009). La composición química y las características del suero de leche dependen del tipo de leche, así como de las técnicas de producción de queso utilizadas. En promedio, el suero de queso representa ~80% del medio de fermentación original y retiene ~55% de los nutrientes de la leche. Los componentes principales del lactosuero incluyen lactosa (45-50 g / L), proteínas (6-8 g / L), lípidos (4-5 g / L) y sales minerales (8-10% de extracto seco) que incluyen NaCl y KCl (> 50% de las sales), sales de calcio y otros. Otros componentes del lactosuero son el ácido láctico y cítrico, la urea y el ácido úrico, así como las vitaminas del grupo B (De Gioannis et al., 2014).

2.3 Lactosa

La lactosa es el constituyente sólido principal en la leche bovina representando aproximadamente el 35% de los sólidos totales en la leche normal. Este azúcar es el constituyente principal en muchos productos lácteos. Por ejemplo, en la leche entera en polvo representa el 40% y en el suero en polvo puede representar hasta el 70% de su composición. Por lo tanto, las propiedades de varios productos lácteos, especialmente los productos concentrados y deshidratados, están dominados por las propiedades de la lactosa. Algunas de las propiedades de mayor importancia son su solubilidad, comportamiento de cristalización, propiedades de mutarrotación y su oscurecimiento debido a las reacciones de Maillard (P. F. Fox, 2013). La lactosa es el principal carbohidrato presente en la leche de mamíferos. Este carbohidrato está compuesto por galactosa y glucosa unidas por un enlace glucosídico β 1-4, con una

concentración que puede variar entre 0% - 10% p/p; dicha concentración es inversa en relación con la concentración de grasa y caseína (P. Fox, 2009), como se aprecia en las Figuras 1 y 2.

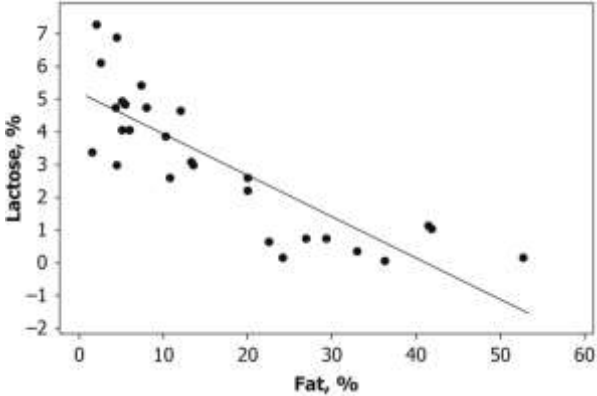


Figura 1. Correlación entre cenizas y lactosa en las leches de 23 especies (Sloan y Jenness, 1970)

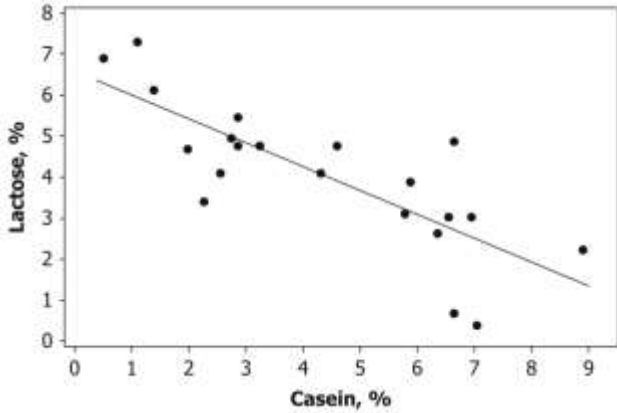


Figura 2. Correlación entre lactosa y caseína en las leches de 23 especies (Sloan y Jenness, 1970).

La lactosa es un disacárido que puede tomar dos formas isométricas alfa (α) o beta (β), dependiendo de la isomerización de la glucosa. La forma natural estable y cristalina de la lactosa corresponde a α -lactosa monohidratada. Existen varias otras formas cristalinas, como los compuestos moleculares de lactosa 5α - / 3β -, 3α - / 2β - y 4α - / 1β -lactosa. Estos compuestos son debido a la asociación física y química de los cristales α -lactosa y β -lactosa (Drapier-Beche, Fanni, & Parmentier, 1999).

2.4 Formas de la lactosa

2.4.1 α -Lactosa monohidratada

La forma más común y estable de la lactosa es la α -lactosa monohidratada cristalizada. Cada cristal de α -lactosa monohidratada contiene una molécula de agua de cristalización por cada molécula de lactosa. La molécula de agua es importante en la estructura y estabilización de la red cristalina porque une el oxígeno de cuatro moléculas de lactosa diferentes. Como resultado, la α -lactosa monohidratada es relativamente (no) higroscópica. Además, los cristales de lactosa pueden adquirir diferentes formas (polimorfismo) como la α -lactosa monohidratada, α -lactosa anhidra inestable y α -lactosa anhidra estable. Esta última estructura cristalina es una célula triclinica unitaria compleja (Hourigan, Lifran, Vu, Listiohadi, & Sleigh, 2013).

2.4.2 Formas estables e inestables de α -lactosa anhidra

La α -lactosa anhidra existe en dos formas: la α -lactosa anhidra estable y la α -lactosa anhidra inestable. Se producen cuando la molécula de agua de cristalización se elimina de la α -lactosa monohidratada. La calorimetría diferencial de barrido (DSC), ha demostrado que la α -lactosa anhidra inestable es un precursor de la α -lactosa anhidra estable cuando se derivaba por métodos térmicos. A temperaturas de 100–130 °C se forma primero la α -lactosa anhidra inestable. Sin embargo, a medida que se aumenta la temperatura a 160–170 °C hay más energía térmica disponible y se produce una reorganización para formar α -lactosa anhidra estable. La estructura porosa del cristal de α -lactosa anhidra inestable absorbe fácilmente la humedad de la atmósfera lo que le permite volver a crear α -lactosa monohidratada en un ambiente con humedad relativa de 10%. Por el contrario, una vez que se forma una α -lactosa anhidra estable, la α -lactosa monohidratada solo se reformará en un ambiente con humedad relativa superior al 50% o tras la disolución y recristalización de la forma estable anhidra en agua (Hourigan et al., 2013).

2.4.3 β -lactosa

La β -lactosa anhidra existe en estado sólido en forma cristalina, la cual es higroscópica y presenta mayor solubilidad y dulzura que la α -lactosa. La β -lactosa anhidra puede cristalizarse en el laboratorio en una amplia gama de condiciones, todas involucrando calor. Una temperatura de 93.5 °C es típicamente reportada como el umbral de temperatura por encima del cual la β -lactosa puede cristalizarse a partir de sistemas acuosos. Otros factores que afectan la cristalización incluyen vapor, presión, disolventes orgánicos, como etanol, metanol, acetona, glicerol y pH alcalino (Hourigan et al., 2013).

2.4.4 Lactosa amorfa

La lactosa amorfa es la forma más higroscópica de la lactosa y no es cristalina como su nombre indica. El término amorfo se refiere a un jarabe viscoso de baja humedad que existe en estado vítreo. En este tipo de estructura los dos isómeros (α y β) se presentan en la misma superficie (Y. D. Listiohadi, Hourigan, Sleigh, & Steele, 2005). En consecuencia, las moléculas de lactosa no están organizadas en una red regular, pero su movilidad es lo suficientemente baja como para que el vidrio de lactosa parezca sólido (Hourigan et al., 2013).

2.5 Propiedades químicas y físicas de la lactosa

Las reacciones químicas de la lactosa implican la formación de derivados de esta, por diversos medios químicos y los cambios inducidos por el procesamiento. La formación de derivados de lactosa es cada vez más importante para los usos industriales de la lactosa. La mayoría de las reacciones químicas de la lactosa implican uno o más de los siguientes: (a) hidrólisis del enlace 1-4 entre las unidades de galactosa y glucosa; (b) reducción del grupo aldehído de la unidad de glucosa; (c) interacción con los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa y galactosa; o (d) los enlaces carbono a carbono. Estas reacciones son importantes tanto para los cambios inducidos por el procesamiento en la lactosa como para la preparación de derivados

químicos de la lactosa. Los cambios químicos de importancia incluyen oxidación, reducción, deshidratación y fragmentación (Zadow, 2012) .

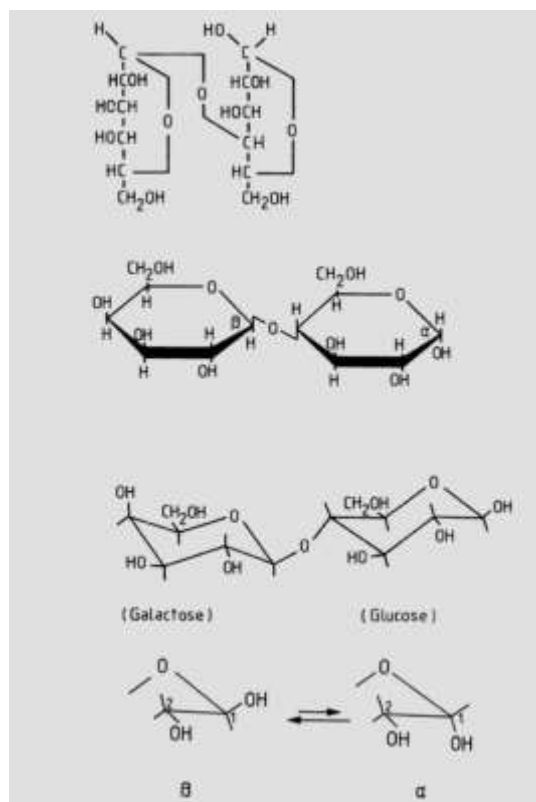


Figura 3. (a) Formula estructural de la lactosa. (b) Formas alfa (α) y (β) de la lactosa (Zadow, 2012)

Como se mencionó previamente, la lactosa está formada por galactosa y glucosa. El carbono asimétrico (C-1) de la glucosa permite la formación de dos posibles anómeros, que se designan como alfa (a) y beta (b). Por lo que la lactosa se puede presentar en ambas formas (a o b) las cuales difieren en la configuración estérica del H y el OH alrededor de C-1 de glucosa, como se observa en la Figura 3 (Zadow, 2012). La a- y b-lactosa difieren en su rotación específica. A 20 ° C, la a-lactosa tiene una rotación de + 89.4°, y la b-lactosa tiene una rotación de +35° (P. F. Fox, 2013). Una solución de lactosa en equilibrio tiene una rotación óptica de +55.7°. La distribución de a-lactosa y b-lactosa en solución es de aproximadamente 37.3% a-lactosa y 62.7% b-lactosa, o una proporción b/a de 1.6813 a temperatura ambiente.

La relación de α y β lactosa depende de la temperatura, pero es independiente del pH. La lactosa es un azúcar reductor que cuenta con un grupo carbonilo (un grupo aldehído en el caso de la lactosa) libre o potencialmente libre. Al igual que otros azúcares reductores, la lactosa existe parcialmente como una forma de cadena abierta con un grupo aldehído. Este grupo aldehído puede formar un enlace hemiacetal con grupos OH, lo que deriva en una estructura de anillo. La formación de un grupo hemiacetal crea un nuevo centro quiral (carbono asimétrico) que puede existir como dos isómeros α o β . Al abrir y formar alternativamente la estructura del anillo, la molécula puede intercambiarse entre los anómeros en un proceso denominado mutarrotación (P. Fox, 2009). La mutarrotación se ralentiza, pero no se detiene en el estado vítreo. La mayoría de los investigadores han utilizado la polarimetría para determinar la proporción de β -lactosa y α -lactosa durante el proceso de mutarrotación (Smithers & Augustin, 2012). Bund y col. (2007) han sugerido que distintos factores como la temperatura, el pH y las impurezas, pueden influenciar la mutarrotación así como la solubilidad de la lactosa en solución.

2.6 Cristalización de lactosa

La cristalización es una técnica vital para muchos procesos que ocurren en la naturaleza y en las industrias química, farmacéutica y alimentaria. La cristalización es un paso de aislamiento atractivo para la industria debido a que este proceso único combina la formación de partículas y la purificación. Casi todos los productos químicos en forma de polvos finos como tintes, explosivos y materiales fotográficos requieren cristalización en su fabricación. Además, más del 90% de todos los productos farmacéuticos contienen sustancias farmacológicas bioactivas y excipientes en estado sólido cristalino (Erdemir, Lee, & Myerson, 2009).

La cristalización es un proceso de dos pasos que incluye, nucleación y crecimiento del núcleo a macro núcleos. El primer paso implica la activación de partículas pequeñas e inestables con suficiente exceso de energía superficial para formar una nueva fase estable. Este fenómeno puede ocurrir en soluciones

sobresaturadas como resultado de un choque mecánico, por la introducción del tipo deseado de cristales pequeños (siembra), o en presencia de ciertas impurezas. Los factores que influyen en los procesos de cristalización son solubilidad, sobresaturación, siembra, factor de la forma del cristal, agitación, cinética y velocidad de crecimiento, cinética y velocidad de nucleación, cinética de aglomeración, etc. (S. R. Patel, Murthy, & Reviews, 2012).

El proceso convencional de cristalización de la lactosa involucra al lactosuero concentrado. Para obtener este concentrado el lactosuero se hierve hasta alcanzar 50-70% de sólidos. Dependiendo del pH, las proteínas del suero pueden precipitar durante el proceso de concentración. El suero concentrado caliente contiene una cantidad de lactosa elevada, la cual al enfriar comienza a nuclear y posteriormente a cristalizar por diferencias en su solubilidad. Los cristales crudos de lactosa resultantes se lavaban con una solución de etanol al 70-80% y secan en secadores rotativo; sin embargo, la pureza y los rendimientos en este tipo de cristalización son bajos (Durham, 2009). El rendimiento y la pureza de los cristales dependen de las proteínas y minerales presentes en el suero. La mayor pureza y los mejores rendimientos se pueden obtener del suero desproteínizado y desmineralizado. La pureza de la lactosa está significativamente influenciada por las propiedades del suero inicial y su contenido de proteínas y minerales (S. R. Patel et al., 2012).

2.6.1 Supersaturación

La primera etapa para la cristalización de lactosa es la súper saturación y esta se logra de manera espontánea solo cuando el sistema no está en equilibrio (Erdemir et al., 2009). Las soluciones súper saturadas se clasifican en de dos tipos, las metaestables que requieren siembra antes de la cristalización, y las denominadas lábiles que pueden cristalizar espontáneamente al tener un mayor grado de sobresaturación (Herrington, 1934). Las soluciones de lactosa (incluyendo al lactosuero) tiene la característica de poder ser altamente sobre saturadas antes de la cristalización. Por lo tanto, la cristalización ocurre de forma espontánea, aunque muy lentamente. En general, la súper solubilidad a cualquier temperatura es igual al valor

de saturación (solubilidad) a una temperatura de 30 °C o más alta. En ausencia de núcleos y agitación, las soluciones de lactosa pueden ser altamente sobresaturadas antes de que ocurra la cristalización espontánea. Incluso en tales soluciones, la cristalización ocurre con dificultad (P. F. Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, & O'Mahony, 2015).

Tanto el tamaño como la forma dependen de los cristales dependen del mecanismo de crecimiento influenciado por la estructura y defectos del cristal, la temperatura, el tipo de disolvente, impurezas, aditivos y la sobresaturación. A mayor sobresaturación, será menor el tamaño de las partículas o cristales, esto debido al efecto que tiene la sobresaturación sobre la tasa o velocidad de nucleación. Esto quiere decir que entre más sean los núcleos producidos con respecto al tiempo, menor será la capacidad de crecimiento de los cristales; dando como resultado partículas más pequeñas (Garnier, Petit, & Coquerel, 2002).

2.6.2 Nucleación

Después de la fase de súper saturación, las moléculas disueltas en solución comienzan a agregarse. Estos agregados crean fluctuaciones de concentración, lo que eventualmente conduce a la formación de núcleos que pueden actuar como centros de cristalización. Un núcleo puede definirse como la cantidad mínima de una nueva fase capaz de existir de manera independiente. Estos núcleos pequeños en una fase inicialmente metaestable es lo que conocemos como nucleación, la cual es un mecanismo principal de transición de fase de primer orden (Erdemir et al., 2009).

La nucleación es un proceso activado en el que el estado de transición se asocia con la unión de moléculas a través de fuerzas intermoleculares, como enlaces de hidrógeno, π - π e interacciones Van Der Waals. La nucleación puede ser inducida en dos vías diferentes: espontánea o inducida. La nucleación espontánea solo puede ocurrir a niveles muy altos de sobresaturación en la zona lábil (se llama nucleación primaria y homogénea). La nucleación también puede ser inducida por una interfaz sólida como una pared del recipiente o una partícula preexistente, en cuyo caso se

llama nucleación primaria y heterogénea; o un cristal del soluto, en cuyo caso se llama nucleación secundaria. La nucleación secundaria se produce porque los cristales del soluto pueden actuar como plantillas para la formación de nuevos núcleos o romperse para formar nuevos núcleos (Zamanipoor, Mancera, & technology, 2014).

Las tasas de nucleación dependen de la sobresaturación, agitación, impurezas, número y tamaño del cristal semilla (Durham, 2009)). Se puede lograr un mayor control sobre la nucleación controlando la sobresaturación. Tanto la nucleación como el crecimiento de los cristales ocurren rápidamente a altas sobresaturaciones en la zona lábil. Por lo que generalmente es deseable no aumentar la sobresaturación a niveles tan altos. Operar en esta región, promueve el crecimiento de cristales y provoca una nucleación incontrolable que conduce a una formación de cristales pequeños y una distribución de cristales amplia. El contar con una amplia distribución de cristales dificultará las operaciones de centrifugación, filtración y lavado. En consecuencia, la recuperación de lactosa es reducida y la calidad del producto final es baja. De esta forma, para conseguir la formación de partículas grandes de cristales y minimizar la distribución de cristales es necesario maximizar el crecimiento de los cristales y reducir la nucleación secundaria (Zamanipoor et al., 2014). Otro aspecto para considerar es la velocidad de cristalización, debido a que esta es dependiente de la nucleación. Cuando la nucleación es rápida, se generarán una mayor cantidad de cristales de manera simultánea, los cuales crecen a un tamaño similar. Por el contrario, si la velocidad de nucleación se reduce, muy pocos cristales crecerán en el momento. Además, si la sobresaturación se disminuye lentamente, la nucleación continuará por un tiempo mayor. En consecuencia, la distribución de tamaño de los cristales no será uniforme. En suma, si se manipula el proceso de nucleación en las soluciones, se podrá controlar la distribución de tamaños, el polimorfismo, y otras propiedades de los cristales (Vekilov & design, 2010).

2.6.3 Formación y crecimiento de los cristales de lactosa

La etapa de crecimiento sigue inmediatamente a la nucleación y se rige por la difusión de partículas (llamadas unidades de crecimiento) a la superficie de los núcleos existentes y su incorporación en la estructura de la red cristalina. (Erdemir et al., 2009). El crecimiento de cristales se lleva a cabo a través de dos mecanismos, crecimiento en espiral y crecimiento bidimensional. El crecimiento en espiral es posible a bajas sobresaturaciones, en donde el crecimiento ocurre mediante la adición de unidades de lactosa en forma de espiral. El crecimiento bidimensional ocurre en sobresaturaciones más altas donde el área de superficie para el crecimiento no es suficiente para la presión de precipitación. De esta manera, se pueden formar núcleos bidimensionales en las superficies de los cristales (Dincer, Ogden, & Parkinson, 2009).

Una vez que se forman los núcleos, estos crecen hasta formar cristales. En general, los siguientes mecanismos están involucrados en el crecimiento del cristal: difusión masiva, difusión superficial e integración de unidades de crecimiento en la superficie del cristal. (Zamanipoor et al., 2014). Una vez que se ha formado un número suficiente de núcleos, el crecimiento de los cristales ocurre a una velocidad influenciada por el grado de sobresaturación, el área de superficie disponible para deposición, viscosidad, temperatura y mutarrotación (P. Fox, 2009). La tasa de crecimiento del cristal de lactosa aumenta fuertemente con el aumento de la sobresaturación dependiendo de la temperatura; a su vez el aumento de la temperatura aumenta la tasa de crecimiento de los cristales (Smithers & Augustin, 2012).

La lactosa normalmente se cristaliza como α -lactosa monohidratada, que contiene una molécula de agua por cada molécula de lactosa. Los cristales son muy duros y se disuelven lentamente, y su tamaño es superior a 10–14 μm . Por lo tanto, los cristales de lactosa pueden detectarse sensorialmente creando una sensación arenosa. Los cristales de α -lactosa monohidratada normalmente adquieren una forma tipo Tomahawk (Fig.4) durante la cristalización.

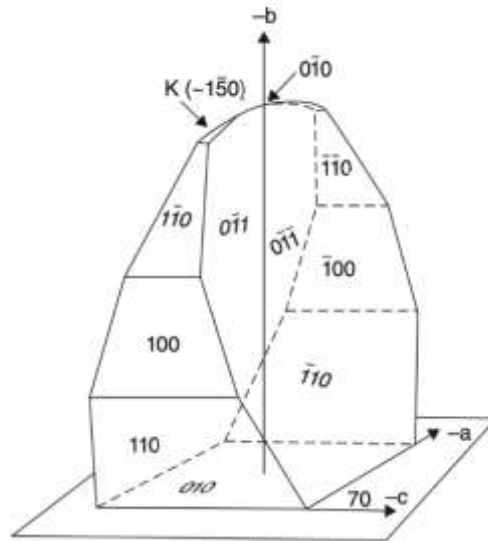


Figura 4. Forma de Tomahawk de cristales de α -lactosa monohidratada (Durham, 2009).

La forma Tomahawk surge de la inhibición del crecimiento de la cara 011 del cristal (Fig.4). Aparentemente esta inhibición del crecimiento se debe a la unión e inclusión de β -lactosa en la cara 011, lo que inhibe el crecimiento del cristal (Durham, 2009). El crecimiento y la forma de los cristales son inhibidos por varias sustancias aparte de la β -lactosa, entre los que se encuentran la riboflavina, la gelatina y el monofosfato de lactosa que está presente en la leche a una concentración de $\sim 15 \text{ mg litro}^{-1}$ (Morrissey, 1985). Otros parámetros como el pH, la presencia y la calidad de los núcleos y el contenido de cristales de la suspensión cristalizada también influyen en el crecimiento de cristales (Smithers & Augustin, 2012). Pispönen y col. en el 2013, hicieron un estudio donde observaron el efecto del pH en la formación en el tamaño y la morfología de los cristales de lactosa. Estos autores encontraron que un pH óptimo para obtener cristales de alta calidad es a pH 4 o cercano a este. Cuando se usa pH 6 o pH 8, la variación de las dimensiones de los cristales es demasiado amplia. Esto da como resultado la obtención de una masa heterogénea con cristales muy grandes y pequeños. Al disminuir el pH por debajo de 4, la diferencia entre las dimensiones de los cristales es mínima, pero los cristales en sí mismos son pequeños. Cristales obtenidos con un nivel de pH de 2 y 3 fueron significativamente más pequeños que los

cristales obtenidos a otros niveles de pH. Además, el tamaño de los cristales a niveles bajos de pH puede verse afectado por la presencia de proteínas de suero desnaturalizadas. Los pHs entre 2 y 3 son más bajos que el punto isoeléctrico de las proteínas del suero por lo que estas tienden a precipitar aumentando la viscosidad de la solución, lo que, a su vez, retarda el crecimiento de los cristales de lactosa. Es por esto que Pisponen y col. (2013) concluyeron que la acidez óptima para la cristalización de lactosa era cercana al pH 4; mientras que, a niveles de pH más altos o bajos, se inhibe el crecimiento de cristales.

La β -lactosa es la forma cristalina predominante para las cristalizaciones inducidas a temperaturas mayores de 93 °C (Durham, 2009). Mientras que la lactosa amorfa se forma cuando la lactosa se seca rápidamente (p.e. durante el secado por aspersión). La lactosa amorfa consiste en una mezcla vítrea de α - y β -lactosa. Esta forma de la lactosa es muy higroscópica, con una fuerte tendencia a recristalizarse en α -lactosa monohidratada. Las propiedades de la lactosa cristalina se ven afectadas por su estructura polimórfica, que en gran medida se define por la relación anomérica de β a α . Diferentes polimorfos de lactosa tienen diferentes densidades, higroscopiedades, puntos de fusión, solubilidades y velocidades de disolución. En consecuencia, la forma cristalina de la lactosa en los polvos lácteos determina las propiedades físicas del polvo; incluyendo fluidez, higroscopiedad, solubilidad y apelmazamiento (Durham, 2009).

2.6.4 Cristalización espontánea y cristalización inducida

Para poder abordar los procesos de cristalización espontánea o inducida debemos abordar nuevamente la solubilidad y super solubilidad de la lactosa. La solubilidad es la cantidad de soluto requerido para hacer una solución saturada en una condición dada. Por consiguiente, una solución súper saturada se entiende como una solución en la que la concentración de soluto excede el equilibrio de saturación a una temperatura dada (Myerson, 2002). Desde el punto de vista termodinámico, la sobresaturación es la diferencia adimensional en el potencial químico entre una molécula en un estado de equilibrio y una molécula en su estado sobresaturado. Por

consiguiente, se considera que la sobresaturación es la fuerza impulsora de la cristalización (Wong & Hartel, 2014). Sin embargo, el que una solución se encuentre sobresaturada no implica que se induzca espontáneamente el proceso de nucleación y por tanto de cristalización.

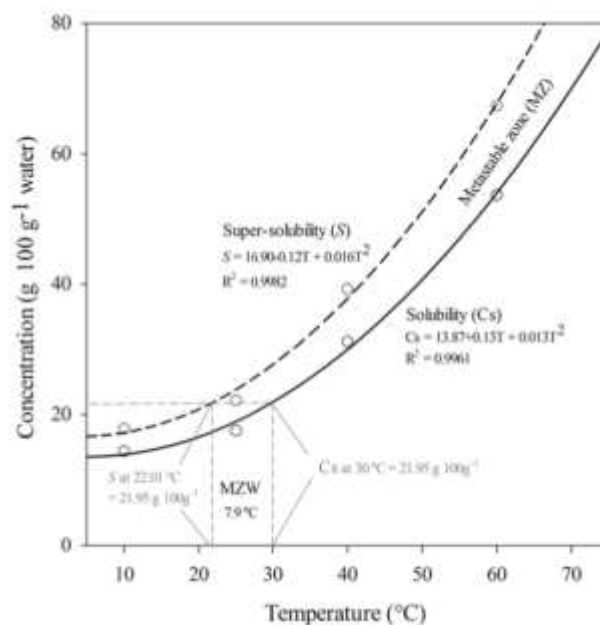


Figura 5. Solubilidad (Cs), súper solubilidad (S), y amplitud de la zona metaestable (MZW) de la lactosa (Tomado de Sánchez-García, 2021).

En la Figura 5 se describe una curva típica de solubilidad y súper solubilidad de la lactosa. La zona estable (insaturada) se encuentra debajo de la curva de solubilidad. En esta zona no ocurre ni nucleación ni cristalización. La zona metaestable se encuentra entre la curva de solubilidad y la curva de súper saturación. En la zona metaestable puede ocurrir la nucleación y cristalización, pero solo si se induce mediante la adición de núcleos (p.e. lactosa en polvo) o se aplica energía suficiente para inducir la nucleación (p.e. ultrasonido, agitación). A este proceso de cristalización se le denomina como “cristalización inducida”. Por arriba de la curva de súper saturación la nucleación y la cristalización pueden ocurrir de forma espontánea (aunque no está garantizado que así ocurra) (Vasconcelos Corrêa, 2013). A este proceso de cristalización se le denomina “cristalización espontánea”.

La aparición espontánea de una nueva fase (núcleos) puede ocurrir solo cuando un sistema está en una condición de no equilibrio (desequilibrio). La nucleación puede ocurrir espontáneamente o ser inducida artificialmente por siembra, agitación, choque mecánico, campos eléctricos, magnéticos y otras influencias externas (Myerson, 2002). En procesos de cristalización espontánea observamos lo que se conoce como nucleación primaria. Este tipo de cristalización ocurre en presencia o ausencia de partículas suspendidas que catalizan la formación de cúmulos estables (Wong & Hartel, 2014). Esto quiere decir que, si una solución no contiene partículas extrañas sólidas ni cristales de su propio tipo, los núcleos solo pueden formarse por nucleación primaria homogénea. Si hay partículas extrañas presentes, se facilita la nucleación y el proceso se conoce como nucleación primaria heterogénea (Mersmann, 2001). En contraste, en la cristalización inducida ocurre una nucleación secundaria, específicamente una nucleación secundaria de contacto, nucleación secundaria de superficie o nucleación secundaria aparente. Todos estos tipos de nucleación están relacionadas a impactos entre partículas, choque con agitadores o partes de reactor; lo cual ocurre principalmente como una consecuencia de la agitación (Vasconcelos Corrêa, 2013). La generación de una nucleación secundaria por rompimiento de cristales, permite una aceleración de mecanismo como nucleación secundaria de superficie (Kondepudi & Sabanayagam, 1994). A su vez, puede cambiar la meta estabilidad aparente de la solución, modificando el ancho de la zona metaestable (Myerson, 2002).

Se ha reportado que para lograr una distribución de tamaño de cristales específica es importante controlar la sobresaturación. Lo anterior puede lograrse a través de cambios programados en la temperatura de enfriamiento, presión de vacío y velocidad de agitación (Camilo, 2010). Es por esto que uno de los mayores beneficios del uso de sistemas de agitación para inducir la nucleación y cristalización es el mezclado. Ya que es importante generar una sobresaturación suave y uniforme dentro de la solución de cristalización. Es decir, se requiere lograr una distribución uniforme de moléculas de soluto o iones y un gradiente de temperatura insignificante a nivel macro y molecular (Mersmann, 2001). Por ejemplo, en la cristalización de sacarosa es indeseable la

cristalización espontánea, debido a que a entre mayor sea el valor de super saturación en la solución se induce a que la cristalización ocurra en la zona lábil (cristalización espontánea). La cristalización espontánea conduce a una mayor diferencia en la distribución de los tamaños de cristales. Lo que provoca la adición de operaciones unitarias extra como la molienda, aumentando el costo y tiempo del proceso. Por lo que en este tipo de industria se busca comúnmente trabajar en una zona meta estable donde se genere el crecimiento de cristales, no su formación. Por lo tanto, se opta el utilizar el sembrado de cristales asistida por la agitación mecánica para promover una nucleación secundaria (Morales, di Sciascio, & Amicarelli, 2018).

2.6.5 Purificación de cristales de lactosa (efecto de impurezas)

El grado de cristalinidad de drogas y excipientes juega un papel muy importante en las formulaciones de fármacos, ya que afecta la tasa de disolución, la estabilidad fisicoquímica, la higroscopicidad e incluso la biodisponibilidad del medicamento (Katainen, Niemelä, Harjunen, Suhonen, & Järvinen, 2005). Es por esto que las impurezas en el lactosuero limitan la eficiencia del proceso, debido a que afectan el crecimiento y el rendimiento de los cristales. Las impurezas adsorbidas en la cara de cristal impiden el crecimiento suave de una nueva capa. El cristal de lactosa crece en espiral, por lo tanto, las capas crecen una sobre otra. Si el crecimiento de la capa inferior es detenido por impurezas, la capa superior crece hasta que cubre completamente la impureza y de ahí en adelante seguirá creciendo. (A Pisponen et al., 2014). Las impurezas atrapadas y el color amarillo reducen el grado y el valor de los cristales de lactosa. El rendimiento de cristalización de la lactosa es del 65 al 75% con las mejores prácticas. La producción farmacéutica de lactosa requiere una segunda cristalización, alcanzando mayor pureza por medio de la aplicación de filtración del lactosuero en filtros de carbón activado y coadyuvantes, lo que impacta en costo y desperdicio adicionales (Durham, 2009). Para reducir estas impurezas, se han evaluado la coagulación térmica y ácida, y la ultrafiltración para fraccionar proteínas de suero y el intercambio iónico y electrodiálisis para la desmineralización. La

coagulación térmica y la ultrafiltración son lo suficientemente eficientes como para recuperar y eliminar proteínas del suero (Guu & Zall, 1991).

2.6.6 Co-cristalización

La co-cristalización es un fenómeno supramolecular de agregación de dos o más entidades químicas diferentes en una red cristalina a través de interacciones no covalentes (Cherukuvada, Kaur, & Row, 2016). A estos diferentes compuestos, especies o entidades químicas o moleculares se denominan como co-formadores. Los cuales son moléculas que se asocian entre si propiciando la formación de cristales o dicho de otra manera co-cristales (Pawar, Saha, Nandan, & Parambil, 2021). Los co-cristales son el producto de la cristalización de múltiples componentes (Patole, Deshpande, & Research, 2014). El Departamento de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) define los co-cristales como “materiales cristalinos compuestos de dos o más moléculas dentro de la misma red cristalina”; mientras que la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) define los co-cristales como “estructuras cristalinas homogéneas formadas por dos o más componentes en una relación de estequiometría definida donde la disposición en la red cristalina no se basa en enlaces iónicos” (Thayyil, Juturu, Nayak, & Kamath, 2020).

Los co-cristales exhiben características diferentes de las de sus co-formadores, por ejemplo, en su estabilidad, puntos de fusión, propiedades mecánicas y polimorfismo (Pawar et al., 2021). Entre las principales ventajas de los co-cristales se encuentran el aumento de la solubilidad, mejora de la biodisponibilidad, permeabilidad, y estabilidad. Además, los co-cristales aumentan la retención de la bioactividad del ingrediente activo de grado farmacéutico (Sarraguça, Ribeiro, Dos Santos, & Lopes, 2015).

Existen varios procesos por los cuales se puede llevar a cabo la co-cristalización, pero los principales son a partir de soluciones o de un estado sólido. Los métodos de estado sólido implican el uso de poco o ningún solvente. Los métodos basados en

soluciones usan grandes cantidades de solvente, lo que requiere la separación posterior del producto cristalino del licor madre (Pawar et al., 2021).

2.6.7 Interacción de polifenoles y macromoléculas como proteínas o polisacáridos

Los polifenoles pueden interactuar con macromoléculas como las proteínas o los polisacáridos de forma reversible e irreversible. Estas interacciones pueden darse mediante enlaces covalentes y no covalentes. En enlaces no covalentes las uniones que se forman son de baja energía individualmente y además son potencialmente reversibles. Entre este tipo de enlaces se encuentran los puentes hidrógeno, enlaces hidrófobos y fuerzas de van der Waals. En los covalentes, las interacciones entre polifenoles y proteínas son irreversibles; ya que implican la oxidación de compuestos fenólicos y la formación de O-quinonas u O-semi-quinonas. Alternativamente o la escisión de enlaces interflavánicos de proantocianidina en medio ácido con formación de carbocationes.

Por otro lado, los polifenoles también pueden interactuar con polisacáridos formando enlaces no-covalente mediante puentes de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas (C Le Bourvellec, Renard, & nutrition, 2012)

2.6.8 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que contienen una estructura básica de benzopirona. Hasta la fecha se han reportado más de 4000 tipos de flavonoides derivados de las plantas (Ganeshpurkar & Saluja, 2017). Los flavonoides fueron descubiertos por el premio Nobel Albert Szent Gyorgyi en el año 1930 (Lakhanpal & Rai, 2007). Estos metabolitos secundarios de polifenoles están ampliamente distribuidos en plantas de uso medicinal, frutas, té y bebidas saludables (Zielinska, Szawara-Nowak, Zielinski, & sciences, 2010). Entre toda la variedad de compuestos que se clasifican dentro de los flavonoides la quercetina es el más abundante, representando el 60-75% del total de los flavonoles consumidos (Vicente-Vicente, Prieto, & Morales, 2013).

Los flavonoides fueron identificados por primera vez como vitamina P y, junto con la vitamina C, se descubrió que eran importantes en el mantenimiento de la integridad de la pared capilar y la resistencia capilar (Formica, Regelson, & toxicology, 1995). Estos compuestos cuentan con un esqueleto de difenil propanoide C6-C3-C6 que combina dos anillos de benceno con tres carbonos. Los flavonoides se clasifican estructuralmente como flavonas, flavonoles, flavanonas, flavonoles, isoflavonas y flavonoles (catequinas). En sentido amplio, los flavonoides contienen antocianinas y chalconas, auronas, leucoantocianidinas (flavan 3,4-dioles), proantocianidinas (tanino) y dihidrochalconas (Terahara, 2015). Los flavonoides responden a la luz y se sabe que controlan el nivel de auxinas, los reguladores del crecimiento y la diferenciación de las plantas. Además, estos compuestos fenólicos proporcionan color, textura, sabor y en algunos casos imparten protección antifúngica y bactericida. En las plantas los flavonoides pueden afectar la polinización al inhibir o estimular la alimentación de los insectos. Muchos de los roles biológicos que desempeñan los flavonoides están asociados con sus capacidades de unión a metales (p.e., hierro y cobre), lo que favorece su actividad antioxidante y de protección contra la irradiación UV (Formica et al., 1995).

Algunos de los efectos bioquímicos y farmacológicos que se han asociado con los flavonoides son su actividad antioxidante, su efecto citostático en la tumorigénesis así como su capacidad de inhibir un amplio espectro de enzimas (p.e. la quinasa C y la topoisomerasa II). Los flavonoides también han sido atribuidos como posibles agentes anticancerígenos y cardioprotectores (Skibola, Smith, & medicine, 2000). Sin embargo, aún no es claro el efecto real que tiene el consumo de flavonoides por el ser humano, principalmente porque muchos flavonoides son degradados tras su paso por el sistema digestivo. Se ha reportado que las bacterias intestinales están equipadas con una amplia selección de enzimas hidrolíticas capaces de degradar numerosos tipos de flavonoides glicosilados de la dieta. En cuanto a la excreción o eliminación de los flavonoides, estos se eliminan de forma lenta principalmente a través de la orina, aunque una parte puede ser secretada en la bilis y posteriormente eliminada en las heces (Aherne & O'Brien, 2002).

2.6.9 Rutina

La rutina es un compuesto fenólico de bajo peso molecular descubierto en el siglo XIX (Yang et al., 2008). La rutina obtiene su nombre de la planta *Ruta graveolens*, la cual es comúnmente conocida como ruda (Atanassova, Bagdassarian, & Metallurgy, 2009). Sin embargo, esto no significa que solo en esta planta podamos encontrar a la rutina, ya que se ha reportado la presencia de rutina de manera abundante en plantas, frutas y vegetales como la pasiflora, trigo sarraceno, té, uvas y manzana (Ganeshpurkar & Saluja, 2017). Siendo la uva y el trigo sarraceno donde se encuentran las concentraciones más altas de rutina. La concentración de rutina en productos derivados de las flores, sémola y hojas de trigo sarraceno puede variar según el método de procesamiento y de la parte de la planta con la cual se esté trabajando. No obstante, se ha reportado que, en productos producidos a partir de la semilla de trigo sarraceno, la concentración de rutina puede alcanzar valores de 0.48-4.97 mg por cada 100g de semilla de trigo sarraceno (Cheol Ho, Kim, Choi, Heo, & Kim, 2000). La rutina pertenece a los flavonoides y es la forma glucosilada de la quercetina. La rutina suele encontrarse en diversas plantas en la semilla, pero también en la raíz, flores, tallo o en la cáscara de frutos (Frutos, Rincón-Frutos, & Valero-Cases, 2019). Tanto la rutina, quercetina, quercitrina y otros flavonoides, son metabolitos secundarios los cuales se sintetizan en la planta para protegerlas de la irradiación UV, enfermedades y depredadores (Kreft, Fabjan, & Germ, 2003).

En humanos, la rutina tiene la capacidad de unirse al ion de Hierro Fe^{2+} evitando que se una al peróxido de hidrógeno y previniendo la formación de un radical libre altamente reactivo que podría dañar las células (Atanassova et al., 2009). La rutina ha demostrado tener actividades farmacológicas, como lo son las actividades antioxidantes, cito protectoras, vaso protectoras, anticancerígenas, neuro protectoras y cardio protectoras (Ganeshpurkar & Saluja, 2017). El efecto de neuro protector de la rutina es uno de los más estudiados. Lo anterior debido a que, el cerebro es muy susceptible a recibir daño por oxidación y sus bajos niveles de protección antioxidante convierten a los flavonoides, como la rutina, en potenciales agentes farmacológicos por sus propiedades antioxidantes (Frutos et al., 2019). También se ha reportado que

la rutina y las antocianinas tienen una alta estabilidad en los jugos de frutas debido a las reacciones de co-pigmentación; lo que mejora la estabilidad del color durante el almacenamiento (Hernández-Herrero & Frutos, 2015)

2.6.10 Quercetina

El nombre quercetina proviene del latín quercetum que significa bosque de robles (roble quercus). La quercetina pertenece a los flavonoles, los cuales son una categoría dentro de los flavonoides. Este compuesto consta de tres anillos y cinco grupos hidroxilo, dicha estructura es la base de muchos otros flavonoides incluyendo los flavonoides cítricos como la rutina, las hesperidinas, la naringenina y la tangeritina. Además, existen conjugados de quercetina y glicona entre los cuales se pueden destacar la quercetin-3-rutinoside (rutina), quercetin-3-L-rhamnoside y 3-rhannosyl quercetin (thujin) (Lakhanpal & Rai, 2007).

La quercetina se encuentra en una gran variedad de frutas y vegetales como alcaparras, apio de monte, eneldo, cilantro, cebollas, manzanas, y bayas como arándanos rojos (Rauf et al., 2018). Además, la quercetina se encuentra en el trigo sarraceno (M. Zhang et al., 2011), en bebidas como té y vinos, o específicamente en suplementos alimenticios (Boots, Haenen, & Bast, 2008). Este flavonol se encuentra además en las hojas y en las partes externas de las plantas en forma de agliconas y glucósidos. Es decir, uno o más grupos de azúcares se unen a grupos fenólicos por medio de enlaces glucosídicos. Como la quercetina se encuentra en la parte externa, esta suele perderse al momento de pelar o limpiar las frutas o verduras, o incluso al desechar las hojas o cascaras de estos alimentos (Wach, Pyrzyńska, & Biesaga, 2007). Vicente-Vicente y colaboradores (2013) reportaron concentraciones de quercetina en el té blanco de 2.5 mg/100 ml, en cebolla de 147 mg/100 g. No obstante, la concentración de quercetina en la cebolla depende del tipo de cebolla estudiada.

De un grupo de países estudiados (v.g. Dinamarca, Finlandia, Grecia, Italia, Japón, Países Bajos y Estados Unidos) la población japonesa es la que consume mayores cantidades de flavonoides gracias a la elevada ingesta de té. Se ha demostrado que

debido a las propiedades biológicas de la quercetina como lo son sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antioxidantes y psico estimulantes, permiten una mejorar el rendimiento físico y mental. Mientras que su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, la agregación plaquetaria y la permeabilidad capilar; termina reflejando beneficios en la salud general (Y. Li et al., 2016).

Una de las caracterizas más estudiadas sobre la quercetina es su poder antioxidante. Esta actividad antioxidante permite proteger al cuerpo contra las especies reactivas de oxígeno, producidas durante el metabolismo normal del oxígeno o inducidas por daño exógeno (Lakhanpal & Rai, 2007)La actividad antioxidante de la quercetina también es asociada con su capacidad para inhibir enzimas como la xantina oxidasa, lipooxigenasa y NADPH oxidasa, impidiendo la muerte celular (Vicente-Vicente et al., 2013). Otra actividad importante de la quercetina es su actividad anticancerígena. Según diversos estudios, la quercetina impide la propagación de varios tipos de cáncer como el de pulmón, próstata, hígado, mama, colon y cuello uterino. Aparentemente este efecto se debe el impacto que tiene la quercetina sobre la señalización celular y a su capacidad de inhibir las enzimas responsables de la activación de diversos carcinógenos. Según se ha descrito en la literatura, dicho efecto ocurre mediante la unión de la quercetina a receptores celulares y a diversas proteínas (Rauf et al., 2018)Finalmente, se ha reportado que la quercetina tiene una vida media en humanos de 31-50 horas, con un pico de concentración en plasma a la media hora y otro a las 8 horas tras la ingesta de 100 mg. Además, que la administración de dosis repetidas los metabolitos de quercetina conllevan a una eliminación más lenta de la misma (Graefe et al., 2001).

3 JUSTIFICACIÓN

Un subproducto de gran valor agregado por su contenido de lactosa y proteína es el lactosuero obtenido de la manufactura de queso. Debido a que el suero contiene una alta cantidad de agua, la separación de la lactosa y de las proteínas requiere de operaciones como evaporación, ultra o nano filtración y secado. El alto costo de inversión y operación de estas operaciones unitarias provoca que las pequeñas y medianas queserías no reutilicen o aprovechen este subproducto. Lo que conlleva muchas veces a su desecho en desagües o cuerpos de agua, convirtiéndolo en un problema ambiental. Debido a esta problemática es una prioridad el buscar alternativas para el uso de éste subproductos. El presente trabajo aborda el proceso de cristalización de lactosa a partir de suero dulce de queso Panela bajo diferentes condiciones de proceso (pH y agitación). Además, se estudió la viabilidad de generar a partir de lactosuero de queso Panela un azúcar enriquecido con antioxidantes (cristales de lactosa-flavonoides). De esta forma se podría obtener un producto con valor agregado que pueda hacer más atractivo económicamente la recuperación de lactosa del lactosuero.

4 HIPÓTESIS

A partir de lactosuero de queso Panela se pueden obtener cristales de lactosa de mejor calidad (mayor formación de alfa-lactosa monohidratada, tamaño pequeño y uniforme de cristales) cuando el suero se acidifica y se asiste la cristalización con agitación mecánica. Además, bajo estas condiciones de cristalización es posible formar co-cristales de lactosa-flavonoides utilizando rutina y quercetina.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Estudiar el proceso de cristalización de lactosa a partir de lactosuero de queso Panela variando condiciones de proceso como la agitación y el pH, evaluando el impacto de estas condiciones de proceso sobre la calidad de los cristales de lactosa (mayor formación de alfa-lactosa monohidratada, tamaño pequeño y uniforme de cristales). Además, evaluar la viabilidad de formar co-cristales de lactosa y flavonoides a partir de lactosuero de queso Panela.

5.2 Objetivos particulares

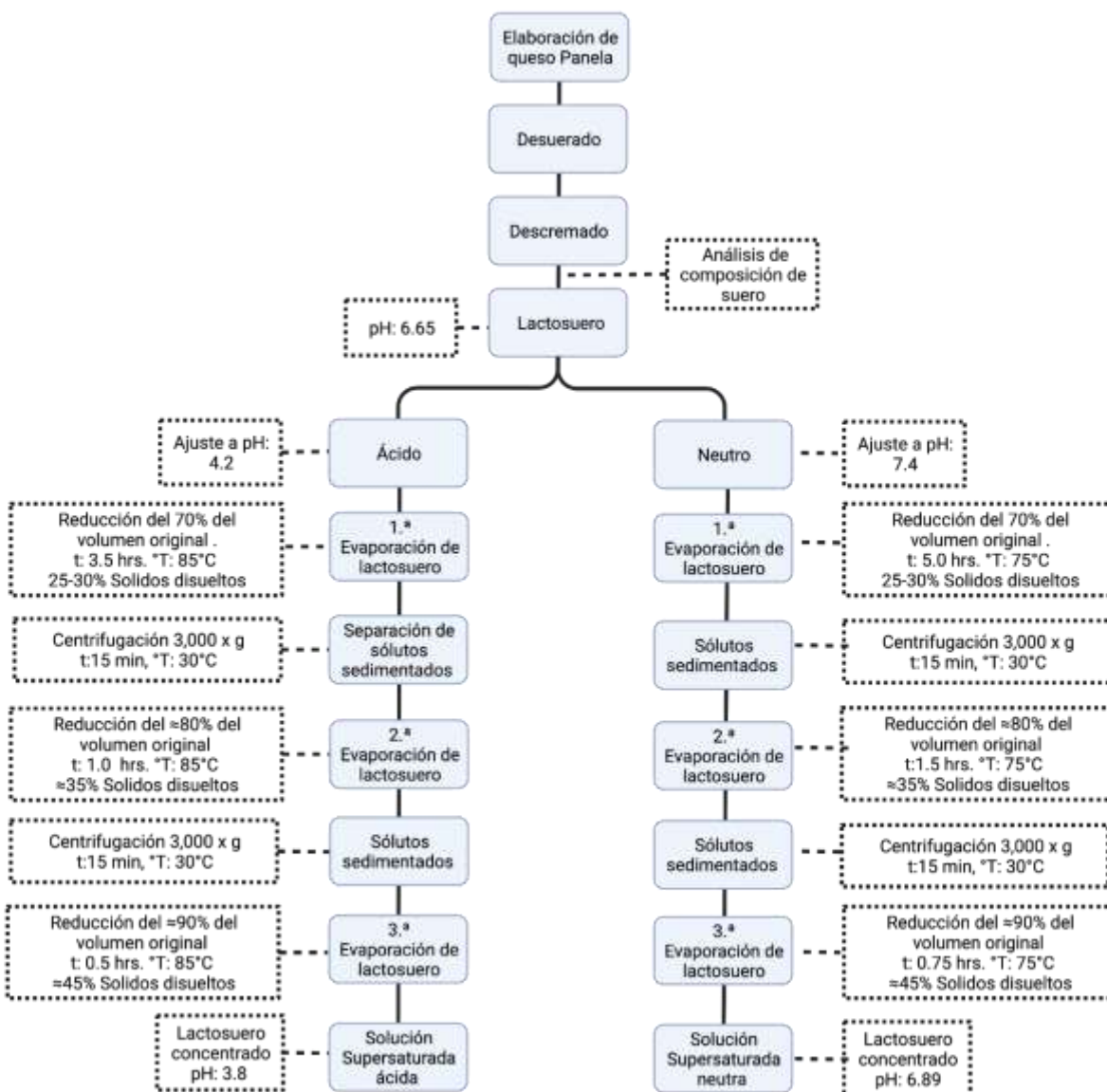
- Evaluar el proceso de cristalización de lactosa a partir de lactosuero obtenido de queso panela bajo condiciones de pH ácido y neutro, así como bajo condiciones de agitación mecánica.
- Evaluar la viabilidad de formar co-cristales de lactosa y rutina a partir de lactosuero de queso Panela acidificado.
- Evaluar la viabilidad de formar co-cristales de lactosa y quercetina a partir de lactosuero de queso Panela acidificado.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

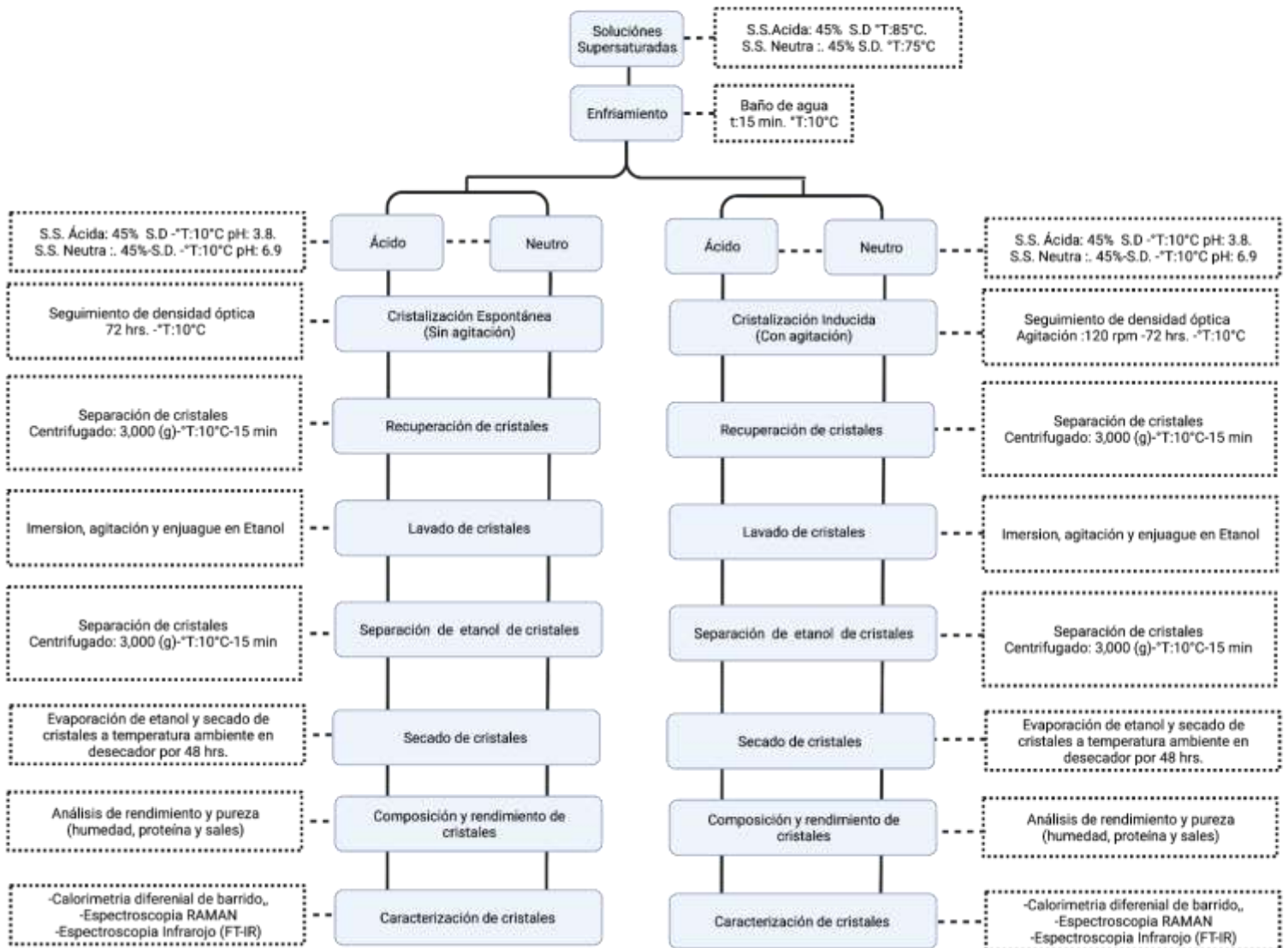
6.1 ETAPA 1: Cristalización de lactosa a partir de lactosuero de queso panela bajo condiciones de pH ácido y neutro, así como bajo condiciones de agitación mecánica

6.1.1 Diagramas metodológicos

6.1.1.1 Elaboración de Queso Panela y obtención de soluciones super saturadas ácidas y neutras



6.1.1.2 Cristalización espontánea e inducida por agitación



6.1.2 Materiales

- Leche pasteurizada LALA Entera, (Lactosa:4.04 %) Grupo LALA, Comercializadora de Lácteos y Derivados S.A. de C.V.; Gómez Palacio, Durango-México. Con la siguiente composición:

Tabla 1. Composición de la leche entera pasteurizada utilizada para la elaboración de queso Panela

Componente	Contenido
Lactosa (g 100 mL ⁻¹)	4.04 ± 0.01
Proteína (g 100 mL ⁻¹)	2.84 ± 0.02
Sales (g 100 mL ⁻¹)	0.75 ± 0.01
Densidad (Kg m ³)	1026.39 ± 0.07
pH	6.59 ± 0.02

- Quimosina (CHY-MAX®) CHR-HANSEN (Horsholm,Denmark)
- Cloruro de Calcio grado alimenticio.
- Ácido cítrico grado alimenticio.
- Sulfato de potasio bibásico marca PQF (REPROQUIFIN). Estado de México, México.
- Estándar de alfa lactosa anhidra (Sigma Aldrich-USA).
- Estándar de beta lactosa (Sigma Aldrich-país-USA).
- Microplacas de plástico fondo plano, estériles (CORNING, USA)
- Matras Erlenmeyer 125 ml (± 5%) PYREX (Made in Germany)
- Alcohol Etílico Etanol, HYCEL México S.A. de C.V. (Jalisco, México)

6.1.3 Equipos

- Descremadora eléctrica ELECREM 1 (Francia, Paris)
- Analizador de ultrasonido M250 Milktech (Miami, USA)
- Potenciómetro HANNA Instruments Woonsocket RI USA (Made in Romania)
- Refractómetro ABBE NAR-T1, ATAGO (Made in Japan)

- Lector de absorbancia para microplacas (BioTek instruments® ELx808, Vermont, USA)
- Baño de agua (JULABO GmbH, Seelbach, Germany)
- Parrilla con agitación (DLAB MS7-H550-S, California, USA)
- Centrifuga (Centrifuge 5702R, EPPENDORF, Germany)
- Refrigerador (TORREY CV-14, México)
- Espectrómetro RAMAN 785nm (Enwave Optronics, Inc., ProRaman-L High Performance Raman Spectrometer; California,USA),
- Espectrómetro FTIR (Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR Spectrometer; Massachusetts,USA).
- Microscopio óptico (Bx41 Olympus Optical Co. Ltd., Tokio)
- Cámara digital (KP-D50, Hitachi Kokusai Electronic Inc., Tokio).
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC 200PC, Netzsch, Alemania)

6.1.4 Diseño de experimentos y análisis estadístico

Se realizó un diseño factorial 2x2 utilizando el modelo lineal general que se muestra en la ecuación 1.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + e_{ijk} \quad (\text{Ec. 1})$$

En este modelo, los factores experimentales fueron ajuste de pH en el lactosuero (β) y agitación en el proceso de cristalización (τ). El factor numérico pH tuvo dos niveles, los cuales fueron pH 4.2 y pH 7.4. El factor categórico agitación también tuvo dos niveles, con agitación y sin agitación. En total se tuvieron 4 tratamientos o combinaciones, las cuales fueron replicadas mínimo 3 veces (algunos tratamientos se replicaron seis veces). Obtenidos los datos, se realizó un análisis de varianza utilizando un nivel de confianza del 0.05 (α). Además, los datos fueron sujetos a análisis de comparación múltiple de medias utilizando el método de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). Los análisis se realizaron en el programa Minitab (Versión minitab 19, Minitab LLC, Pennsylvania, USA). Mientras que los gráficos se editaron en el programa SigmaPlot (Sigma plot Versión 14.5, SYSTAT. California, USA).

6.1.5 Fabricación de Queso Panela y obtención de lactosuero

Como primer paso se vertieron seis litros de leche pasteurizada en un recipiente de acero inoxidable y se calentaron a una temperatura de 38 ± 2 °C. Una vez que la leche estuvo a temperatura estable, se añadieron 10 mL de una solución de cloruro de calcio al 12% y se mezcló durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 0.3 mL de quimosina (CHY-MAX, Chr-Hansen) diluida en 10 mL de agua desionizada y se agitó por 15 min. La leche se dejó coagular por 40 min a 38 C (± 2 °C). Una vez formado el gel, éste se cortó en pequeños cubos (~ 1 cm³) y se elevó la temperatura a 45 °C. Los cubos de cuajada se agitaron suavemente de forma intermitente durante 10 min para liberar la mayor cantidad de suero sin romper la cuajada. Posterior a la primera agitación, se dejó reposar la cuajada en el suero durante 30 min a 40 °C para sedimentar la cuajada. La cuajada se separó del suero utilizando un colador de plástico con un trozo de tela (manta) colocado en este. El queso panela se almacenó en refrigeración en una bolsa de plástico, mientras que el lactosuero fue filtrado nuevamente para retirar restos de cuajada.

El lactosuero obtenido del queso Panela se descremo por centrifugación utilizando una descremadora eléctrica (Modelo Elecrem 1, ELECREM. Francia, Paris). Posteriormente, el suero fue pasteurizado ($65^{\circ}\text{C} \times 40$ min), enfriado y almacenado en refrigeración a 8 ± 2 °C hasta su posterior uso (procurando que su almacenamiento no excediera siete días). Antes de ser usado, el lactosuero fue analizado en su composición general utilizando un analizador por ultrasonido (MilkTech Ultrasound analyzer MA250, Miami, USA). El pH del lactosuero se midió con un potenciómetro (HANNA Instruments Woonsocket RI USA) (ver sección de anexos).

6.1.6 Concentración del lactosuero

6.1.6.1 Tratamiento ácido.

Un litro de lactosuero de queso Panela se ajustó a un pH ácido de 4.22 ± 0.018 utilizando ácido cítrico. El ácido se adiciono lentamente a temperatura ambiente bajo agitación constante. El lactosuero acidificado se concentró evaporándolo en un recipiente de acero inoxidable, mediante agitación constante por medio de un magneto y velocidad variable, a una temperatura de $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esto se llevó a cabo hasta reducirlo aproximadamente en un 70% de su volumen inicial. En esta primera etapa de reducción (concentración) se alcanzó una concentración de solidos disueltos de entre 25-30%. mientras que el contenido de sólidos se midió utilizando un refractómetro (ABBE NAR-T1, ATAGO, Japón). En este punto se observaron precipitados, por lo que se interrumpió el proceso de evaporación para separar los precipitados por centrifugación a $3,000 \times g$ por 15 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Centrifuge 5702R, Eppendorf, Germany). Posteriormente se continuó con el proceso de evaporación hasta alcanzar 40% de solidos disueltos. En este punto las partículas precipitadas fueron separadas nuevamente por centrifugación ($3,000 \times g$, 15 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Finalmente se evaporó una última parte de agua hasta llegar a 45% de sólidos.

6.1.6.2 Tratamiento Neutro.

En un litro de lactosuero de queso Panela se ajustó su pH a 7.43 ± 0.043 utilizando fosfato de potasio dibásico. La base se adicionó en forma granular a temperatura ambiente bajo agitación constante. El lactosuero neutralizado fue vertido en un recipiente de acero inoxidable con agitación magnética variable a una temperatura de $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. A diferencia del tratamiento ácido, este tuvo que llevarse a cabo a temperaturas más bajas, debido a las reacciones de oscurecimiento presenciadas en pruebas anteriores de evaporación. Este lactosuero neutro se redujo en un 70 % de su volumen inicial, alcanzando un 30 % de solidos disueltos. Lo cual se midió utilizando un refractómetro (ABBE NAR-T1, ATAGO, Japan). En este punto se observaron precipitados, por lo que se interrumpió el proceso de evaporación para separar los precipitados por centrifugación a $3,000 \times g$ por 15 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Centrifuge 5702R,

Eppendorf, Germany). Posteriormente se continuó con el proceso de evaporación hasta alcanzar 40% de sólidos disueltos. En este punto las partículas precipitadas fueron separadas nuevamente por centrifugación (3,000 x g, 15 min a 30 °C). Finalmente se evaporó una última parte de agua hasta llegar a 45% de sólidos.

6.1.7 Cristalización espontánea de la lactosa

Las soluciones concentradas de lactosuero ácido y neutro a 85 °C y 75 °C (ambas con 45% de sólidos) fueron vertidas en matraces Erlenmeyer de 125 mL. El volumen, de trabajo fue de ~75 y 90 mL para las soluciones de lactosuero ácida y neutra respectivamente. Estas soluciones fueron sometidas a un enfriamiento rápido mediante un baño de agua con hielo a 7 °C durante 15 min. Trascurrido este tiempo las soluciones alcanzaron una temperatura entre 10-15 °C. Al alcanzar este punto, se colocaron en un baño de agua para mantener su temperatura a 10 ± 2 °C (Julabo GmgbH, Seelbach, Germany). Los matraces se incubaron a esta temperatura por 72 horas sin ningún tipo de agitación. Los experimentos se replicaron por lo menos tres veces bajo las mismas condiciones.

El proceso de cristalización se monitoreó midiendo cambios de absorbancia (ΔAbs) a 595 nm (Microplate reader Elx808, Biotek, USA) por 72 horas. La información recuperada se graficó ($y = \Delta Abs$, $x =$ tiempo en horas) y se ajustó a una función logística (Slogistic1) con el programa Origin 9.1.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA USA). En esta función (Ec. 2), ΔAbs representa el incremento de absorbancia durante la formación de cristales de lactosa, k es la velocidad de cristalización ($\Delta Abs \text{ hora}^{-1}$), t es el tiempo transcurrido de incubación y t_c es el tiempo requerido para alcanzar la mitad del máximo incremento de absorbancia ($Max_{\Delta Abs}$). El tiempo de inducción (t_0) o el tiempo al cual los nucleos comienzan a crecer fue calculado con la ecuación tres (Ec. 3). El proceso de cristalización se consideró completado cuando los valores de Δabs fueron constantes, lo cual ocurre a $2t_c$.

$$\Delta Abs = \frac{Max_{\Delta Abs}}{1 + e^{-k(t-t_c)}} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$t_0 = t_c - \frac{2}{k} \quad (\text{Ec. 3})$$

Después de 72 horas de incubación, los cristales de lactosa se separaron por centrifugación a 3000 x g por 20 min a 10 °C (Centrifuga 5702R Eppendorf, Alemania) en tubos cónicos de plástico (Falcon). Después, el sobrenadante se drenó y los cristales se bañaron con etanol, seguido de una agitación constante por un minuto. A continuación, los cristales con etanol se centrifugaron a 3000 x g por 20 min a 10 °C. Finalmente, el etanol se decantó y los cristales se colocaron en charolas de aluminio. Los cristales de lactosa se mantuvieron dentro de un desecador con sílica gel a 25 °C hasta que secaron (~48 horas).

6.1.8 Cristalización inducida por agitación.

Las soluciones concentradas de lactosuero ácido y neutro a 85 °C y 75 °C (ambas con 45% de sólidos) fueron vertidas en matraces Erlenmeyer de 125 mL. El volumen, de trabajo fue de ~75 y 90 mL para las soluciones de lactosuero ácida y neutra respectivamente. Dentro de los matraces se colocó una barra de agitación magnética de 1.5 cm y se taparon con parafilm. En este punto, las soluciones concentradas de suero tenían una temperatura de 75-85 °C. Después, las soluciones se enfriaron rápidamente en un baño de hielo (7°C) para lograr que estas se enfríen a 10-15 °C en un tiempo de 15 min. Posteriormente, los matraces se colocaron dentro de un refrigerador a 10 ± 2 °C (Torrey CV-14, CDMx, Mex) sobre una placa de agitación magnética ajustada a 120 rpm (DLab MS7-H550-S, CA, USA). Muestras de cada matraz se tomaron a diferentes intervalos de tiempo por un periodo de 72 horas para monitorear el proceso de cristalización. Las mediciones de absorbancia en las soluciones concentradas, el análisis de los datos, y la recuperación de los cristales de lactosa se realizó como se describió previamente para la cristalización espontánea de lactosa (ver 6.1.7)

6.1.9 Composición de los cristales recuperados

El contenido de proteína se midió mediante el método de Bradford con ligeras modificaciones. Brevemente, se molieron 100 mg de cristales finamente con un mortero para facilitar su disolución. Una vez molidos, los cristales se disolvieron con un mililitro de agua (1:10) desionizada ($> 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$). Aparte, en un pozo de una microplaca se depositaron 250 μL de solución de Bradford (azul de Coomassie G-250) más 5 μL de la solución de cristales de lactosa molidos. Esta mezcla se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente y después se leyó su absorbancia ($\lambda = 595 \text{ nm}$) un lector de microplacas (Biotek, Elx808, EUA). El contenido de proteína se calculó a partir de una curva de calibración creada con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA), como se muestra en el ANEXO 2 Curvas de calibración; en la figura 12. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de cuantificación de proteínas.

El contenido de minerales (cenizas) en los cristales se cuantificó por calcinación de la muestra según el método de la AOAC 900.02 A. Previo al análisis se colocó un crisol de cerámica a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar un peso constante para luego colocarla en un desecador por 15 min para enfriar. Posteriormente, se pesó la cápsula y se le añadió un gramo de cristales. La cápsula se metió a un horno de mufla de sobremesa (Thermolyne, Thermo scientific, USA) a $575 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 h para eliminar toda la materia orgánica presente en las muestras de cristales. Pasado el tiempo dentro de la mufla, la capsula paso a un desecador para reducir su temperatura. Una vez a temperada la capsula se volvió a pesar. Las cenizas que quedaron en la capsula, después de las 16h en la mufla, se consideraron como el contenido mineral (cenizas) por cada 100 gramos de cristales.

El contenido de humedad en los cristales se determinó por secado en estufa según lo especificado en la NOM-116-SSA1-1994. Para este fin, una cápsula de aluminio se colocó dentro adentro de una estufa a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante. Después, se añadió a la cápsula de aluminio un gramo de cristales, los cuales fueron secados a $60\text{-}70 \text{ }^\circ\text{C}$ en un horno de convección (Fisher Scientific, Isotemp 637G, USA) por 12-24

horas. Una vez que la muestra alcanza el peso constante se expresó la humedad como gramos de agua por cada 100 gramos de cristales.

El contenido de grasa no se determinó debido a que se utilizó para la cristalización suero desengrasado. El contenido de carbohidratos (lactosa) en los cristales se calculó por diferencia. Es decir, al 100% de la composición se le restó el contenido de proteína, humedad, y cenizas. Todos los análisis se realizaron por triplicado para cada réplica en cada tratamiento.

6.1.10 Rendimiento de cristalización y porcentaje de cristalización de lactosa

El rendimiento de cristalización (%rendimiento _{cristalización}) se expresó como gramos de cristales obtenidos por litro de lactosuero. El porcentaje de cristalización de lactosa se calculó con la ecuación 4 (Ec. 4). En esta ecuación, se consideró el peso en gramos de cristales recuperados ($P_{\text{cristales}}$), su contenido de lactosa (%lactosa _{cristales}), así como el peso en gramos de suero usado (P_{suero}) y el contenido de lactosa en el suero (%lactosa _{suero}).

$$\%cristalización\ lactosa = \frac{P_{\text{cristales}} \times \%lactosa_{\text{cristales}}}{P_{\text{suero}} \times \%lactosa_{\text{suero}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

6.1.11 Distribución de tamaños en los cristales y microscopías ópticas

Se tomó una muestra de 0.1 gramo de los cristales y se suspendieron en tres mililitros de etanol. Esta mezcla se colocó en un portaobjetos, el cual se colocó en un microscopio óptico (Bx41 Olympus Optical Co. Ltd., Tokio) con cámara digital (KP-D50, Hitachi Kokusai Electronic Inc., Tokio). Se tomaron fotografías de cada uno de los tratamientos. De estas imágenes se midió el tamaño de los cristales (~750 cristales por cada tratamiento) utilizando el software Adobe Photoshop 2020 (2020, Adobe systems incorporated, USA). Los datos recuperados se analizaron mediante el programa Minitab (Versión minitab 19, Minitab LLC, Pennsylvania, USA). para construir los correspondientes histogramas de distribución de tamaño de cristales.

6.1.12 Pureza de los cristales y tipo de lactosa cristalizada

Se utilizaron diferentes técnicas para caracterizar los cristales e identificar el tipo de lactosa obtenida por cristalización ácida y neutra para determinar el efecto del suero ácido. Los métodos utilizados fueron calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), espectroscopia RAMAN, espectroscopia de transmisión infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).

Calorimetría diferencial de barrido: Se tomó una muestra de 3-5 mg de cristales y se selló herméticamente en una cápsula de aluminio (crucibles Al; 25µl). La cápsula con la muestra junto con una cápsula vacía (control para generar la línea base) se colocaron en la cámara adiabática del Calorímetro diferencial de barrido (DSC 200PC, Netzsch, Alemania). Se utilizó nitrógeno gaseoso como gas inerte para conducir las pruebas y evitar que se generé algún tipo de combustión o reacción durante el calentamiento. El nitrógeno se mantuvo con un flujo de 20 mL min⁻¹ durante la purga de la cámara adiabática, y a 60 mL min⁻¹ durante la prueba. Una vez colocada la cápsula con la muestra y la cápsula de referencia (vacía), ambas se calentaron hasta 300°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min (modo dinámico). Las termogramas obtenidas de las de cada muestra se registraron a una sensibilidad de 5 mV, 0.5 °C y se analizaron con el software Proteus Netzsch - Thermal Analysis (Versión 4.2.1, Netzsch, Alemania). Para hacer los cálculos de entalpía de fusión se utilizó una curva de calibración construida a partir de los siguientes estándares: indio, estaño y bismuto (a 156, 239.1 y 271 °C respectivamente). Adicionalmente, se determinó el número de moles de agua. Se determinará el número de moles de agua por mole de lactosa anhidra (n) con la ecuación 5 (Khankari, Law, & Grant, 1992), donde:

$$n = [\Delta H_{deshidratación} \times m_{lactosa} \times \Delta H_{vw}] - [\Delta H_{deshidratación} \times m_{agua}] \quad (\text{Ec. 5})$$

$\Delta H_{deshidratación}$ = entalpía de deshidratación de α -lactosa

ΔH_{vw} = entalpía de vaporización de agua (2261 J g⁻¹)

$m_{lactosa}$ = masa molecular de la lactosa anhidra (342.3 g mole⁻¹)

m_{agua} = masa molecular del agua (18 g mole⁻¹)

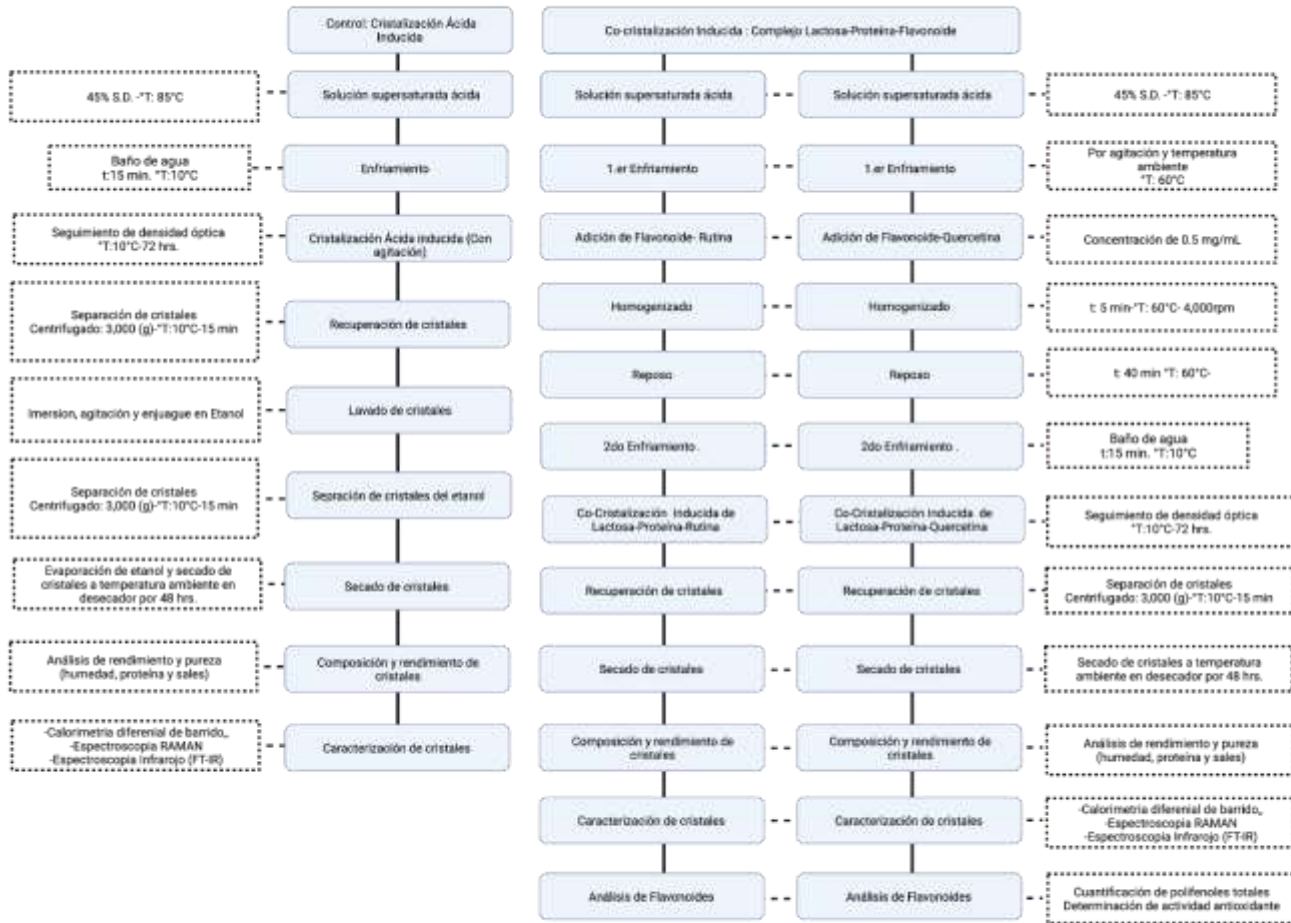
Espectroscopía Raman: se tomó un gramo de muestra de cristales de lactosa y se colocó en una placa ATR del equipo. El láser del espectrómetro Raman se ajustó a una distancia de 5 mm de la muestra. Las condiciones de lectura fueron 240 adquisiciones por cada 0.5 segundos a 785 nm con un barrido de 0 a 500 cm^{-1} . (Enwave Optronics, Inc., ProRaman-L High Performance Raman Spectrometer). La señal de transmitancia que se generó en cada prueba se procesó en el software del equipo y se transfirieron al software ORIGIN (OriginalLab, versión 2019b, Massachushttes, USA) para general los gráficos y limpiar la señal con las muestras patrón (estándares) y la identificación de enlaces presentes en los cristales.

FTIR: se tomó una muestra de 1g de los cristales y se colocó en una placa ajustando la distancia del láser y la muestra a 5 mm sobre la placa del espectrómetro FTIR (Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR Spectrometer, USA). Las condiciones utilizadas para la medición de transmitancia fueron de 40 adquisiciones, con 10 de fondo, con una longitud de onda de 500-4,500 cm^{-1} . Como resultado de la incidencia del infrarrojo sobre la muestra se generó un espectro. Los datos obtenidos fueron graficados en el software ORIGIN 2019b (OriginalLab, Massachushttes, USA); donde se limpiaron las señales para su comparación con estándares de alfa y beta lactosa.

6.2 ETAPA II: Formación de co-cristales de lactosa-flavonoides a partir de lactosuero de queso panela y la adición de quercetina o rutina

6.2.1 Diagrama metodológico

6.2.1.1 Proceso de cristalización y co-cristalización de lactosa-flavonoides a partir de lactosuero de queso panela acidificado y pre-concentrado (ver 6.1.1.1 y 6.1.6.1)



6.2.2 Materiales

- Leche pasteurizada LALA Entera, (Lactosa:4.04 %) Grupo LALA, Comercializadora de Lácteos y Derivados S.A. de C.V.; Gómez Palacio, Durango-México. Con la siguiente composición:

Tabla 2. Composición de la leche entera (LALA) pasteurizada utilizada en este estudio

Componente	Contenido
Lactosa (g 100 mL ⁻¹)	4.04 ± 0.01
Proteína (g 100 mL ⁻¹)	2.84 ± 0.02
Sales (g / 100 mL ⁻¹)	0.75 ± 0.01
Densidad (Kg m ⁻³)	1026.39 ± 0.07
pH	6.59 ± 0.02

- Quimosina (CHY-MAX®) CHR-HANSEN (Horsholm,Denmark))
- Cloruro de Calcio grado alimenticio.
- Ácido cítrico grado alimenticio.
- Sulfato de potasio bibásico marca PQF (REPROQUIFIN). Estado de México, México.
- Estándar de alfa lactosa anhidra (Sigma Aldrich-USA).
- Estándar de beta lactosa (Sigma Aldrich-país-USA).
- Microplacas de plástico fondo plano, estériles (CORNING, USA)
- Matras Erlenmeyer 125 ml (± 5%) PYREX (Made in Germany)
- Alcohol Etílico Etanol, HYCEL México S.A. de C.V. (Jalisco, México)
- Hidrato de Rutina ≥94% (HPLC), powder (Sigma Aldrich-CHINA).
- Quercetina ≥95% (HPLC), solid (Sigma Aldrich-INDIA).
- Solución de Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich-USA).

6.2.3 Equipos

- Descremadora eléctrica ELECREM 1 (Francia, Paris)
- Analizador de ultrasonido M250 Milktech (Miami, USA)
- Potenciómetro HANNA Instruments Woonsocket RI USA (Made in Romania)
- Refractómetro ABBE NAR-T1, ATAGO (Made in Japan)
- Lector de absorbancia para microplacas BioTek instruments® ELx808 (Vermont, USA)
- Baño de agua JULABO GmbH (Seelbach, Germany)
- Parrilla con agitación DLAB MS7-H550-S, (California, USA)
- Centrifuga (Centrifuge 5702R, EPPENDORF (Germany)
- Refrigerador TORREY CV-14 (México)
- Espectrómetro RAMAN 785nm (Enwave Optronics, Inc., ProRaman-L High Performance Raman Spectrometer; California,USA),
- Espectrómetro FTIR (Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR Spectrometer; Massachusetts, USA).
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC 200PC, Netzsch, Alemania)

6.2.4 Diseño de experimentos y análisis estadístico

Se realizó un diseño de un solo factor completamente al azar, siendo el factor experimental (τ_i) el tipo de flavonoide adicionado. En la ecuación 6 se describe el modelo del diseño experimental usado, donde y_{ij} es la variable de respuesta, τ_i es el factor experimental, y e_{ij} es el error experimental.

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Obtenidos los datos, se realizó un análisis de varianza utilizando un nivel de confianza del 0.05 (α). Además, los datos fueron sujetos a análisis de comparación múltiple de medias utilizando el método de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). Los análisis se realizaron en el programa Minitab (Versión minitab 19, Minitab LLC, Pennsylvania, USA). Mientras que los gráficos se editaron en el programa SigmaPlot (Sigma plot Versión 14.5, SYSTAT. California, USA).

6.2.5 Proceso de co-cristalización

La obtención de lactosuero de la fabricación de queso Panela, así como el ajuste de pH y la concentración de lactosuero se realizaron según lo previamente descrito en las secciones 6.1.5 y 6.1.6.1. Posteriormente, el lactosuero ácido concentrado (80-85 °C) en matraces Erlenmeyer de 125 mL, con un volumen de trabajo de 70 mL de lactosuero; se atemperó mediante agitación hasta alcanzar los 60 °C (parrilla DLAB MS7-H550-S, California, USA). Después, se adicionaron 0.5 mg de flavonoide (rutina o quercetina) en polvo por cada mililitro de suero ácido concentrado. Una vez adicionado el flavonoide al lactosuero concentrado, se homogenizó la mezcla utilizando un procesador mecánico a 4000 rpm por 5 min a 60°C (Ultra Turrax, Ika, T18, China). Después del proceso de homogenización, el lactosuero concentrado con flavonoides se mantuvo en reposo por 40 min a 60°C para favorecer la interacción de flavonoides con las proteínas del suero y/o con la lactosa.

Al terminar el tiempo de reposo la mezcla del lactosuero con el flavonoide paso a un enfriamiento rápido en un baño de hielo (7°C) para lograr que la mezcla alcanzará una temperatura de 10-15 ° C en un tiempo de 15 min. Por último, los matraces se colocaron dentro de un refrigerador a 10 ± 2 °C (Torrey CV-14, CDMx, Mex) sobre una placa de agitación magnética ajustada a 120 rpm (DLab MS7-H550-S, CA, USA). Muestras de cada matraz se tomaron a diferentes intervalos de tiempo por un periodo de 72 horas para monitorear el proceso de cristalización. Las mediciones de absorbancia en las soluciones concentradas, el análisis de los datos, y la recuperación de los cristales de lactosa se realizó como se describió previamente para la cristalización espontánea de lactosa (ver 6.1.7)

6.2.6 Seguimiento del proceso de cristalización y caracterización de los cristales.

El seguimiento del proceso de cristalización se realizó midiendo cambios en absorbancia, como se describió en la sección 6.1.7. Posterior al proceso de cristalización, los cristales se caracterizaron en cuanto a su contenido de humedad, cenizas, y proteínas según a lo descrito en la sección 6.1.9.

6.2.7 Cuantificación de polifenoles totales en los cristales de lactosa.

Se disolvió una muestra de co-cristales de lactosa-flavonoides en agua destilada y desionizada. Esta solución se preparó para alcanzar una concentración de 50 mg de co-cristales por mililitro de agua (50,000 ppm). Aparte, en un tubo de dos mililitros se adicionó con 250 μL del reactivo de Folin (0.2 N) y 50 μL de la solución de co-cristales (a 50,000 ppm o diluida según el caso). La mezcla se homogenizó y se puso en reposo en oscuridad por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 μL de una solución de carbonato de sodio (75 g L^{-1}). Una vez homogénea la solución, se tomaron 250 μL y se depositaron en una microplaca de plástico fondo plano (Corning, USA) y se dejó en reposo durante dos horas en oscuridad. Para finalizar, la muestra se colocó en lector de micro placas (Biotek, ELx808, USA) y se leyó a una longitud de onda 750 nm. El contenido de polifenoles totales se calculó a partir de una curva de calibración creada con concentraciones conocidas de ácido gálico (Anexo 2). Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico por mililitro de solución (mg GAL mL^{-1}), o bien por miligramo de co-cristales (mg GAL mg^{-1}) (Alvarado-Díaz et al., 2019).

6.2.8 Actividad antioxidante de los co-cristales

Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron a partir de los co-cristales de lactosa-rutina o de co-cristales de lactosa-quercetina. Para este fin, se tomó una muestra de co-cristales y se preparó una solución madre a una concentración de 50 mg mL⁻¹ (50,000 ppm). Posteriormente, se prepararon diluciones de la solución madre para obtener las siguientes concentraciones de los co-cristales de lactosa-rutina: 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, y 1 mg mL⁻¹. En el caso de los co-cristales de lactosa-quercetina las diluciones fueron: 3.5, 2, 1.5, 0.5, y 0.25 mg mL⁻¹. De cada una de estas diluciones se tomó un mililitro y se depositó en un tubo de vidrio. Posteriormente a cada tubo se le agregó un mililitro de etanol y dos mililitros de una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) 200 µM; para obtener un volumen final de cuatro mililitros en cada tubo. Los tubos se dejaron reposar por una hora en oscuridad. Después, se tomó de cada tubo tres alícuotas de 250 µL y se depositaron en tres pozos de una microplaca de plástico de 96 pozos. El blanco se preparó con agua destilada desionizada, etanol y DPPH. Finalmente, las microplacas se leyeron en un micro lector a 490 nm (Biotek Elx808, USA) (Sánchez-Moreno, Larrauri, Saura-Calixto, & Agriculture, 1998). Adicionalmente, se creó una curva con soluciones de ácido ascórbico a concentraciones de 5,10,15,25 y 50 µM (0.8, 1.7, 2.6, 4.4 y 8.8 µg mL⁻¹) para establecer la capacidad del ácido ascórbico de capturar radicales libres de DPPH. La curva de absorbancia contra concentración de ácido ascórbico se muestra en el Anexo 1 Curvas de calibración.

Esta curva se utilizó para transformar los datos de absorbancia de nuestras soluciones de lactosa-rutina a equivalentes de actividad antioxidante del ácido ascórbico (ACA_{equiv}). De esta forma, el porcentaje de inhibición del radical DPPH en cada dilución de lactosa-rutina se calculó con la siguiente ecuación 6 (M. L. Mendoza-López, C. S. Alvarado-Díaz, S. B. Pérez-Vega, M. Y. Leal-Ramos, & N. Gutiérrez-Méndez, 2018).

$$\%Inhibición = \frac{100(ACA_{blanco} - ACA_{muestra})}{ACA_{blanco}} \quad (Ec.6)$$

La concentración de co-cristales de lactosa-rutina requerida para inhibir en un 50% de la concentración inicial del radical libre DPPH (EC50) se calculó ajustando los datos a una función hiperbólica (single rectangular, two parameters; ecuación 7). Posterior a obtener la ecuación de ajuste, se buscó el valor de x (concentración de co-cristales) que permite obtener un valor de y (% inhibición) = 50.

$$y = \frac{ax}{b+x} \quad (\text{Ec. 7})$$

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Etapa 1: cristalización de lactosa a partir de lactosuero de queso panela bajo condiciones de pH ácido y neutro, así como bajo condiciones de agitación mecánica

7.1.1 Seguimiento de cristalización espontánea e inducida a pH ácido y neutro.

Independientemente del pH, el proceso de cristalización inducida por agitación produjo un mayor incremento de la absorbancia (Max. Δ abs) durante la cristalización de lactosa (Tabla 3, Figura 6). Los procesos de cristalización inducidos por agitación incrementaron en promedio la absorbancia en 2.69 (pH 3.8) y 1.92 (pH 6.9) (Tabla 3). Mientras que los procesos llevados a cabo de manera espontánea tuvieron un menor incremento en la absorbancia, siendo de 1.010174 (pH 3.8) y 0.33030 (pH 6.9) (Tabla 3). El tiempo en que se concluyó la cristalización fue afectada significativamente por ambas, el pH y el tipo de cristalización. Por ejemplo, la cristalización espontánea a pH 6.9 duro 26 horas en terminar. En contraste, la cristalización inducida por agitación con pH 3.8 terminó en tan solo 0.4 horas (Tabla 3, Figura 6). La velocidad de cristalización (k) fue menor (0.19 – 0.47) en la cristalización inducida, en comparación con la k de la cristalización inducida por agitación (9.08 – 22.58). Estos resultados se pueden apreciar en la Tabla 3 y en la Figura 6.

Tabla 3. Parámetros cinéticos del proceso de cristalización espontánea o inducida por agitación a diferentes pHs.

pH	3.8		6.9		Error estándar	
	Tipo de cristalización	Esponánea	Inducida	Esponánea		Inducida
t_0		-1.42 ^C	0.14 ^{B,C}	2.32 ^A	1.39 ^{A,B}	0.52
t_c		3.13 ^B	0.24 ^C	13.03 ^A	1.96 ^{B,C}	0.54
$2t_c$		6.26 ^B	0.49 ^C	26.06 ^A	3.92 ^{B,C}	1.08
Max. Δ abs		1.10 ^C	2.69 ^A	0.33 ^D	1.92 ^B	0.08
k		0.48 ^B	22.58 ^A	0.19 ^B	9.09 ^B	2.94

t_0 = Tiempo de inducción, t_c = Mitad del tiempo de cristalización, $2t_c$ = Tiempo final de cristalización, Max. Δ abs = Valor máximo de diferencia de abs en la cristalización y K = velocidad de cristalización. La diferencia entre las medias que comparten la misma letra no es estadísticamente significativa.

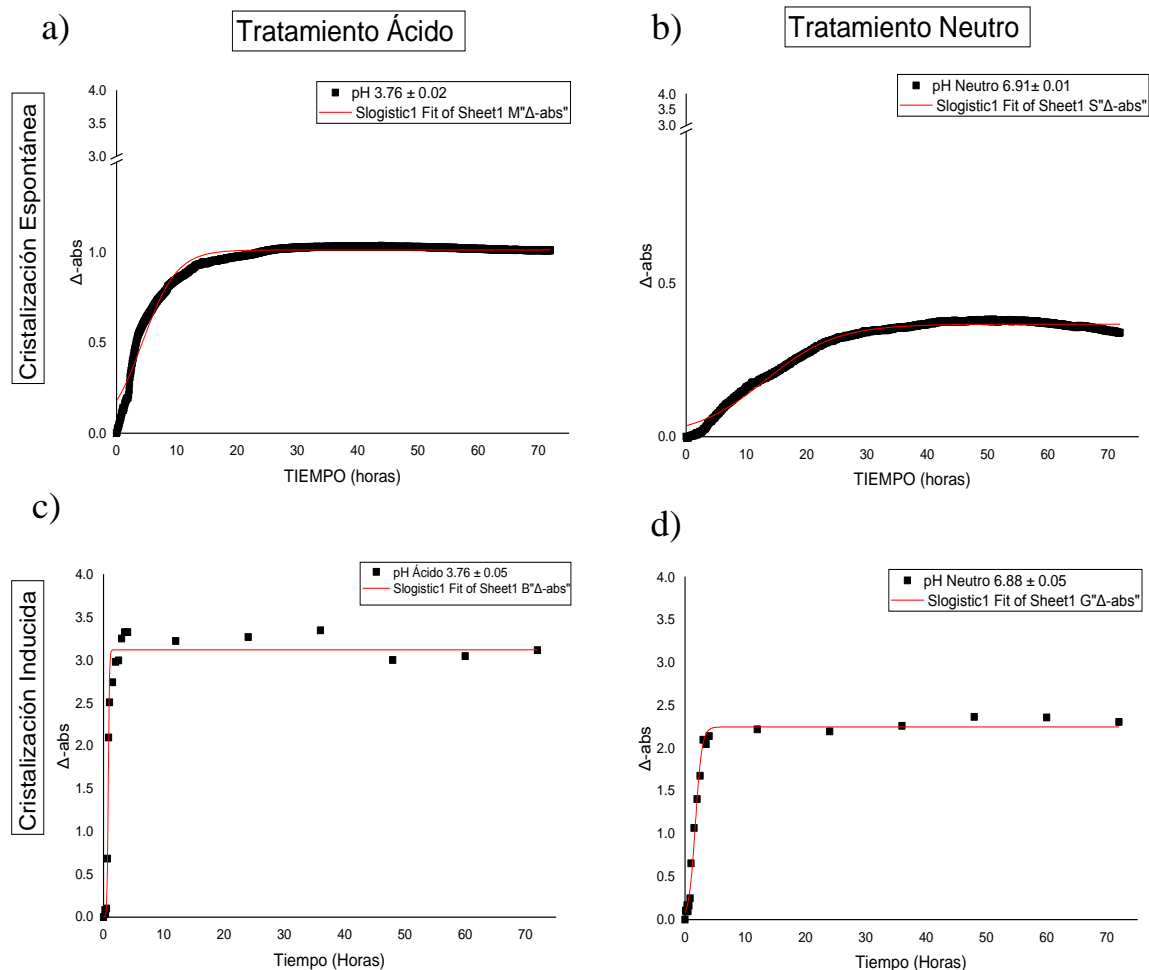


Figura 6. a) Tratamiento ácido cristalización espontánea, b) tratamiento Neutro cristalización espontánea, c) Tratamiento Ácido cristalización, d) Tratamiento Neutro cristalización inducida. Eje y diferencia de absorbancia ($\Delta\text{-abs}$) y eje x tiempo (t) =diferencia de absorbancia

Nickerson y Moore (2004) reportaron que a un pH ácido aumenta la velocidad de cristalización. A diferencia de un pH neutro, un tratamiento ácido aun a niveles extremadamente bajos ($\text{pH} < 1$) acelera la cristalización sin afectar el rendimiento; mientras que un pH alcalino arriba de 10 produce una degradación de la lactosa (Nickerson & Moore, 1974). Esta suposición parece comprobarse debido a que la velocidad de cristalización en los tratamientos ácidos fue mayor a la de los tratamientos neutros, independientemente de la aplicación o no de agitación mecánica.

La aceleración del proceso de cristalización en las soluciones acidificadas es posible que también esté asociada a cambios en la mutarrotación. La cual es la causante del cambio entre los isómeros de α y β lactosa cuando esta se encuentra en una solución; debido a la formación de un grupo hemiacetal que crea un nuevo centro quiral (carbono asimétrico) que puede existir como los dos isómeros (P. Fox, 2009).

Debido a lo anterior autores como Wong y Hartel (2014) han reportado que la velocidad de mutarrotación aumenta a un pH ácido menor a 1 o a pHs alcalinos mayores a 7. El incremento en la velocidad de mutarrotación podría permitir una mayor presencia de α lactosa, misma que facilitaría su proceso de cristalización. Sin embargo, existe información donde se hace mención que la velocidad de mutarrotación es mínima a un pH de 5, y esta va aumentando a medida que el pH aumenta o disminuye su valor hacia los extremos hacia los extremos (Gänzle, Haase, & Jelen, 2008). Datos similares son mencionados referidos en otros estudios, donde nos menciona que la velocidad de mutarrotación es prácticamente constante en un rango de pH de 3 a 6. (Herrington, 1934). Es de mencionarse que en estudios realizados por Nickerson y Twieg en 1968, sobre cinéticas de cristalización de lactosa, hacen mención de que la mutarrotación solo afecta al proceso de cristalización cuando este se lleva a cabo de manera muy rápida y en espacios grandes.

Por el momento y debido a la manera en la que se llevó a cabo este estudio y sus limitantes; no se puede negar o afirmar, si es que la velocidad de mutarrotación afecta directamente la velocidad de cristalización; o en que valores específicos de pH pudiera estarse llevando a cabo cambios (rápidos o lentos) en la mutarrotación que afecten la cristalización. Ya que la velocidad de mutarrotación también puede verse afectada no solo por el pH, si no por la temperatura y solubilidad, por mencionar algunos factores.

Lo que si podemos observar es que aun pH ácido la velocidad de cristalización será mayor que a un pH neutro, lo cual concuerda con lo reportado por Twieg y Nickerson (1968). Un factor importante que considerar al momento de llevar a cabo una cristalización de lactosa a un pH ácido, es el tipo de ácido a utilizar para llegar a

los niveles requeridos. Ya que el lactosuero no cuenta con ácidos fuertes. Aun y cuando el ácido acético y ácido láctico tienden a concentrarse en procesos de reducción o evaporación del suero. No podrán alcanzar una disminución relevante del pH (6.6) del lactosuero “dulce”. Al mismo tiempo, la adición o aumento de ácido acético y láctico tiene un efecto contraproducente al momento de la cristalización, debido a que tienden a inhibir la cristalización y formar lactosa amorfa (Wong & Hartel, 2014). Además, se ha reportado que el uso de ácido sulfhídrico y ácido clorhídrico han sido utilizados en proceso de cristalización obteniendo soluciones con rangos de pH de 1 a 4 (Nickerson & Moore, 1974). Finalmente, en el presente estudio la acidificación del lactosuero se realizó con ácido cítrico grado alimenticio, del cual no se cuenta con información en estudios anteriores sobre algún tipo de efecto adverso sobre la cristalización de la lactosa.

7.1.2 Distribución de tamaños de los cristales de lactosa

Los cristales derivados del proceso de cristalización espontánea a pH ácido tuvieron un tamaño promedio mayor al observado a un pH neutro (Figura 7). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. La distribución de tamaños tampoco difirió de manera importante entre ambos pHs. No obstante, se observó que a pH ácido había una mayor frecuencia de cristales grandes (~80 μm) que a pH neutro. También es importante mencionar que a pH neutro se lograron observar unos cuantos cristales de tamaño exorbitante (~480 μm).

En los cristales obtenidos por cristalización inducida por agitación mecánica también se observó que a pH ácido el tamaño promedio era ligeramente mayor que a pH neutro (Figura 8). Incluso podemos observar que en el proceso ácido existe una menor variabilidad que en el proceso neutro, dando una cierta homogeneidad en el tamaño de cristales. Es de mencionarse que en este proceso los cristales que alcanzaron un mayor tamaño fueron los de proceso neutro; más, sin embargo, la frecuencia de estos resultó ser bastante baja.

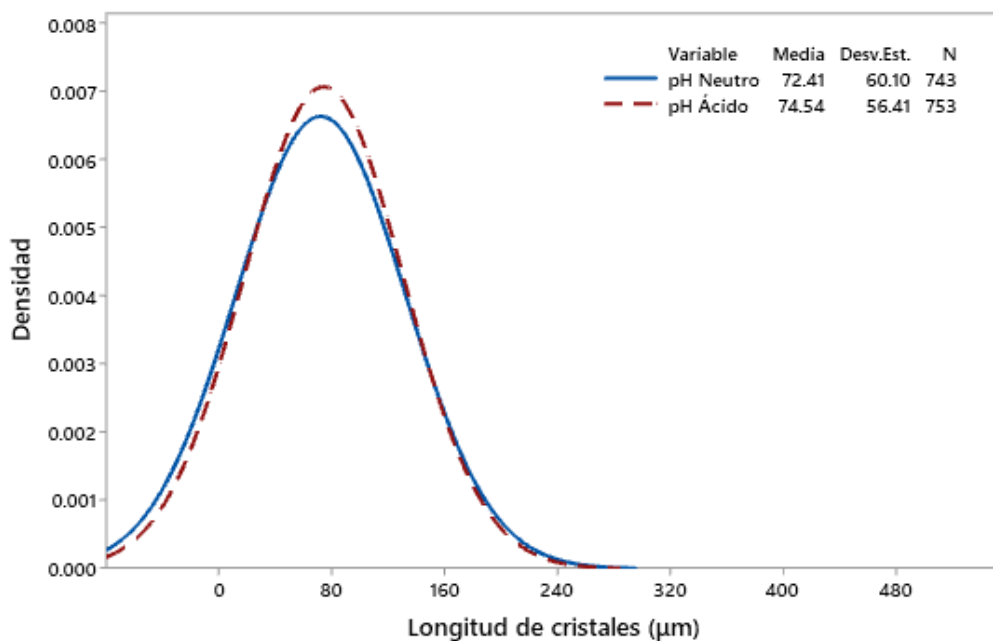


Figura 7. Distribución de los tamaños de cristales de lactosa cristalizados de forma espontánea a pH ácido (línea roja discontinua) y pH neutro (línea azul).

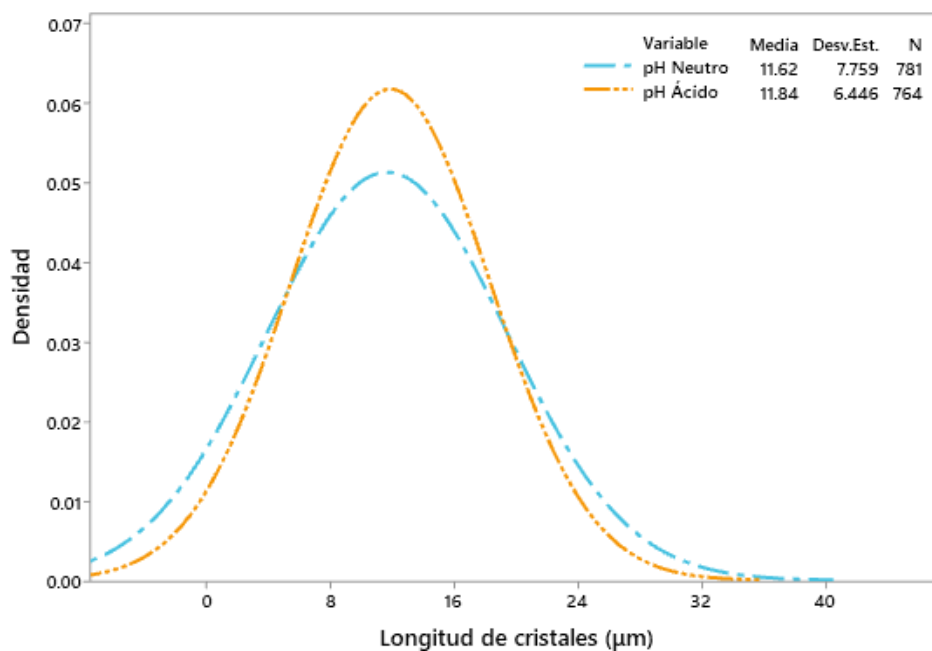


Figura 8. Distribución de los tamaños de cristales de lactosa inducidos mediante agitación mecánica a pH ácido (línea naranja discontinua) y pH neutro (línea azul).

El tamaño promedio de los cristales de lactosa fue más pequeño en los procesos de cristalización inducida por agitación que en las cristalizaciones espontáneas, independientemente del pH (Figura 9). De forma similar, la dispersión de los tamaños de los cristales fue evidentemente mucho menor en los procesos de cristalización inducidos por agitación. Estos resultados podrían atribuirse parcialmente al esfuerzo de corte proporcionado al estarse llevando a cabo la cristalización a agitación constante; lo que a su vez puede explicar por qué en el proceso inducido no se alcanzaron tamaños de cristales con longitudes tan grandes como en el proceso espontáneo. Es posible que la falta de agitación permitió que en el proceso espontáneo los cristales fueran aumentando su tamaño. También cabe la posibilidad de que, al llevarse la cristalización de manera espontánea, no se permitió que se generaran tantos núcleos. Por lo que en estas cristalizaciones probablemente predominó la nucleación primaria.

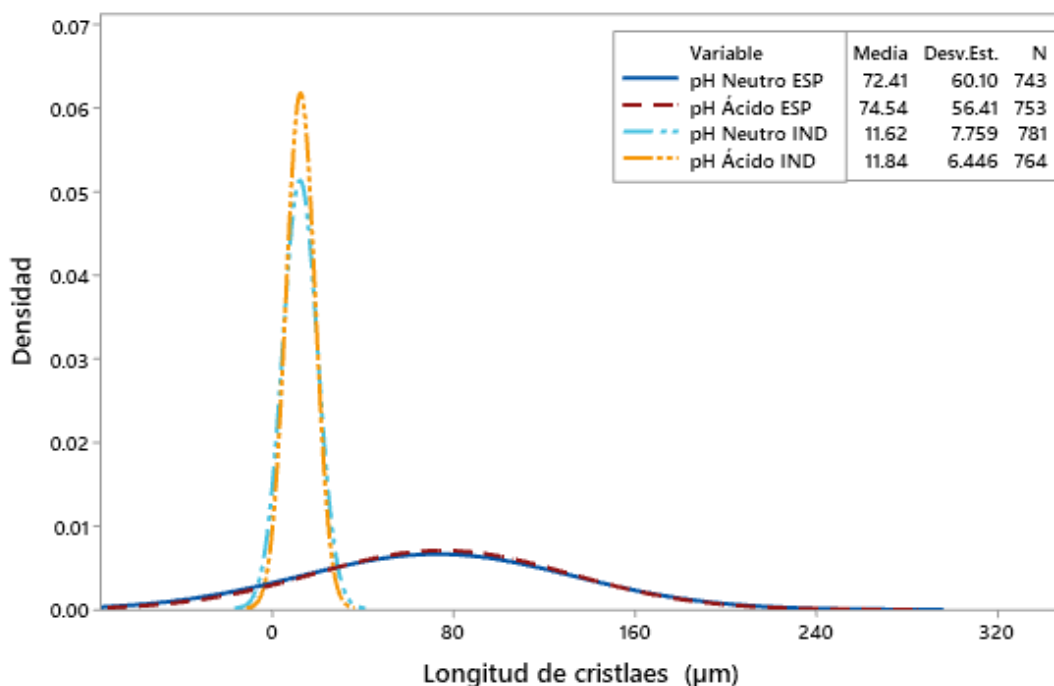
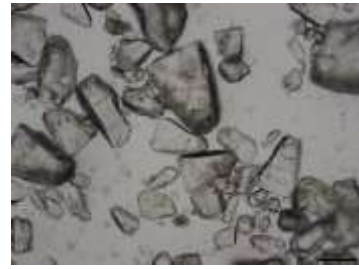


Figura 9. Comparación en la distribución de los tamaños de cristales de lactosa producidos por un proceso espontáneo (líneas azul y morada) o un proceso inducido mediante agitación mecánica (líneas naranjas y azul claro).

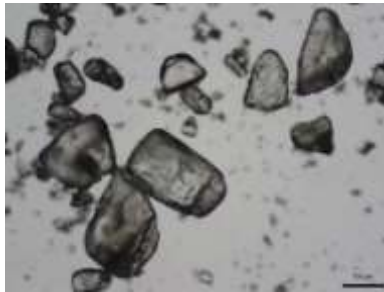
Trabajos previos han estudiado el efecto del pH sobre la cristalización de la lactosa. Dichos estudios han mencionado que el pH óptimo para la cristalización de la lactosa es de un pH de 4 (Anna Pisponen et al., 2013). Según estos autores, al alejarse del pH de 4 se podría acelerar la cristalización y afectar el crecimiento de los cristales. También se hace hincapié que al pH de cuatro es donde se encontraron las mayores dimensiones promedio de cristales (274.0 μm) y con un rango de 129-379 μm . Además, se menciona que al disminuir el pH en rangos de 2-3, el tamaño de los cristales se ve reducido y pareciera ser más homogéneo. En contraste, al trabajar a pH de 6-8, encuentran que la distribución de tamaño de los cristales es más heterogénea (Anna Pisponen et al., 2013). Cabe resaltar que, en el estudio mencionado la cristalización se realizó de manera estática. De acuerdo a nuestros resultados, y a lo descrito por Modler y Lefkovitch (1986), el pH tiene un escaso efecto sobre el tamaño de cristal. Debido a que, no se apreció una diferencia estadística por efecto del pH.

Por otro lado, se ha reportado que a pHs ácidos (p.e., 3.47) predomina el isómero alfa sobre el isómero beta debido a cambios en la mutarrotación (Raghavan, Ristic, Sheen, & Sherwood, 2001). Los cambios en la mutarrotación, así como la aceleración de la cristalización por acidificación (descrita previamente) favoreció la formación de cristales piramidales (Figura 10). Este tipo de cristales son típicos en cristales de alfa-lactosa monohidratada y reciben el nombre de cristales tipo Tomahawk. Según nuestros resultados, en la cristalización espontánea a pH 3.8 se apreció la formación de cristales Tomahawk. Los cristales inducidos por agitación y a pH 3.8 fueron muy pequeños y no se pudo apreciar si también tuvieron una forma tipo Tomahawk.

Cristalización espontánea
a pH ácido



Cristalización espontánea
a pH neutro.



Cristalización inducida por
agitación a pH ácido



Cristalización inducida por
agitación a pH neutro.



Figura 10. Microscopías de los cristales de lactosa (1 g disuelto en 2 mL de etanol) obtenidos por cristalización espontánea o cristalización inducida por agitación en pH neutro o ácido.

En trabajos anteriores por otros autores se menciona que la cristalización espontánea genera una distribución de cristales bastante amplia (Morales et al., 2018); ya que, al darse en la conocida zona lábil, sin ninguna influencia externa más que la generación de una nucleación primaria principalmente, el cómo se formen los cristales dependerá más de la presencia o no de impurezas en la solución sobre saturada, ya que estas pueden evitar el crecimiento de los cristales al adherirse a las paredes de estos, evitando su crecimiento.

A diferencia de la cristalización inducida por agitación, la cual tiene a tener un mayor efecto sobre el tamaño de cristal, como se puede ver en el experimento obteniendo valores con media de tamaño de cristales de 11.62 y 11.84 micrómetros para los tratamientos neutro y ácido respectivamente. Este fenómeno puede ser explicado ya que al llevarse a cabo una cristalización inducida y más en específico por agitación, el choque molecular generado en la solución super saturada (lactosuero) aumentará la nucleación primaria y una nucleación secundaria será inducida de mejor manera. Este efecto ha sido explorado de diferentes maneras, donde se han reportado velocidades de agitación para la cristalización que van de los 200-2500 rpm, las cuales han sido combinadas con diferentes técnicas como lo es de pulsaciones de ultrasonido, sembrado de cristales y adición de anti solventes, con el fin de optimizar la nucleación primaria y secundaria en la cristalización (Dhumal, Biradar, Paradkar, & York, 2008; Halfwerk, Yntema, Van Spronsen, & Van der Padt, 2021; Mimouni, Schuck, & Bouhallab, 2005; S. R. Patel, Z. J. D. s. Murthy, & technology, 2011; Wong & Hartel, 2014). Como bien sea ha reportado con anterioridad la nucleación secundaria puede provenir tanto del choque, o contacto de un agente externo en la solución o incluso del rompimiento de un cristal, esto llevaría a una mayor generación de núcleos y una reducción de tamaño en los cristales (Myerson, 2002).

Como se describió anteriormente, cuando la cristalización se lleva de manera espontánea, la distribución de tamaños de cristales fue muy amplia (Figura 8). Este efecto puede deberse a que los experimentos se llevaron a cabo dentro de la zona lábil a condiciones de 45% de sólidos disueltos a 10 °C. El trabajar en la zona lábil

conduce a este tipo de comportamiento. Es por esto, que en industrias azucareras o donde se llevó a cabo la cristalización sea común que prefieran llevar las soluciones a una zona metaestable y utilizar técnicas de inducción de cristalización. Por ejemplo, el sembrado de cristales, en el cual los cristales no se generarán de manera espontánea pero sí podrán crecer una vez formado o agregado el núcleo (Morales et al., 2018).

7.1.3 Rendimiento y composición de cristales

En una primera instancia se observó que las cristalizaciones conducidas a pH ácido generaron cristales de lactosa de mayor pureza que las cristalizaciones a pH neutro. Esto se vio reflejado en la cantidad de sales y proteína presente en los cristales de lactosa (Tabla 4). La baja cantidad de sales y proteína en los tratamientos ácidos con respecto a los neutros (Tabla 4), se considera como el resultado del efecto de combinado del pH ácido y de la temperatura. Bajo condiciones ácidas y de calentamiento se fomenta la precipitación de las proteínas del suero. La precipitación de estas proteínas arrastra consigo una cantidad importante de sales, e inclusive de una proporción de lactosa (Tabla 4). Este efecto fue muy evidente al estar concentrando el lactosuero ácido, el cual después de precipitar una gran parte de las proteínas del suero quedó cristalino (Figura 11). En contraste, en el lactosuero de pH neutro permaneció turbio (lechoso) lo que indica que en este suero permaneció una cantidad considerable de proteínas disueltas (Figura 11). Consecuentemente, los cristales obtenidos del suero acidificado tuvieron una alta pureza (96-97%), mientras que los cristales de suero neutro presentaron una cantidad significativamente mayor de proteínas (Tabla 4). A este respecto es importante aclarar que los sueros con pH neutro tuvieron una pureza también alta (93%), aunque ligeramente menor que los ácidos (Tabla 4).



Figura 11. Precipitación de proteínas durante su concentración. A la izquierda se muestra el lactosuero de queso Panela pH ~4, mientras que a la derecha se muestra el lactosuero de queso Panela pH ~7.

Tabla 4. Composición y rendimiento de los cristales de lactosa obtenidos bajo procesos de cristalización espontánea o inducida por agitación, a pH neutro o ácido.

Tipo de cristalización	pH del lactosuero			
	3.8		6.9	
	Espontanea	Inducida por agitación	Espontanea	Inducida por agitación
Lactosa (g 100g ⁻¹ cristales)	96.86 ± 1.10 ^A	97.86 ± 0.71 ^A	93.61 ± 0.91 ^B	93.53 ± 1.44 ^B
Proteína (g 100g ⁻¹ cristales)	0.17 ± 0.07 ^B	0.5 ± 0.41 ^B	1.22 ± 0.32 ^B	2.6 ± 0.86 ^A
Cenizas (g 100g ⁻¹ cristales)	2.84 ± 1.00 ^A	1.19 ± 0.69 ^B	4.73 ± 1.22 ^A	3.11 ± 0.97 ^A
Agua (g 100g ⁻¹ cristales)	0.13 ± 0.06 ^B	0.45 ± 0.23 ^B	0.44 ± 0.14 ^{A, B}	0.76 ± 0.15 ^A
Rendimiento cristalización (%)	28.5 ± 0.74 ^B	28.42 ± 1.63 ^B	23.05 ± 0.88 ^C	36.38 ± 2.92 ^A
Cristalización de lactosa (%)	51.82 ± 1.92 ^B	52.13 ± 2.71 ^B	40.41 ± 1.76 ^C	63.83 ± 5.37 ^A

Se muestran promedios y desviación estándar de cada medición; n= 6 para rutas inducidas y n=3 para rutas espontaneas. La diferencia entre las medias que comparten la misma letra no es estadísticamente significativa.

La precipitación de proteínas en los lactosueros acidificados también provocó que al alcanzar el 45 % de sólidos disueltos el volumen final fuera menor (70 mL de un litro de lactosuero) al obtenido en el lactosuero de pH neutro (90 mL de un litro de lactosuero). Esto permitió que los tratamientos neutros comenzaran con un mayor volumen. Además, los lactosueros neutros fueron más estables durante el proceso de evaporación (escasa precipitación de proteína), evitando así la pérdida de lactosa. Esto se vio reflejado en los valores de rendimiento de cristalización y recuperación de lactosa, siendo la cristalización inducida por agitación a pH neutro el proceso con los valores más altos en rendimiento de cristalización y porcentaje de lactosa cristalizada. Es importante resaltar que, a pH ácido, no existió diferencia en el rendimiento de cristalización y de recuperación de lactosa entre la cristalización espontánea o inducida por agitación. Sin embargo, a pH neutro sí existió una diferencia significativa en los rendimientos entre la cristalización espontánea y la inducida por agitación (Tabla 4).

Diferentes factores pueden afectar el rendimiento de cristalización, como lo la ineficiencia de los procesos de lavado y recuperación de cristales. A este respecto, la industria dedicada al refinamiento de lactosa ha reportado rendimientos de 65%, partiendo comúnmente de una concentración de 65-70% de sólidos disueltos (Wong & Hartel, 2014). Otros trabajos realizados mediante soluciones modelo de lactosa - agua, utilizando acetona e induciendo la cristalización de la lactosa por ultrasonido, reportan hasta un 89% (p/p) de recuperación de lactosa. Sin embargo, la utilización de acetona u otros co-solventes no son viables a gran escala debido a se necesitan concentraciones de 85% o más para disminuir lo suficiente la solubilidad de la lactosa (S. R. Patel, Murthy, Experimental, & Crystallography, 2009). Además, la cantidad de acetona u otro co-solvente a utilizar sería muy grande lo cual aumentaría el costo de cristalización y tendría un gran impacto ecológico.

El sembrado de lactosa también ha sido estudiado por otros autores. Por ejemplo, utilizando esta metodología y partiendo de soluciones modelo con una concentración de sólidos disueltos de 79-82%, y utilizando agitación orbital, reportaron rendimientos de recuperación de lactosa entre 17.85-90.30% (Guu & Zall, 1991). Incluso, estudios

donde se ha llevado a cabo la cristalización de alfa lactosa monohidratada inducida por agitación con una súper saturación de 130%; han alcanzado rendimientos del 25-55%. En éste mismo estudio se reportaron rendimientos de 35% a pH de 3.45, y de 40% a pH de 8.18. Dichos resultados se obtuvieron utilizando una super saturación de 107% (Raghavan et al., 2001). Otro estudio reporta rendimientos del 58% a pH 6.2 y sembrando lactosa. Mientras que al acidificar a pH 1.7 con ácido láctico y también con sembrado reportaron rendimientos del 55.9%. Estos resultados los obtuvieron utilizando α -lactosa mono hidratada a un 40% de concentración (Smart & Smith, 1992).

En estudios previos se reportan rendimientos entre el 50-60%, a partir la recristalización de lactosa con 40-60% de solidos disueltos (S. R. Patel et al., 2012). Por otra parte, se han reportado rendimientos del 74% en estudios donde se utilizaron varias etapas de microfiltración, ultrafiltración, intercambio iónico y osmosis inversa. En éste mismo estudio se reporta una pureza de lactosa en los cristales del 99.8% (de Souza, Bergamasco, da Costa, Feng, Faria, Gimenes, et al., 2010). Al mismo tiempo, se han reportado rendimientos de recuperación entre 84-92% mediante el uso de anti solventes como el etanol a concentraciones entre el 65 y 85% (R. Bund & A. J. J. o. F. E. Pandit, 2007).

A diferencia de los estudios mencionados, en este trabajo se presenta una opción de recuperación de lactosa a partir del lactosuero (subproducto) por medio de cristalización. En la cual, se abordan factores que afectan el rendimiento y la pureza de la lactosa como los son el pretratamientos de suero y su nivel de super saturación previo a la cristalización. Es importante resaltar que en este estudio se trabajó también en reducir las operaciones unitarias al mínimo y en lograr la cristalización de lactosa con un bajo nivel de saturación (45%). Siendo este nivel de saturación el mínimo considerado a nivel industrial para lograr la cristalización de la lactosa. Esto es de gran relevancia ya que la mayoría del gasto o inversión en los procesos de cristalización de lactosa vienen del tratamiento y concentración del lactosuero para alcanzar las condiciones óptimas de cristalización (R. Bund & A. J. J. o. F. E. Pandit, 2007; Wong & Hartel, 2014). Además de obtener una alta pureza de lactosa en todos los tratamientos que va del 93.53-96.86%, siendo los lactosueros acidificados aquellos

que obtuvieron la mayor pureza. Aunque cabe aclarar que la pureza depende del pretratamiento que se le dé al lactosuero previo a la cristalización; aspecto que va ligado directamente al efecto del ajuste de pH del suero previo a la concentración de este. En cuanto al rendimiento de cristalización, se lograron rendimientos que iban desde 40 hasta 60%, lo cual se encuentra dentro del promedio de procesos industrializados.

7.1.4 Pureza de cristales y tipo de lactosa cristalizada

7.1.4.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

A partir del estudio de la calorimetría diferencial de barrido se encontraron los siguientes resultados. En la figura 12 se muestran las comparaciones de los cristales de lactosa obtenidos de lactosuero ácido tanto por cristalización espontánea, como inducida por agitación. En la figura 12 también se incluyeron los estándares de α -lactosa monohidratada (Sigma Aldrich, USA) y β -lactosa (Sigma Aldrich, USA). Para los estándares de α - y β -lactosa, los picos endotérmicos se encontraron a 232.82 y 252.86°C respectivamente. Mientras que los cristales que resultaron de la una cristalización espontánea (lactosuero ácido) presentaron cuatro picos a las siguientes temperaturas: 146.88, 171.88, 211.88 y 218.88 °C. En contraparte, los cristales obtenidos de una cristalización inducida por agitación (lactosuero ácido) presentaron dos picos mayores a temperaturas de 148.75 y 199.75 °C, así como cuatro picos endotérmicos secundarios a 191.75, 213.75, 217.88 y 226.75 °C.

En lo que respecta a los cristales de lactosa obtenidos de lactosuero a pH neutro (Figura 13), se encontró que aquellos cristalizados por agitación presentaban tres picos endotérmicos a 146.31, 178.31 y 197.37 °C. En contraste, los cristales obtenidos de cristalizaciones espontaneas (con lactosuero pH neutro) presentaron solo dos picos a 148.62 y 190.462 °C.

Los picos endotérmicos en un rango de 140- 150 °C representa la deshidratación del agua de cristalización (Kaialy et al., 2011; S. Patel, Murthy, & Technology, 2011) . Este pico se observó principalmente en los cristales obtenidos a partir de lactosuero

acidificado (Figura 12). Es de mencionarse que tal pico no se observó en ninguno de los estándares de lactosa. Por otra parte, la zona entre los 160-205 °C es considerada como la zona de temperatura de re cristalización o de lactosa amorfa de recristalización (Kaialy et al., 2011). La presencia de lactosa en amorfa se observó en los cristales de lactosuero acidificado (Figura 12) ya sea cristalizados espontáneamente (pico a 171.88 °C) o en la cristalización inducida por agitación (picos a 199.753 y 191.753 °C). Por el contrario, en los cristales de lactosuero con pH neutro la presencia de lactosa amorfa pareciera predominar (Figura 13). En lo que respecta a la α -lactosa monohidratada, una de las formas más estables de este carbohidrato, se han reportado puntos de fusión los cuales van de los 205 a los 220 °C (Figura, Epple, & Calorimetry, 1995; Gombas et al., 2002; Y. Listiohadi, Hourigan, Sleigh, Steele, & Technology, 2009; S. Patel et al., 2011). Dichos picos endotérmicos solo se presentaron en los cristales provenientes de lactosuero acidificado (Figura 12 y 13). Finalmente, respecto a la β -lactosa, la temperatura de fusión que se reporta va de 222 a 240 °C (Kaialy et al., 2011; S. Patel et al., 2011). De acuerdo a nuestros resultados, solo se encontró evidencia de β -lactosa en los cristales provenientes de lactosuero acidificado, particularmente aquellos de cristalización inducida por agitación (pico endotérmico a 226.753 °C). (Gombas et al., 2002; Kaialy et al., 2011; S. Patel et al., 2011).

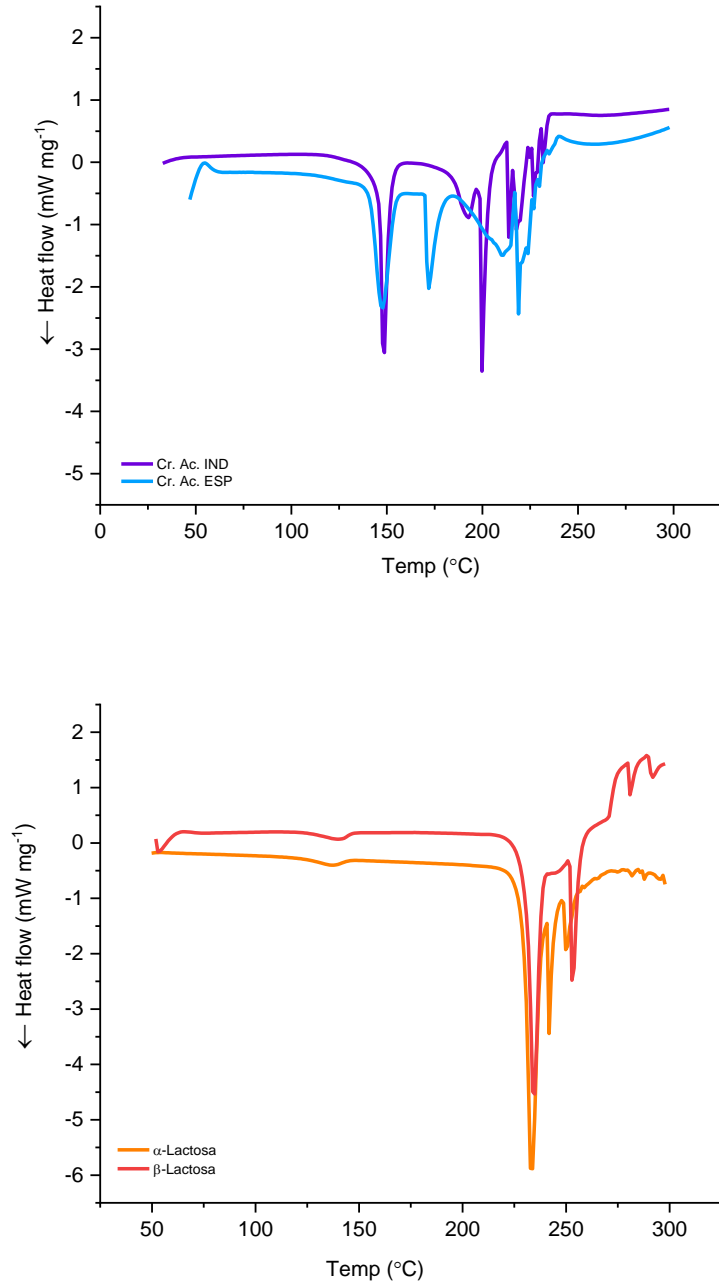


Figura 12. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de cristales de lactosa obtenidos de suero acidificado bajo un proceso de cristalización espontánea (Cr. Ac. ESP) o un proceso de cristalización inducido por agitación (Cr. Ac IND). Así como los termogramas de estándares de cristales de α -lactosa y β -lactosa.

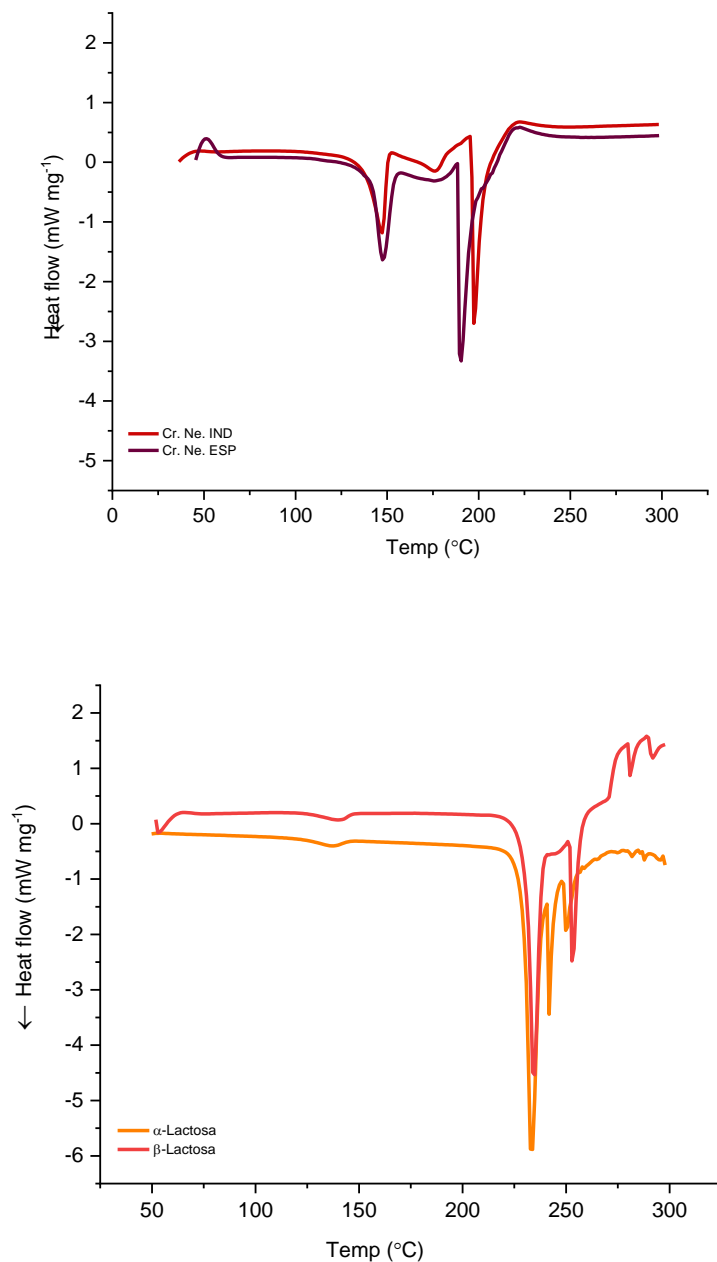


Figura 13. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de cristales de lactosa obtenidos de suero pH neutro bajo un proceso de cristalización espontánea (Cr. Ne. ESP) o un proceso de cristalización inducido por agitación (Cr. Ne IND). Así como los termogramas de estándares de cristales de α -lactosa y β -lactosa.

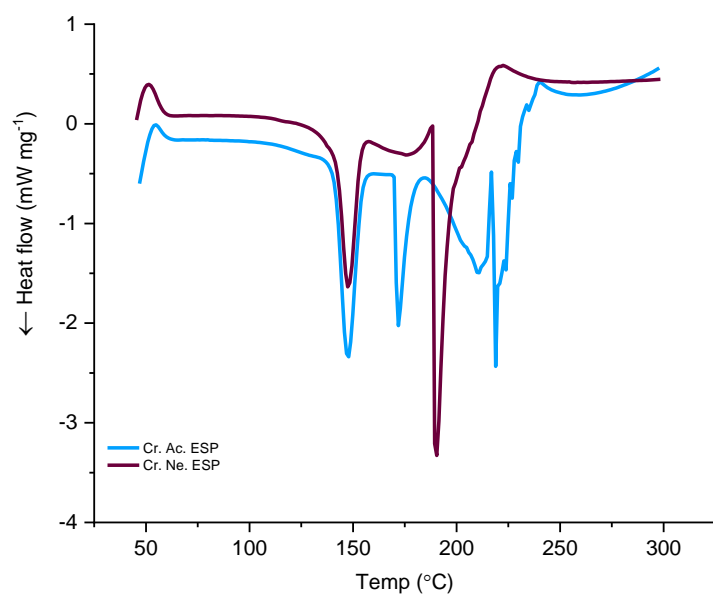
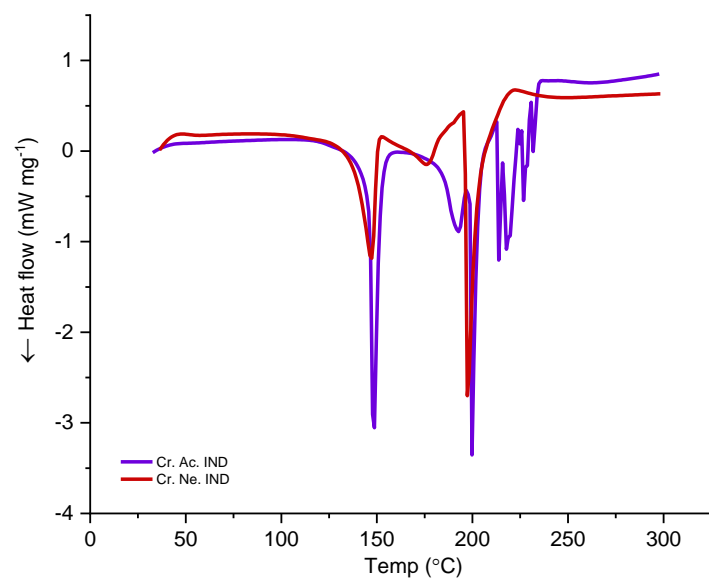


Figura 14. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de cristales de lactosa obtenidos de suero pH ácido (Cr. Ac.) o de lactosuero pH neutro (Cr. Ne.) bajo un proceso de cristalización espontánea (ESP) o un proceso de cristalización inducido por agitación (IND).

7.2 Conclusiones de la etapa 1

Los tratamientos de cristalización llevados a cabo en un pH 3.8 superaron a los tratamientos 6.9 con un pH neutro en cuanto a velocidad de cristalización (k), tiempo de cristalización ($2t_c$) y tiempo de nucleación (t_0). Debido a que un lactosuero ácido permite la separación de proteínas y sales contenidos en el suero. La presencia de impurezas en el lactosuero no permite la rápida nucleación y cristalización de la lactosa. Esto quiere decir que a mayor pureza de compuesto (lactosa) a cristalizar, mayor será su velocidad de cristalización. Aun y cuando en ambos tratamientos precipitan componentes del lactosuero independientemente del pH, siendo superior la precipitación en los tratamientos ácidos.

Además, se confirma como la cristalización inducida promueve una rápida cristalización independientemente del pH. El efecto combinado de cristalización de lactosa inducida por agitación en combinación con un pH ácido (3.8) en el lactosuero, disminuye el tiempo de cristalización (t_c), el tiempo de nucleación (t_0) y la velocidad de cristalización (k). Por lo que se reduce el tiempo de proceso y aumentando la pureza de la lactosa.

El efecto combinado de pH neutro (6.9) y agitación en el proceso de recuperación de lactosa por cristalización permite obtener un mayor volumen de lactosuero concentrado. Esto impacta directamente al rendimiento de cristalización y recuperación de lactosa. Haciendo a este tratamiento el más viable respecto a la cantidad en peso de cristales o lactosa a recuperar; debido a la pérdida o merma relacionada a la separación de componentes en el tratamiento ácido.

El tamaño de cristales fue ligeramente mayor y más homogéneo que en los procesos neutros. Esto se atribuye al contenido de sales y proteína previo a la cristalización, así como a la velocidad de cristalización (k) y el tiempo de nucleación (t_0).

Finalmente, es la α -lactosa monohidratada es aquella con mayor presencia en los tratamientos ácidos según lo encontrado en los estudios de calorimetría (DSC). Mientras que los tratamientos neutros inducen la formación de lactosa amorfa.

7.3 ETAPA 2: Formación de co-cristales Lactosa-Proteína- Flavonoide, a partir de suero acidificado de producción de queso panela.

7.3.1 Seguimiento del proceso de co-cristalización

Se llevaron los experimentos de co-cristalización inducida por agitación a partir de lactosuero concentrado (45% sólidos) de queso Panela con pH 3.8 y la adición de quercetina o rutina. Según nuestros resultados, no se observó un cambio significativo en la mayoría de los parámetros cinéticos de cristalización (Tabla 5, Figura 15). Sin embargo, el tiempo de inducción (t_0) el tratamiento control (sin flavonoides) fue ligeramente menor. Esto llama la atención ya que, aun a bajas concentración la adición de flavonoides tiene un efecto facilitando la generación de núcleos por la interacción del flavonoide con la lactosa y los remanentes de proteína. Este efecto también podría deberse a que los flavonoides que no se hayan solubilizado del todo al momento de su adición (p.e., la quercetina tiene muy baja solubilidad) inducen una nucleación secundaria. La adición de quercetina disminuyo significativamente los niveles de absorbancia al final de la cristalización ($Max\Delta abs$). Este efecto se puede interpretar de forma indirecta con el crecimiento de los cristales y con la cantidad de cristales formados. Debido a que al ser menor la $Max\Delta abs$, se entiende que el tamaño de los cristales de quercetina es más pequeño que los del control o que los cristales de lactosa-rutina.

Tabla 5. Parámetros cinéticos del proceso de cristalización de lactosa a partir de suero de queso Panela sin flavonoides y adicionado con flavonoides (0.5 mg mL^{-1})

Tratamiento	Lactosuero de queso Panela (control)	Lactosuero de queso Panela + quercetina	Lactosuero de queso Panela + rutina	Error estándar
t_0	0.14 ^A	0.087 ^A	0.09 ^A	0.11
t_c	0.24 ^A	0.26 ^A	0.26 ^A	0.13
$2t_c$	0.49 ^A	0.52 ^A	0.52 ^A	0.25
Max. Δabs	2.69 ^A	1.68 ^B	2.60 ^A	0.15
k	22.58 ^A	11.95 ^A	12.86 ^A	4.94

t_0 = Tiempo de inducción, t_c = Mitad del tiempo de cristalización, $2t_c$ = Tiempo final de cristalización, **Max. Δabs** = Valor máximo de diferencia de abs en la cristalización y **K** = velocidad de cristalización. La diferencia entre las medias que comparten la misma letra no es estadísticamente significativa.

La técnica de co-cristalización para la encapsulación de flavonoides se ha estudiado por diversos autores previamente. Dichos estudios han sido dirigidos a la formación de cristales con propiedades antioxidantes, aunque utilizan como carbohidratos a la sacarosa. Por ejemplo, la cristalización con este azúcar se hace a partir de concentrar un jarabe a 70-95 ° Brix a 120-139 °C. La concentración continua hasta alcanzar una turbidez, la cual es indicativo del inicio de nucleación. En este momento, se agregan los flavonoides y se enfría la mezcla para inducir la co-cristalización. Posteriormente, en este tipo de procesos, los cristales que se formaron son triturados hasta el tamaño de partícula requerido. Por lo que este tipo de estudios no se considera aspectos como la velocidad de cristalización al momento de la formación de los cristales. Debido a que a partir de concentraciones tan altas las cristalizaciones puede darse en tiempos relativamente cortos. Sin embargo, se ha reportado que pueden pasar hasta 24 horas o más para poder recuperar los cristales; debido al tiempo de formación de los cristales y de secado (Sarabandi, Mahoonak, & Akbari, 2019). (Fang, Bhandari, & Technology, 2010) (Deladino, Anbinder, Navarro, & Martino, 2007; Khawas, Deka, & Preservation, 2017)

Una gran diferencia respecto a la formación de co-cristales de sacarosa-flavonoides y a nuestro estudio es la forma y cantidad de concentración de sólidos empleados. En nuestro trabajo de co-cristalización de lactosa flavonoides se utilizó una concentración de 45° Brix y una temperatura de 60 °C al momento que se hace la adición del flavonoide. Además, la cristalización se induce por agitación mecánica a una temperatura de 10 °C. Lo cual puede considerarse una ventaja, ya que al reducir la concentración para poder llevar a cabo la co cristalización se reduce el tiempo de proceso y energía. Resultando lo anterior en un factor de gran importancia si se trabaja con un sub producto como lo es el lactosuero.

Aun así, y de acuerdo a nuestros resultados, no existe evidencia de que la adición de polifenoles haya tenido un sobre la velocidad o tiempos de cristalización (Tabla 5, Figura 15). Aun cuando en investigaciones se ha hablado el cómo es que la quercetina y rutina debido a sus grupos hidroxilo en diferentes posiciones, los cuales sirven como donadores y receptores de hidrogeno; lo que permite la formación y puentes de

hidrogeno e interacciones hidrofóbicas para su interacción con los carbohidratos (monos carados, disacáridos y piscardos).(Fang et al., 2010; C Le Bourvellec et al., 2012).

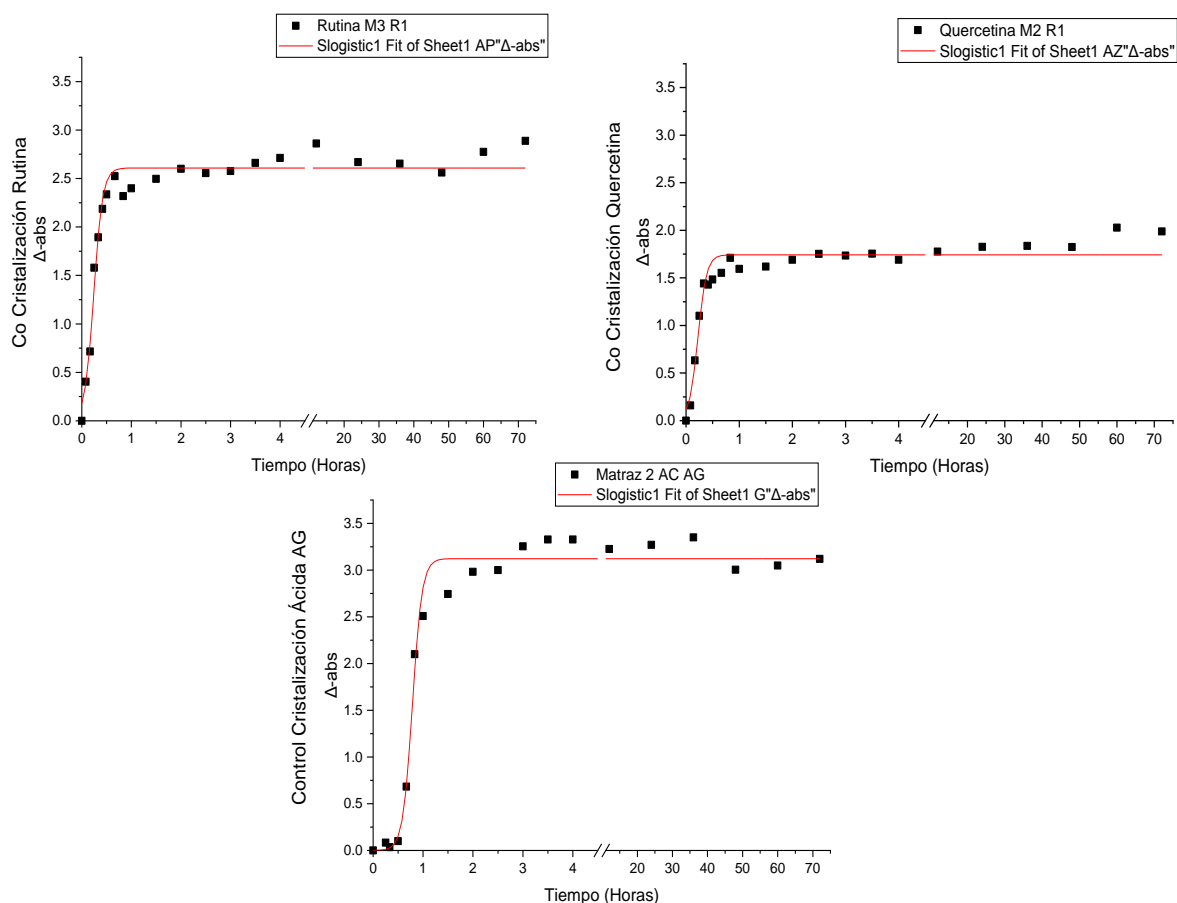


Figura 15. Seguimiento del proceso de co-cristalización de lactosa-flavonoides a partir de lactosuero de queso Panela y la adición de rutina o quercetina.

7.3.2 Tamaño de cristales

Los cristales de lactosa (control) y los co-cristales de lactosa-rutina presentaron un tamaño promedio un poco más pequeño que el de los co-cristales de lactosa-rutina. Además, los co-cristales de lactosa-rutina presentaron una distribución de tamaños más amplia que la lactosa sola y los co-cristales de lactosa-quercetina (Figuras 16 y 17). Al mismo tiempo esto concuerda con que los co-cristales de lactosa-rutina presentaron el mayor tamaño en todo este estudio.

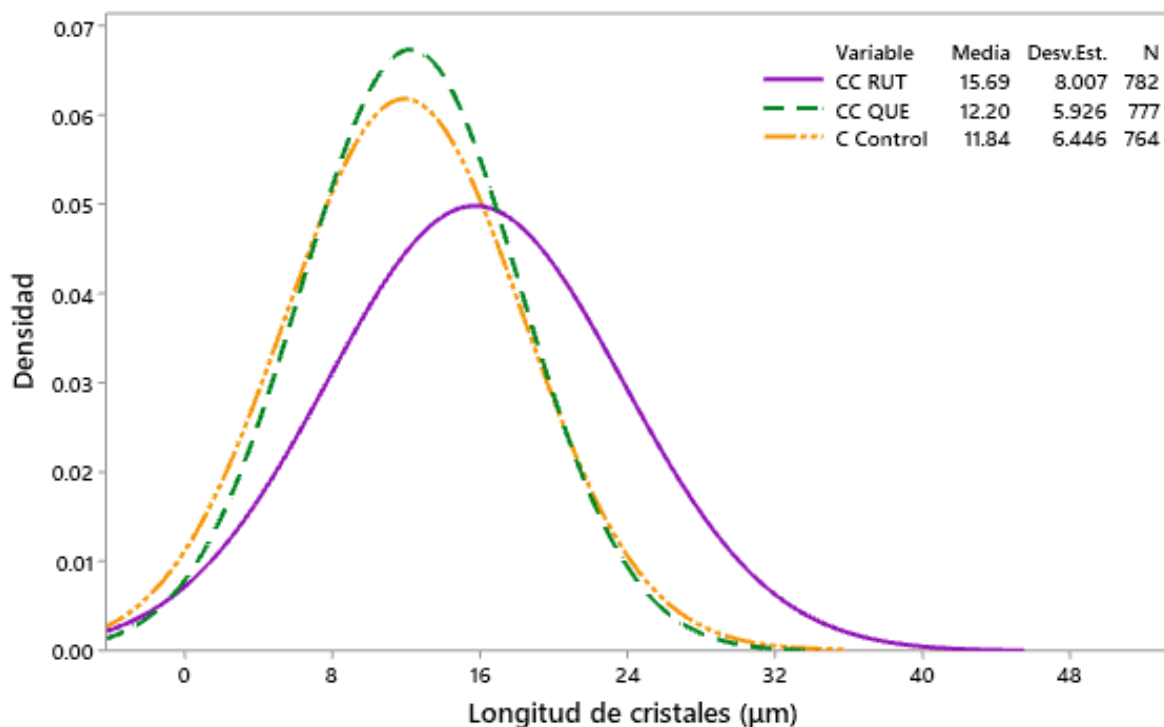


Figura 16. Comparativo de la distribución de tamaños (micrómetros) observada en la cristalización de lactosa a partir de lactosuero (control, línea naranja), adicionada con rutina (línea morada) o quercetina (línea verde).



Figura 17. Imágenes de cristales de lactosa (A), co-cristales de lactosa-quercetina (B) y co-cristales de lactosa-rutina. Imágenes tomadas capturadas de muestras de 1 g de muestra 2 ml de etanol.

Procesos de co-cristalización basados en la obtención de jarabes, o con el uso de triturado de compuestos con adición anti solventes, no suelen considerar el tamaño de partícula de los cristales. Lo anterior debido a que estos co-cristales son triturados posterior a su obtención. Aun así, se reportan tamaños de partícula de 2 a 30 mm en estudios de co-cristalización para la encapsulación de compuestos de antioxidantes de yerba mate y de 8.5 mm en trabajos de co-cristalización utilizando el método de triturado con anti-solvente para la co-cristalización de quercetina (Fang et al., 2010; Vasisht et al., 2016).

En comparación a lo obtenido en este estudio, el tamaño de cristales no es del todo diferente al mencionado. Donde en las co cristalizaciones de quercetina y rutina se obtuvieron cristales con un tamaño promedio de 12.20 y 15.69 micrómetros respectivamente. Se puede decir que la media de tamaño de cristales de la co-cristalización si fue ligeramente mayor a comparación del control (11.84 micrómetros). Además, se pudiera teorizar que estos resultados se debieron al efecto de la adición de polifenoles, ya que la co-cristalización como encapsulación, funciona cuando una estructura cristalina se modifica de un cristal aglomerado perfecto a uno irregular, para proporcionar una matriz porosa en la que se puede incorporar un segundo ingrediente activo (Fang et al., 2010). De ser así se puede ver cómo es que la adición de los flavonoides tiene un efecto mínimo sobre el tamaño de cristales. Además, la presencia de remanentes de proteínas, puede tener un efecto sobre el tamaño de cristales debido a la interacción de lactosa y proteína y flavonoides mediante puente de hidrogeno (C Le Bourvellec et al., 2012; Y. I. Sánchez-García, N. Gutiérrez-Méndez, R. E. Orozco-Mena, V. H. Ramos-Sánchez, & M. Y. J. F. R. I. Leal-Ramos, 2019; Sarabandi et al., 2019)

7.3.3 Rendimiento y composición de cristales

No existió diferencia significativa en la cantidad de lactosa, proteína, sales y agua (humedad) entre los cristales de lactosa (control), co-cristales de lactosa-quercetina y los co-cristales de lactosa-rutina (Tabla 6). Sin embargo, los co-cristales de lactosa-quercetina presentaron el mayor rendimiento de cristalización y la mayor cantidad de polifenoles totales. Esta información lleva a pensar que la quercetina ha tenido mayor interacción con los componentes de lactosuero concentrado para la formación de cristales. Muy probablemente mediante la unión por puentes de hidrógeno de la quercetina con la lactosa y proteínas del suero. A pesar de que no se tiene una diferencia estadísticamente significativa sobre la cantidad de proteína en los tres tipos de cristales. En los co-cristales de lactosa-quercetina hubo una cantidad mayor de proteínas que en los co-cristales de lactosa-rutina (Tabla 6).

En investigaciones previas, donde se ha utilizado la co-cristalización como un método de encapsulación para antioxidantes han demostrado su eficacia. Por ejemplo, se han reportado co-cristales de sacarosa-polifenoles con un contenido de 113 y 199 mg de ácido gálico por cada 100 gramos de cristales. Lo anterior partiendo de concentraciones de 8 y 16% de extracto de *Securidaca securidaca* (Behnamnik, Vazifedoost, Didar, Hajirostamloo, & Biotechnology, 2021). Este tipo de técnica de co-cristalización parece ser recurrente. Estudios realizados por Khawas y Deka, en el 2021 sobre la encapsulación de compuestos antioxidantes mediante co-cristalización de sacarosa-polifenoles reportó resultados 0.05-1.46 mg de ácido gálico por gramo de co-cristal. En dicho estudio utilizaron de 3-10g de cascara de plátano en 50g de sacarosa (Khawas et al., 2017). Estos estudios demuestran la efectividad de encapsular flavonoides dentro de cristales de sacarosa. Además, la co cristalización permite una vida de anaquel o almacenamiento estable de los polifenoles con respecto al tiempo bajo condiciones de exposición directa al ambiente y refrigeración (Irigoití, Yamul, & Navarro, 2021).

Sin embargo, la co cristalización realizada en condiciones donde se utilice el lactosuero como matriz del co cristal, es un área poco explorada por el momento. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran la encapsulación del polifenol en cristales de lactosa a bajas concentraciones. Permitiendo el escalamiento para futuros proyectos. Una de las ventajas de llevar a cabo la cristalización mediante esta metodología, es la temperatura de trabajo, ya que, a diferencia de los estudios mencionados, la temperatura para la adición del flavonoide es de 60 °C, contra 132 °C que alcanza en los estudios donde se utiliza la sacarosa para la co cristalización. Esta puede ser una de las razones por las cuales ha sido posible encapsular y mantener las propiedades de la rutina y quercetina minimizando la pérdida del flavonoide.

Tabla 6. Composición y rendimiento del proceso de cristalización de lactosa a partir de lactosuero de queso Panela adicionado o no (control) con quercetina o rutina

	Lactosuero de queso Panela	Lactosuero de queso Panela + rutina	Lactosuero de queso Panela + quercetina
Lactosa (g 100g ⁻¹ cristales)	97.92 ± 0.73 ^A	97.27 ± 1.02 ^A	97.95 ± 1.32 ^A
Proteína (g 100g ⁻¹ cristales)	0.50 ± 0.41 ^A	0.05 ± 0.03 ^A	0.09 ± 0.04 ^A
Cenizas (g 100g ⁻¹ cristales)	1.14 ± 0.67 ^A	2.22 ± 1.12 ^A	1.81 ± 1.34 ^A
Agua (g 100g ⁻¹ cristales)	0.44 ± 0.22 ^A	0.46 ± 0.19 ^A	0.16 ± 0.03 ^A
Polifenoles totales (mg ácido gálico 100g ⁻¹ cristales)	ND	90 ± 70 ^A	120 ± 40 ^A
Encapsulación de polifenoles (%)	ND	55.07 ± 38.6 ^A	75.71 ± 21.86 ^A
Rendimiento de cristalización (%)	28.42 ± 1.63 ^B	30.17 ± 2.27 ^{A, B}	33.69 ± 0.81 ^A
Recuperación de lactosa (%)	52.13 ± 2.71 ^B	55.00 ± 3.95 ^B	61.86 ± 2.10 ^A

Se muestran promedios y desviación estándar de cada medición; **n**= 6 para suero control y **n**=3 co-cristalización de flavonoides. La diferencia entre las medias que comparten la misma letra no es estadísticamente significativa. **ND** = no determinado

7.3.4 Pureza de cristales y tipo de lactosa cristalizada

7.3.4.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

En el estándar de rutina se observaron dos picos bien definidos a 184 y 194 °C (Figura 18), siendo el segundo el de mayor intensidad. En trabajos donde se han reportado características de rutina encontradas mediante calorimetría diferencial de barrido, se menciona que entre 50-200 °C comienza un a deshidratación térmica del compuesto. Este efecto lo pudimos observar en nuestros resultados mediante una pendiente a una temperatura de 135 °C. Algunos autores reportan que a los 177 °C comienza la fase de transición de la rutina. Esto se relaciona directamente al primer pico a los 184 °C, el cual, al continuar de la fase de deshidratación representa la transición de la pérdida de la fase cristalina. Por otro lado, se ha reportado, que picos endotérmicos a 190 °C en termogramas de rutina son un indicativo de puntos de fusión (da Costa, Barbosa Filho, do Nascimento, & Macêdo, 2002; de Arruda, Pereira, & Stefani, 2017; Remanan & Zhu, 2021; Sri, Kondaiah, Ratna, Annapurna, & pharmacy, 2007).

Los co-cristales de lactosa-rutina presentaron picos endotérmicos a 146.56, 203.56, 221.56, y 230.56 °C. El primer pico se encuentra en la zona de deshidratación del agua de cristalización. El segundo pico corresponde a la formación de lactosa amorfa. Mientras que el tercer pico corresponde a la α -lactosa monohidratada (considerando desde donde nace el pico endotérmico) El cuarto pico corresponde a lo reportado para β -lactosa (Gombas et al., 2002; Kaialy et al., 2011; S. Patel et al., 2011). Es importante resaltar que para los co-cristales de rutina-lactosa los picos endotérmicos de la rutina a 184 y 194 °C se traslapan con la zona de lactosa amorfa. Por lo que puede podemos inferir que la unión entre rutina y lactosa es el causante de que no se presenten puntos de fusión en esa zona, provocando la generación de lactosa amorfa.

En el estándar de quercetina se detectaron un primer pico exotérmico a los 34.33 °C, seguido de una pendiente a 110 °C, la cual culmina en un pico endotérmico a los 137.33 °C. Posterior a estas temperaturas, se observó un pequeño pico exotérmico a

los 179.33 °C y otro a los 183.33 °C (Figura 18). Otros autores mencionan que, a los 116 °C, comienza la pérdida de agua de la quercetina, cambiando a su forma anhidra de su forma hidratada; correspondiendo con la pendiente y pico observado en nuestros resultados (Figura 18) (da Costa et al., 2002). Varios autores han reportado puntos de fusión de quercetina en polvo entre los 320 - 330 °C (Pralhad, Rajendrakumar, & analysis, 2004; Rasaee, Ghanbarzadeh, Mohammadi, & Hamishehkar, 2014; Sahoo et al., 2011). Sin embargo, en este estudio se llevó a cabo un barrido hasta 300 °C. Por lo que no se tiene evidencia de estos picos. No obstante, otros autores reportan la temperatura de fusión de la quercetina entre los 120-130 °C, coincidiendo con nuestro pico pronunciado a 137 °C. (Singh, SM Rawat, Semalty, & Semalty, 2012; Sri et al., 2007).

Respecto al análisis de los co-cristales de lactosa-quercetina, se observó un traslape en la zona de 140-150 °C (Figura 18). Esta zona representa la deshidratación de agua de cristalización en los cristales lactosa. Posteriormente se aprecia un pico endotérmico a los 146 °C, seguido de picos endotérmicos a los 188.45 °C (lactosa amorfa y re-cristalización), 211.45 (α-lactosa mono hidratada) y 227.45 (β-lactosa) (Gombas et al., 2002; Kaialy et al., 2011; S. Patel et al., 2011). El gran pico de lactosa amorfa en estos cristales (Figura 18) nuevamente hace referencia a la gran incorporación de quercetina en los cristales.

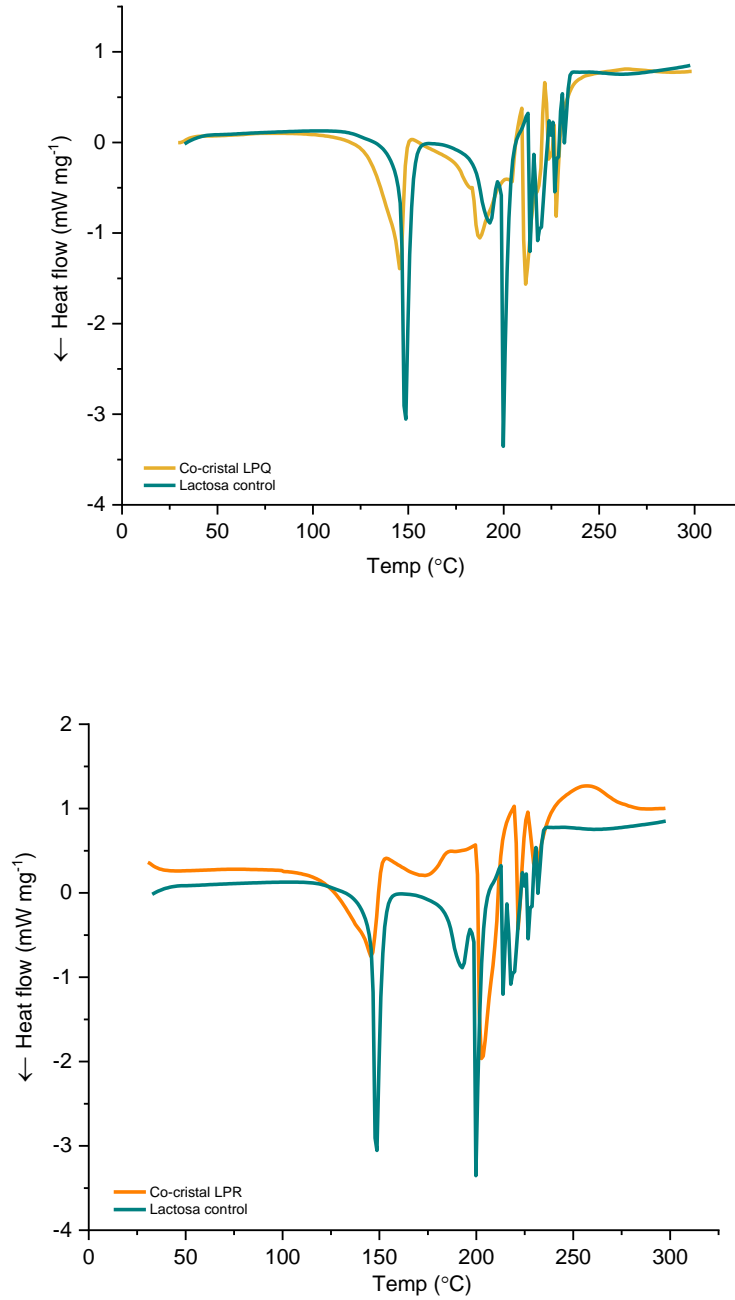


Figura 18. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de co cristalización de flavonoides. A) Co-cristal LPQ (Lactosa-Proteína-Quercetina) y control de lactosa. B) Co-cristal LPR (Lactosa - Proteína -Rutina) y control de lactosa.

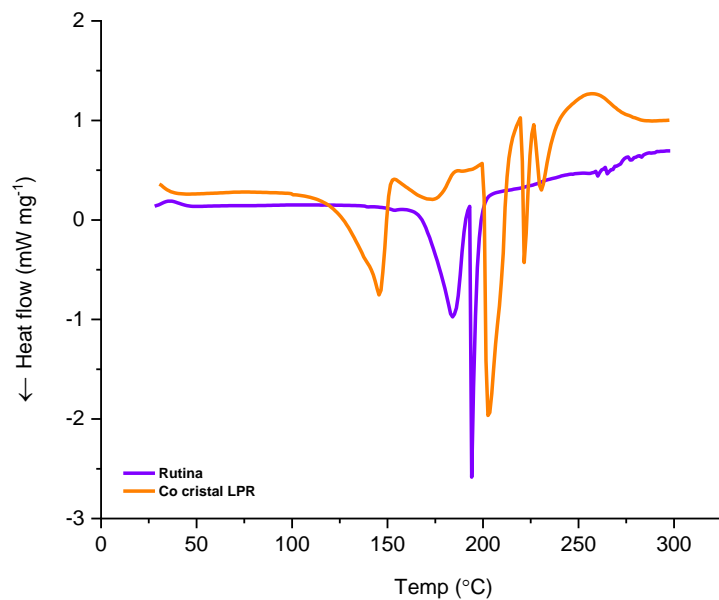
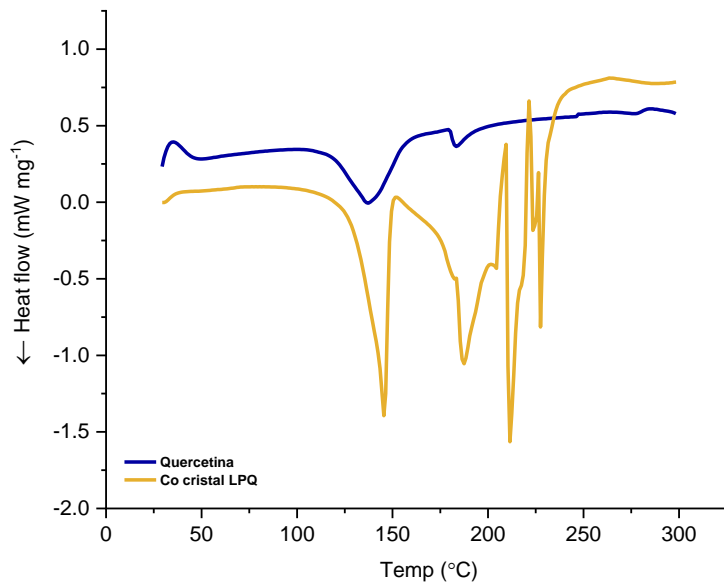


Figura 19. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de co cristalización y estándares de flavonoides. A) Co-cristal LPQ (Lactosa-Proteína-Quercetina) y estándar de quercetina. B) Co-cristal LPR (Lactosa - Proteína -Rutina) y estándar de rutina.

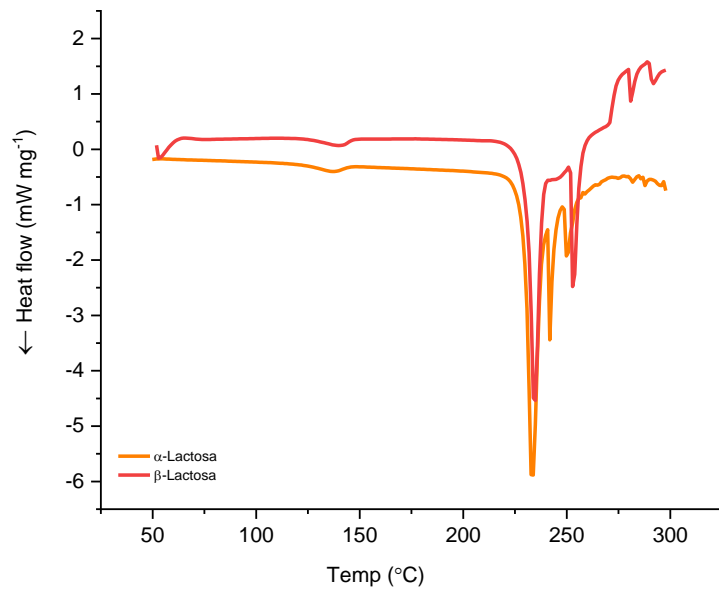
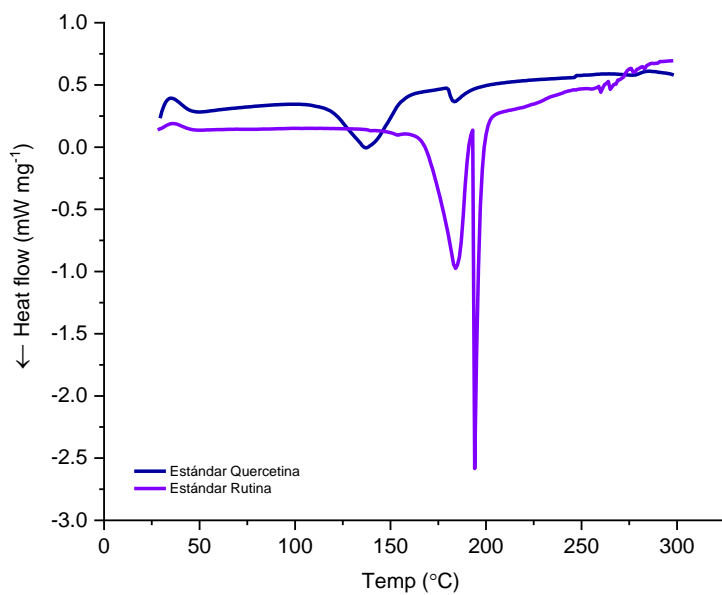


Figura 20. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de estándares. A) Estándar de flavonoides Rutina y Quercetina. B) Estándar de α y β Lactosa.

7.3.4.2 Espectroscopía Raman

Se ha reportado que los picos principales para los flavonoides se encuentran en bandas de 50-1800 cm^{-1} . Destacando las zonas por debajo de los 200 cm^{-1} y de 1570 - 1700 cm^{-1} (Pompeu et al., 2018). Para la rutina pura se reportan pico que van de 69-1659 cm^{-1} , siendo los principales de 573 - 1658 cm^{-1} . En contraparte, la quercetina pura presenta picos principalmente de 604 a 1662 cm^{-1} (Cornard, Merlin, Boudet, & Vrielynck, 1997; de Matos et al., 2020).

Al analizar los cristales de lactosa, así como los co-cristales de lactosa-rutina y lactosa-quercetina se obtuvieron los espectros que se presentan en la figura 21 y tabla 7. Como puede observarse, existe una clara semejanza entre los tres tratamientos, debido a la baja concentración de flavonoides que se usó (0.5 mg de flavonoide por mililitro de suero). Por lo tanto, era de esperarse pocos cambios en las señales de los espectros. Sumado a esto, tanto la lactosa como los flavonoides comparten ciertas bandas al ser ambos compuestos orgánicos.

Respecto a los co-cristales de lactosa-rutina se obtuvieron picos de baja intensidad a longitudes de onda de 1564, 1642 y 1670 cm^{-1} . Estos picos son característicos del estiramiento de enlace C=C en anillos de bencénicos, heterocíclicos y dihidroxifenilico. Los flavonoides presentan los anillos mencionados, mismos que no son reportados para lactosa en sus diferentes formas isómeras. Aparte de estos picos, en la rutina se han reportado picos entre los 573 – 1365 cm^{-1} los cuales representan la deformación y estiramiento de anillos de glucoparinosilo, manopiranosilo y dihidroxifenilo. Es importante recalcar que los picos de mayor intensidad en los co-cristales de lactosa-rutina se encontraron a una longitud de onda de 1088,1128,1340,1046 y 1264 cm^{-1} .

La presencia de picos por arriba de 850 cm^{-1} (figura 21, tabla 7) representan la torsión y deformación de enlaces O-C, C-C-O y C-O-C. Los picos a 1088 y 1340 cm^{-1} se pueden identificar como α -lactosa mono hidratada y α -lactosa anhidra respectivamente (Kirk, Dann, & Blatchford, 2007; López-Pablos et al., 2018). Los co-

cristales de lactosa-quercetina presentó picos de baja intensidad a longitudes de onda de 1606, 1644 y 1658 cm^{-1} . Estos picos se han relacionado con el estiramiento de enlace C=C en anillos bencénicos, heterocíclicos y dihidroixifenilico(Numata & Tanaka, 2011; Pompeu et al., 2018; Samsonowicz, Kamińska, Kalinowska, Lewandowski, & Spectroscopy, 2015). De forma similar a los cristales de lactosa-rutina, los picos de mayor intensidad se encontraron en zonas características de α -lactosa mono hidratada y α -lactosa anhidra, en longitudes de onda de 1046,1090 y 1336 cm^{-1} (figura 21, tabla 7). Sin embargo, este efecto no puede ser atribuido a la adición del polifenol. Lo anterior debido a que en el control se observan los picos más altos en esta misma zona entre los 100-1345 cm^{-1} , incluso con picos que superan en intensidad a los llevados a cabo mediante co cristalización (figura 21, tabla 7).

La baja concentración de flavonoides y casi nula diferencia de espectros entre la lactosa (control) y los co-cristales de lactosa-flavonoides nos lleva a concluir que los flavonoides no alteran significativamente la estructura de la lactosa amorfa. Se puede decir que la interacción es casi mínima y el efecto de co cristalización pudiera ser más que nada resultados de un encapsulamiento al momento de la cristalización de la lactosa que de una interacción directa entre el flavonoide y la lactosa.

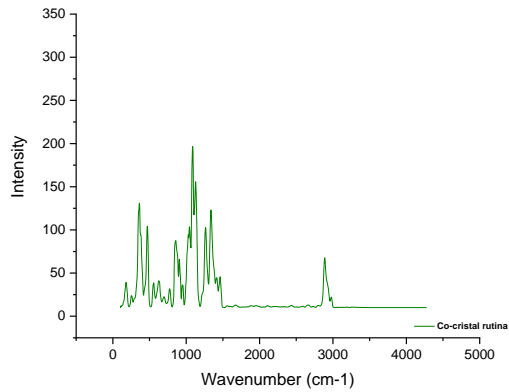
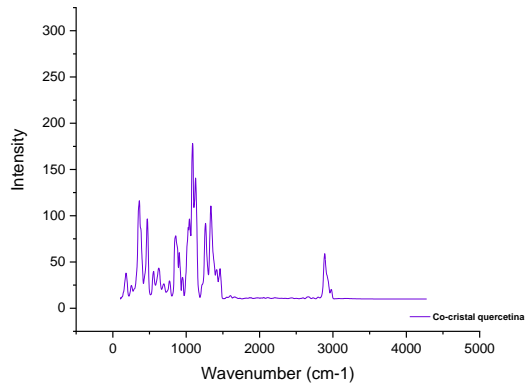
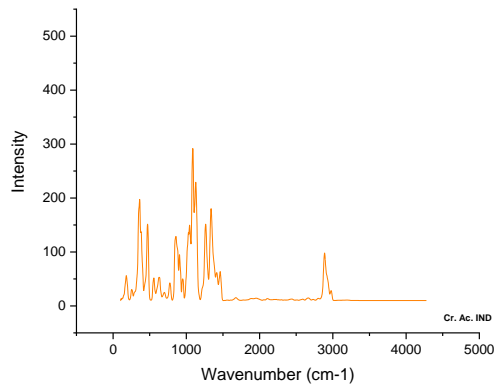


Figura 21. Resultados obtenidos del análisis por espectroscopía raman realizado a los cristales de lactosa (parte superior), co-cristales de lactosa- quercetina (figura de en medio) y co-cristales de lactosa- rutina (figura del fondo).

Tabla 7. Análisis de espectroscopia Raman para cristales de lactosa, co-cristales de lactosa-rutina y co-cristales de lactosa-quercetina.

Cristales de lactosa		Co cristales de lactosa-rutina		Co cristales de lactosa-quercetina	
Longitud de onda (cm ⁻¹)	Intensidad (UA)	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Intensidad (UA)	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Intensidad (UA)
184	54.51	182	38.86	182	37.72
252	30.12	252	23.83	256	24.28
362	197.27	302	21.2	364	114.46
470	151.46	360	129.77	470	96.62
554	50.88	472	103.42	560	38.27
630	52.91	562	32.81	632	42.51
696	24.6	624	40.89	694	26.31
772	41.85	700	22.47	770	29.38
854	127.37	776	31.59	862	77.3
908	94.85	858	87.61	906	60.09
950	50.07	906	65.71	346	32.88
1044	149.64	956	34.92	1026	86.32
1090	290.69	1030	93.69	1046	95.81
1128	229.189	1046	103.04	1090	176.69
1262	150.59	1064	11.48	1128	140.79
1340	178.5	1088	195.03	1262	91.3
1418	60.88	1128	155.83	1336	110.55
1464	63.05	1264	102.88	1418	41.42
1670	14.97	1340	121.14	1566	11.69
		1418	44.26	1462	42.76
		1462	45.66	1606	13.5
		1564	12	1642	12.17
		11.66	1658	1644	11.86
		1670	12.48	1734	10.82
		1774	10.74		

7.3.4.3 Espectroscopia de transmisión infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros obtenidos de los cristales de lactosa (control) y de los co-cristales de lactosa-flavonoides presentaron un patrón muy similar entre ellos tras su análisis por FTIR (figura 22 y 23, tabla 8). Estos resultados derivan probablemente de que su composición es mayoritariamente lactosa (97%) y los flavonoides se encontraron en cantidades muy pequeñas (0.09 a 0.12%). Además, entre los flavonoides y lactosa se comparten o traslapan señales de ciertos grupos y/o enlaces presentes en los compuestos. Sin embargo, se identificaron señales las cuales pueden atribuírsele a la presencia de los flavonoides en presentes en este estudio.

En el caso de la rutina pura, se han reportado señales las cuales van de 1657-573 cm^{-1} (de Matos et al., 2020; Roy et al., 2015; Samsonowicz et al., 2015). Los picos entre 1502-1608 cm^{-1} , representan el enlace C=C presente en la rutina, en anillos bencénicos, heterocíclicos y dihidroxifenolicos (de Matos et al., 2020). Presencia de estos enlaces se pueden observar en el co-cristal con rutina; ya que se encuentra un pico a 1542 cm^{-1} , además de señales cercanas a 94 % de transmitancia que van de los 1500-1583 cm^{-1} que representan (tabla 8, figura 22 y 23) (de Matos et al., 2020; Fathy, El-Wakeel, & Abd El-Latif, 2015). La presencia de un pico a 1656.68 cm^{-1} en el tratamiento con rutina indica la presencia del estiramiento de enlaces C=O, ya que este se encuentra entre 1650-1660, cercanos a los 1655 cm^{-1} (de Matos et al., 2020; Hooresfand, Ghanbarzadeh, & Hamishehkar, 2015; Roy et al., 2015; Samsonowicz et al., 2015). Picos con valores de 1391.32, 1338.33, 1259.26, 1199.48, 1060.63 y 1018.21 cm^{-1} , se identifican como enlaces C-O-C (Roy et al., 2015; Samsonowicz et al., 2015). El pico en 1139.7 cm^{-1} representa al anillo de manopiranosilo de rutina, así como la señal de 1091.49 cm^{-1} es atribuida al enlace C-OH (de Matos et al., 2020; Fathy et al., 2015; Samsonowicz et al., 2015).

Respecto a los co-cristales de lactosa-quercetina, picos encontrados a longitudes de onda 1652.66, 1430.89 y 1261.19 cm^{-1} pertenecen al estiramiento del enlace C=O del heterociclo con oxígeno de los flavonoides (Kumari et al., 2010; Pawlikowska-

Pawłęga et al., 2014). También, los picos con señales de 1388.47, 1361.47, 1342.18, y 1261.19 cm^{-1} han sido identificada como el doblamiento del enlace de -OH, presentes principalmente en los anillos fenólicos de la quercetina (Kumari et al., 2010). Así mismo, señales entre 650-1000 cm^{-1} relacionadas con la deformación del enlace C=CH de los grupos aromáticos de la quercetina (Song, Li, Wang, & Chen, 2009; Y. Zhang, Yang, Tang, Hu, & Zou, 2008).

La baja concentración de flavonoides y la similitud de señales vibracionales, de estiramiento y deformación de enlaces presentes en flavonoides y lactosa hace que los espectros encontrados posean demasiadas similitudes. Un ejemplo de esto son las señales de enlaces de C-O-C presentes en lactosa y flavonoides a una longitud de onda cercana a los 1650 cm^{-1} (López-Pablos et al., 2018; Pawlikowska-Pawłęga et al., 2014; Roy et al., 2015). Lo cual es una limitante en la interpretación de los espectros de FTIR.

Tabla 8. Análisis de espectroscopia FTIR para cristales de lactosa, co-cristales de lactosa-rutina y co-cristales de lactosa-quercetina.

Cristales de lactosa		Co-cristales de lactosa-rutina		Co-cristales de lactosa-quercetina	
Longitud de onda (cm ⁻¹)	Transmitancia (%)	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Transmitancia (%)	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Transmitancia (%)
1652.66	93.46	1656.88	9.88	1652.66	92.62
1425.11	89.27	1542.74	94.3	1430.89	89.2
1394.23	89.78	1429.32	90.81	1388.47	89.33
1359.54	88.7	1391.32	91	1361.47	88.88
1340	87.3	1338.33	89.32	1342.18	87.73
1292.05	90.59	1259.26	89	1261.19	88.82
1255.41	89.21	1199.48	90.38	1023.34	89.36
1203.64	89.6	1168.63	89.03	1170.55	87.67
1164.77	86.93	1139.7	86.6	1141.63	84.08
1137.77	84.02	1116.56	85.14	116.56	83.32
1091.45	77.71	1091.49	81.38	1072.2	76.1
170.28	75.23	1070.28	79.14	1033.64	72.58
1029.78	71.87	1060.63	80.74	987.35	79.39
989.28	78.53	1033.64	76.31	914.07	88.23
917.93	88.73	1018.21	78.64	900.57	85.93
896.72	86.2	989.28	82.55	877.43	84.92
875.5	84.13	914.07	89.36	750.16	78.62
758.16	76.79	898.64	87.15	676.88	82.5
669.16	81.26	875.5	86.24	632.52	83.37
630.59	81.15	755.94	80.96		
		674.95	84.75		
		646.02	86.59		
		630.59	85.37		

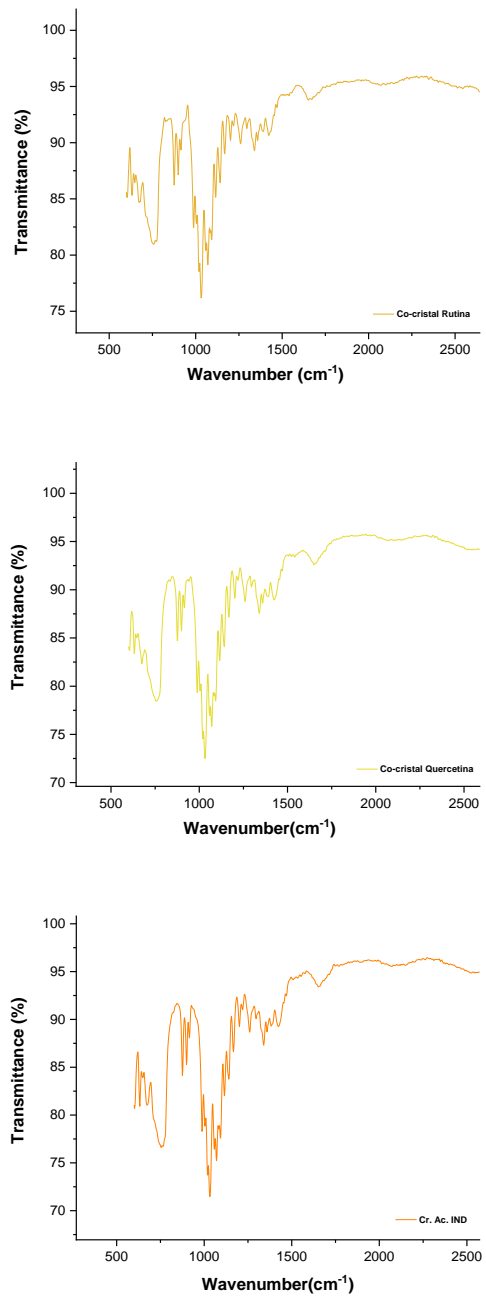


Figura 22. Espectroscopia por FTIR. realizado a los cristales de lactosa, co-cristales de lactosa-rutina (parte superior, color naranja), co-cristales de lactosa quercetina (parte media, color amarillo) y lactosa control (parte inferior, color rojo).

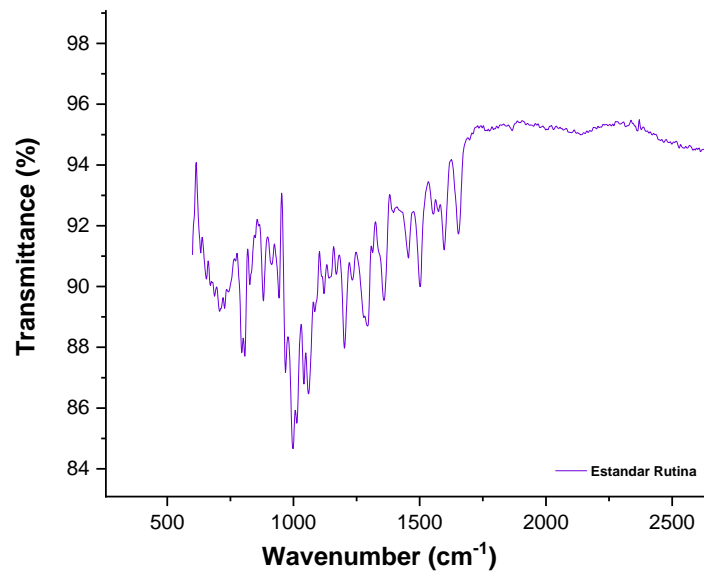
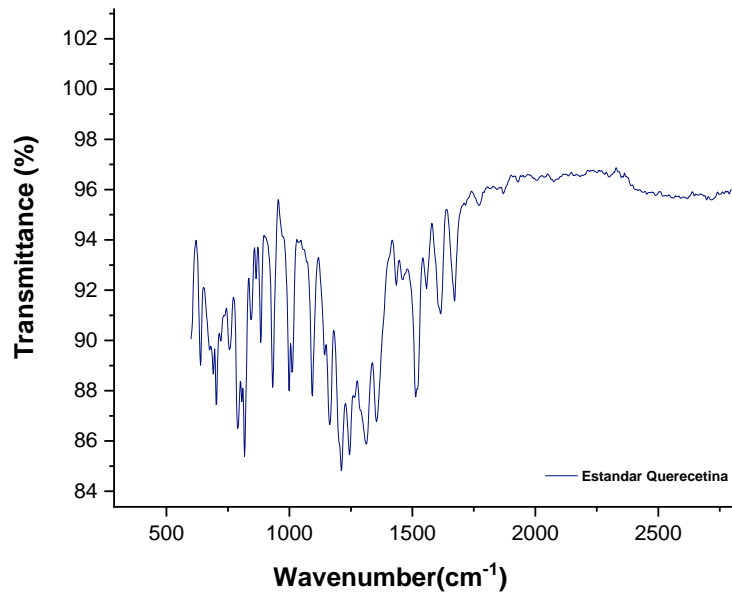


Figura 23. Espectroscopia por FTIR. realizado a los estándares de quercetina (color azul) y los estándares de rutina (color violeta)

7.3.5 Actividad antioxidante de co- cristales

La concentración de L-ácido ascórbico que redujo la mitad de la concentración de radicales de DPPH (EC50) fue de $4.68 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($26.58 \mu\text{M}$), como se observa en la figura 24. Otros autores han reportado valores de EC50 para el ácido ascórbico de $2.46 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($13.96 \mu\text{M}$), y de $11.5 \mu\text{M}$ (M. L. Mendoza-López, C. S. Alvarado-Díaz, S. B. Pérez-Vega, M. Y. Leal-Ramos, & N. J. C.-J. o. F. Gutiérrez-Méndez, 2018). El porcentaje de reducción de radicales (DPPH) o %RSA (radical scavenging activity) del ácido ascórbico fue del 85% a una concentración de $50 \mu\text{M}$. Otros autores han reportado para el ácido ascórbico un %RSA del 94.8 a una concentración de $50 \mu\text{M}$ (Abbadí, Gotlieb, Meiberg, & Van Bekkum, 2003).

Los cristales de lactosa sin flavonoides (control) presentaron un valor EC50 extremadamente alto ($38,091 \mu\text{g mL}^{-1}$). Estos resultados indican que se requiere una cantidad muy elevada de lactosa para reducir el 50% de los radicales de DPPH. Además, el %RSA de los cristales de lactosa sin flavonoides fue de tan solo un 11% a la máxima concentración probada de 8 mg mL^{-1} ($8000 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 24). A pesar de que la lactosa es un azúcar capaz de reducir otras moléculas (azúcar reductor), su %RSA contra el peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos, y radicales DPPH es muy débil. Por ejemplo, se ha reportado un valor de RSA para el radical DPPH de un 3.6% para concentraciones de lactosa entre 0.1 a 1.6 mg mL^{-1} (Q. Li, Feng, Gu, & Guo, 2018). Estos valores del %RSA para lactosa reportados por otros autores fueron menores a los obtenidos en nuestros experimentos (Figura 24). Lo anterior probablemente porque nuestra lactosa no era totalmente pura, sino que contenía trazas de proteínas y de minerales (Tabla 6), los cuales pudieron aumentar su capacidad antioxidante.

La inclusión de rutina dentro de los cristales de lactosa (co-cristales de lactosa-rutina) aumentó significativamente su %RSA a un 71% con una concentración de 8 mg mL^{-1} . Así mismo, el valor de EC50 de la lactosa disminuyó considerablemente a $5383.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ por la inclusión de rutina dentro en los cristales de lactosa (Figura 24). No obstante, los valores observados en los co-cristales de lactosa-rutina fueron muy

superiores a los datos reportados de EC50 para rutina pura (5 a 27.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y menores al % RSA también de la rutina pura (85.1% a 0.035 mg mL^{-1}) (Mensor et al., 2001; Peng et al., 2018; Sousa et al., 2007; Yang et al., 2015). Lo anterior se explica debido a la baja concentración de rutina dentro de los cristales de lactosa, ya que esta solo represento 0.09 g por cada 100g⁻¹ de cristales (Tabla 6).

La inclusión de quercetina en los cristales también aumento la actividad antioxidante de la lactosa, pero a un nivel mayor que la rutina. Los co-cristales de lactosa-quercetina presentaron un EC50 de 2473.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un %RSA de 66.93 % a una concentración máxima de 3 mg mL^{-1} (Figura 24). El menor valor de EC50 y el alto valor de %RSA obtenido a una baja concentración probablemente se debieron a que los co-cristales de lactosa-quercetina encapsularon una mayor cantidad de flavonoides (120 mg 100g⁻¹) que los co-cristales de lactosa-rutina (90 mg 100g⁻¹). Esta suposición esta soportada por el hecho de que los valores de EC50 reportados para la quercetina pura (EC50 = 3 - 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$) son muy similares a aquellos de la rutina pura descritos previamente (Díaz-Rubio et al., 2019; Ma et al., 2018; Montero, Giménez, Pérez-Mateos, & Gómez-Guillén, 2005)

La quercetina también se ha co-cristalizado con otras moléculas como la nicotinamida o con el ácido picolínico. En ambos casos la co-cristalización se realizó por el método de molienda con gota de solvente. En éstos estudios se obtuvieron valores de %RSA del 80% por la incorporación de quercetina (Vasisht et al., 2016). Sin embargo, estos resultados parte de concentraciones muy altas del flavonoide. Mientras que en nuestros co-cristales de lactosa-flavonoides tenemos concentraciones menores al 0.5% (Tabla 6).

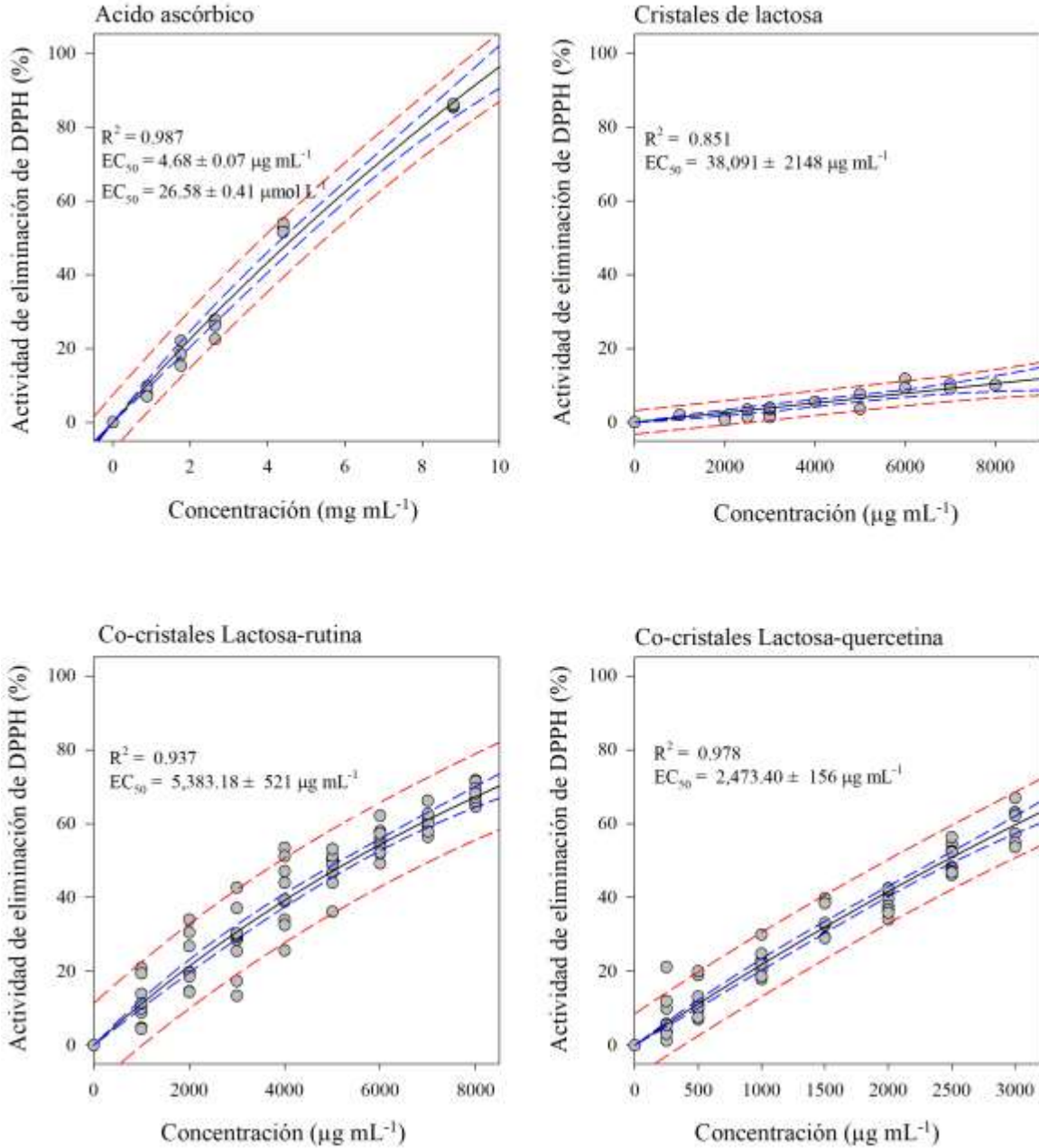


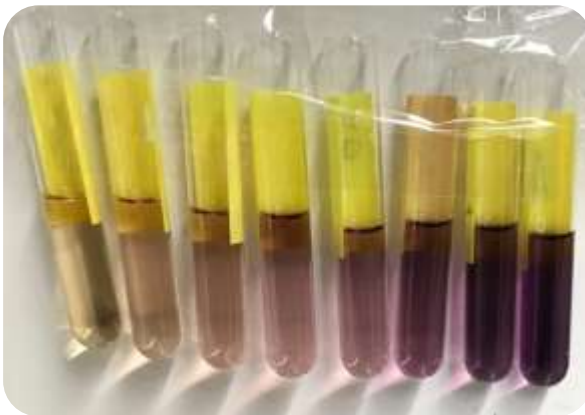
Figura 24. Capacidad de captación del radical libre DPPH por parte del ácido ascórbico, cristales de lactosa sin flavonoides (control), co-cristales de lactosa-rutina y co-cristales de lactosa-quercetina. La línea negra representa el ajuste de regresión, las líneas rojas representan las bandas de predicción al 95%, y las líneas azules representan las bandas del intervalo de confianza de la regresión al 95%.



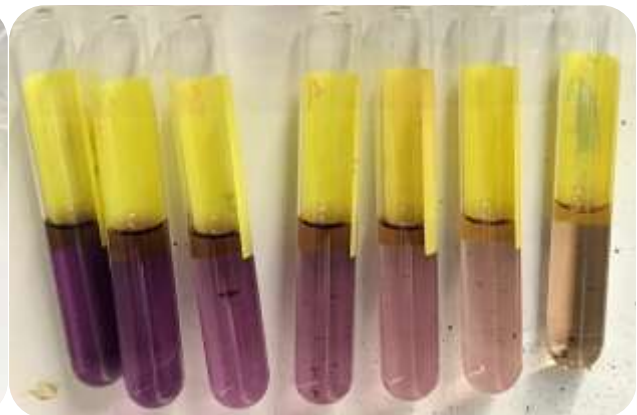
Cristales de lactosa sin flavonoides (control) concentración 1 a 8 mg mL⁻¹ de derecha a izquierda



Cristales de lactosa sin flavonoides (control) concentración 0.25 a 3 mg mL⁻¹ de izquierda a derecha



Co-cristales de lactosa-rutina concentración 1 a 8 mg mL⁻¹ de derecha a izquierda



Co-cristales de lactosa-quercetina concentración 0.25 a 3 mg mL⁻¹ de izquierda a derecha

Figura 25. Ejemplos de las pruebas colorimétricas con el radical DPPH y soluciones de cristales de lactosa sin flavonoides (control) y con los flavonoides quercetina o rutina encapsulados en su estructura cristalina

7.4 Conclusiones etapa 2

La presencia de flavonoides durante la cristalización de lactosa probablemente induce la generación de núcleos por la interacción del flavonoide con la lactosa y con los remanentes de proteína. De tal forma que se induce una cristalización secundaria que permite el encapsulamiento de los flavonoides dentro de la estructura de los cristales de lactosa.

La quercetina tuvo una mayor interacción para formar co-cristales que la rutina. Además, la adición de flavonoides a un a bajas concentraciones permitió aumentar el rendimiento de recuperación de lactosa. Esto debido a que la interacción entre la lactosa, los flavonoides y los residuos de proteínas (principalmente mediante puentes de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas) facilita la formación de complejos lactosa-flavonoides-proteínas. Dichos complejos contribuyen al incremento del rendimiento de cristalización.

Es importante mencionar que la presencia de flavonoides promueve la formación de lactosa amorfa en lugar de favorecer la formación de cristales de α -lactosa monohidratada. No obstante, la encapsulación de flavonoides dentro de los cristales de lactosa o de la forma no cristalina de lactosa amorfa, incrementaron significativamente la actividad antioxidante del azúcar. En suma, la metodología utilizada en este trabajo permitió generar exitosamente a partir de lactosuero de queso Panela y flavonoides puros, co-cristales de lactosa-flavonoides. Dicho de otra forma, se generó un azúcar enriquecido con polifenoles que presenta actividad antioxidante. Sin embargo, aún se requieren futuros trabajos para poder obtener estos co-cristales de lactosa-flavonoides, pero usando fuentes vegetales ricas en polifenoles en lugar de polifenoles puros. Estas fuentes vegetales deberán ser de bajo costo o subproductos para que el proceso sea económicamente viable.

8 Conclusiones totales

Los cristales a partir de lactosuero de queso panela producidos a partir de tratamientos ácidos (pH 3.8) alcanzan un mayor grado de pureza.

La cristalización inducida por agitación permite obtener cristales en menor tiempo y tamaño de partícula más homogéneo.

La presencia de flavonoides encapsulados mediante el proceso de co-cristalización permite aumentar la actividad antioxidante del azúcar; generando un producto nutracéutico o enriquecido.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abbadi, A., Gotlieb, K., Meiberg, J., & Van Bekkum, H. J. G. C. (2003). New food antioxidant additive based on hydrolysis products of lactose. *5*(1), 47-51.
- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., . . . Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, *20*(8), 1689-1699. doi:10.1080/10942912.2016.1220393
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. J. N. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *18*(1), 75-81.
- Atanassova, M., Bagdassarian, V. J. J. o. t. U. o. C. T., & Metallurgy. (2009). Rutin content in plant products. *44*(2), 201-203.
- Behnamnik, A., Vazifedoost, M., Didar, Z., Hajirostamloo, B. J. B., & Biotechnology, A. (2021). Evaluation of physicochemical, structural, and antioxidant properties of microencapsulated seed extract from *Securigera securidaca* by co-crystallization method during storage time. *35*, 102090.
- Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. J. E. j. o. p. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *585*(2-3), 325-337.
- Bordenave-Juchereau, S., Almeida, B., Piot, J.-M., & Sannier, F. J. J. o. d. r. (2005). Effect of protein concentration, pH, lactose content and pasteurization on thermal gelation of acid caprine whey protein concentrates. *72*(1), 34-38.
- Bund, R., & Pandit, A. (2007). Sonocrystallization: Effect on lactose recovery and crystal habit. *Ultrasonics Sonochemistry*, *14*, 143-152.
- Bund, R., & Pandit, A. J. J. o. F. E. (2007). Rapid lactose recovery from buffalo whey by use of 'anti-solvent, ethanol'. *82*(3), 333-341.
- Camilo, O. V. (2010). *SIMULACIÓN Y CONTROL DEL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN DE AZÚCAR DE CAÑA POR LOTES A VACÍO CON UN ENFOQUE DE DISEÑO DIRECTO*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
- Chandrapala, J., Duke, M. C., Gray, S. R., Zisu, B., Weeks, M., Palmer, M., & Vasiljevic, T. J. J. o. D. S. (2015). Properties of acid whey as a function of pH and temperature. *98*(7), 4352-4363.
- Cheol Ho, P., Kim, Y., Choi, Y., Heo, K., & Kim, S. J. F. (2000). Rutin content in food products processed from groats, leaves, and flowers of buckwheat. *17*, 63-66.
- Cherukuvada, S., Kaur, R., & Row, T. N. G. J. C. (2016). Co-crystallization and small molecule crystal form diversity: from pharmaceutical to materials applications. *18*(44), 8528-8555.
- Cornard, J., Merlin, J., Boudet, A., & Vrielynck, L. J. B. (1997). Structural study of quercetin by vibrational and electronic spectroscopies combined with semiempirical calculations. *3*(3), 183-193.
- Cuartas-Uribe, B., Alcaina-Miranda, M. I., Soriano-Costa, E., Mendoza-Roca, J. A., Iborra-Clar, M. I., & Lora-García, J. (2009). *1*(1), 244-255.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.11.086>
- da Costa, E. M., Barbosa Filho, J. M., do Nascimento, T. G., & Macêdo, R. O. J. T. A. (2002). Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *392*, 79-84.
- Das, B., Sarkar, S., Sarkar, A., Bhattacharjee, S., & Bhattacharjee, C. (2015). Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *Process Safety and Environmental Protection*. doi:10.1016/j.psep.2015.05.006

- Das, B., Sarkar, S., Sarkar, A., Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C. J. P. S., & Protection, E. (2016). Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *101*, 27-33.
- de Arruda, I. N. Q., Pereira, V. A., & Stefani, R. J. J. o. t. I. C. S. (2017). Application of chitosan matrix for delivery of rutin. *14*(3), 561-566.
- De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., & Spiga, D. J. I. j. o. h. e. (2014). Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *39*(36), 20930-20941.
- de Matos, Y. M., Vasconcelos, D. L., Barreto, A. C., Rocha, J. E., Neto, J. B., Campina, F. F., . . . Alvarez-Pizarro, J. C. J. V. S. (2020). Reduction of the phytotoxic effect of mercury chloride by rutin and evaluation of interactions by vibrational spectroscopy (Raman and FTIR). *109*, 103084.
- de Souza, R. R., Bergamasco, R., da Costa, S. C., Feng, X., Faria, S. H. B., & Gimenes, M. L. (2010). Recovery and purification of lactose from whey. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *49*(11), 1137-1143. doi:10.1016/j.cep.2010.08.015
- de Souza, R. R., Bergamasco, R., da Costa, S. C., Feng, X., Faria, S. H. B., Gimenes, M. L. J. C. E., & Intensification, P. P. (2010). Recovery and purification of lactose from whey. *49*(11), 1137-1143.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., & Martino, M. N. J. J. o. F. E. (2007). Co-crystallization of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) and mineral salts within a sucrose matrix. *80*(2), 573-580.
- Díaz-Rubio, L., Hernández-Martínez, R., Estolano-Cobián, A., Chávez-Velasco, D., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N., . . . Córdova-Guerrero, I. J. A. S. (2019). Synthesis, biological evaluation and docking studies of chalcone and flavone analogs as antioxidants and acetylcholinesterase inhibitors. *9*(3), 410.
- Dincer, T., Ogden, M., & Parkinson, G. J. J. o. c. g. (2009). Crystal growth mechanisms of the (0 1 0) face of α -lactose monohydrate crystals. *311*(8), 2427-2432.
- Drapier-Beche, N., Fanni, J., & Parmentier, M. J. J. o. d. s. (1999). Physical and chemical properties of molecular compounds of lactose. *82*(12), 2558-2563.
- Durham, R. J. J. D.-d. i. (2009). Modern approaches to lactose production. 103-144.
- Erdemir, D., Lee, A. Y., & Myerson, A. S. J. A. o. c. r. (2009). Nucleation of crystals from solution: classical and two-step models. *42*(5), 621-629.
- Fang, Z., Bhandari, B. J. T. i. F. S., & Technology. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *21*(10), 510-523.
- Fathy, N. A., El-Wakeel, S. T., & Abd El-Latif, R. R. J. J. o. E. C. E. (2015). Biosorption and desorption studies on chromium (VI) by novel biosorbents of raw rutin and rutin resin. *3*(2), 1137-1145.
- Figura, L., Epple, M. J. J. o. T. A., & Calorimetry. (1995). Anhydrous α -lactose A study with DSC and TXRD. *44*(1), 45-53.
- Formica, J., Regelson, W. J. F., & toxicology, c. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *33*(12), 1061-1080.
- Fox, P. (2009). Lactose: Chemistry and properties. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 1-15): Springer.
- Fox, P. F. (2013). *Advanced dairy chemistry volume 3: lactose, water, salts and vitamins*: Springer Science & Business Media.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P., & O'Mahony, J. (2015). Lactose. In *Dairy chemistry and biochemistry* (pp. 21-68): Springer.

- Frutos, M. J., Rincón-Frutos, L., & Valero-Cases, E. (2019). Rutin. In *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements* (pp. 111-117): Elsevier.
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. J. S. p. j. (2017). The pharmacological potential of rutin. *25(2)*, 149-164.
- Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. J. I. D. J. (2008). Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *18(7)*, 685-694.
- Garnier, S., Petit, S., & Coquerel, G. J. J. o. C. G. (2002). Influence of supersaturation and structurally related additives on the crystal growth of α -lactose monohydrate. *234(1)*, 207-219.
- Gombas, A., Szabó-Révész, P., Kata, M., Regdon, G., Erős, I. J. J. o. T. A., & Calorimetry. (2002). Quantitative determination of crystallinity of α -lactose monohydrate by DSC. *68(2)*, 503-510.
- González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, Á. M., De la Rosa-Alcaraz, M. d. l. Á., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *Journal of Dairy Science*, *99(5)*, 3250-3262. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>
- Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., . . . Veit, M. J. T. J. o. C. P. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *41(5)*, 492-499.
- Guu, M. Y., & Zall, R. R. J. P. b. (1991). Lactose crystallization: Effects of minerals and seeding. *26(3)*, 167-172.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13(10)*, 572-584. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Hernández-Herrero, J., & Frutos, M. J. F. c. (2015). Influence of rutin and ascorbic acid in colour, plum anthocyanins and antioxidant capacity stability in model juices. *173*, 495-500.
- Herrington, B. J. J. o. d. s. (1934). Some physico-chemical properties of lactose: I. The spontaneous crystallization of supersaturated solutions of lactose. *17(7)*, 501-518.
- Hooresfand, Z., Ghanbarzadeh, S., & Hamishehkar, H. J. P. S. (2015). Preparation and characterization of rutin-loaded nanophytosomes. *21(3)*, 145-151.
- Hourigan, J., Lifran, E. V., Vu, L. T., Listiohadi, Y., & Sleight, R. W. J. A. i. d. i. (2013). Lactose: chemistry, processing, and utilization. 21-41.
- Huppertz, T., & Gazi, I. (2015). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. *Journal of Dairy Science*, *99(8)*, 6842-6851. doi:10.3168/jds.2015-10033
- Irigoiti, Y., Yamul, D. K., & Navarro, A. S. J. L. (2021). Co-crystallized sucrose with propolis extract as a food ingredient: Powder characterization and antioxidant stability. *143*, 111164.
- Kaialy, W., Martin, G. P., Ticehurst, M. D., Royall, P., Mohammad, M. A., Murphy, J., & Nokhodchi, A. J. T. A. j. (2011). Characterisation and deposition studies of recrystallised lactose from binary mixtures of ethanol/butanol for improved drug delivery from dry powder inhalers. *13(1)*, 30-43.
- Katainen, E., Niemelä, P., Harjunen, P., Suhonen, J., & Järvinen, K. J. T. (2005). Evaluation of the amorphous content of lactose by solution calorimetry and Raman spectroscopy. *68(1)*, 1-5.
- Khawas, P., Deka, S. J. J. o. F. P., & Preservation. (2017). Encapsulation of natural antioxidant compounds from culinary banana by Cocrystallization. *41(1)*, e13033.

- Kirk, J. H., Dann, S. E., & Blatchford, C. J. I. j. o. p. (2007). Lactose: a definitive guide to polymorph determination. *334*(1-2), 103-114.
- Kondepudi, D. K., & Sabanayagam, C. J. C. p. l. (1994). Secondary nucleation that leads to chiral symmetry breaking in stirred crystallization. *217*(4), 364-368.
- Kreft, I., Fabjan, N., & Germ, M. J. F. (2003). Rutin in buckwheat-protection of plants and its importance for the production of functional food. *20*(7), 7-11.
- Królczyk, J. B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., Solowiej, B. J. P. j. o. f., & sciences, n. (2016). Use of whey and whey preparations in the food industry-a review. *66*(3), 157.
- Kumari, A., Yadav, S. K., Pakade, Y. B., Singh, B., Yadav, S. C. J. C., & Bionterfaces, S. B. (2010). Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *80*(2), 184-192.
- Lakhanpal, P., & Rai, D. K. J. I. J. o. M. U. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. *2*(2), 22-37.
- Le Bourvellec, C., Renard, C. J. C. r. i. f. s., & nutrition. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *52*(3), 213-248.
- Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *52*(3), 213-248. doi:10.1080/10408398.2010.499808
- Li, Q., Feng, Y., Gu, G., & Guo, Z. J. S. S. (2018). Synthesis of Novel Amino Lactose and Evaluation of Its Antioxidant Property. *70*(5-6), 1700293.
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., . . . Yin, Y. J. N. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *8*(3), 167.
- Listiohadi, Y., Hourigan, J. A., Sleight, R. W., Steele, R. J. J. D. S., & Technology. (2009). Thermal analysis of amorphous lactose and α -lactose monohydrate. *89*(1), 43-67.
- Listiohadi, Y. D., Hourigan, J., Sleight, R. W., & Steele, R. J. J. A. J. o. D. T. (2005). Properties of lactose and its caking behaviour. *60*(1), 33.
- López-Pablos, A. L., Leyva-Porras, C. C., Silva-Cázares, M. B., Longoria-Rodríguez, F. E., Pérez-García, S. A., Vértiz-Hernández, Á. A., & Saavedra-Leos, M. Z. J. I. J. o. P. S. (2018). Preparation and characterization of high purity anhydrous β -Lactose from α -Lactose monohydrate at mild temperature. *2018*.
- Ma, J.-J., Yu, Y.-G., Yin, S.-W., Tang, C.-H., Yang, X.-Q. J. J. o. a., & chemistry, f. (2018). Cellular uptake and intracellular antioxidant activity of zein/chitosan nanoparticles incorporated with quercetin. *66*(48), 12783-12793.
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S., Aparnathi, K. J. I. J. o. C. M., & Sciences, A. (2016). Whey and its utilization. *5*(8), 134-155.
- Martín-del-Campo, S. T., Martínez-Basilio, P. C., Sepúlveda-Álvarez, J. C., Gutiérrez-Melchor, S. E., Galindo-Peña, K. D., Lara-Domínguez, A. K., & Cardador-Martínez, A. J. A. (2019). Production of antioxidant and ACEI peptides from cheese whey discarded from Mexican white cheese production. *8*(6), 158.
- Mazorra Manzano, M. A., Ramírez Montejo, H., Lugo Sánchez, M. E., González Córdoba, A. F., & Vallejo Córdoba, B. J. N. s. (2019). Characterization of whey and whey cheese requesón from the production of asadero cheese (cooked cheese) Sonoran region. *11*(23).
- Mendoza-López, M. L., Alvarado-Díaz, C. S., Pérez-Vega, S. B., Leal-Ramos, M. Y., & Gutiérrez-Méndez, N. (2018). Compositional and free radical scavenging properties of

- Zea mays female inflorescences (maize silks) from Mexican maize landraces. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 96-104. doi:10.1080/19476337.2017.1343866
- Mendoza-López, M. L., Alvarado-Díaz, C. S., Pérez-Vega, S. B., Leal-Ramos, M. Y., & Gutiérrez-Méndez, N. J. C.-J. o. F. (2018). Compositional and free radical scavenging properties of Zea mays female inflorescences (maize silks) from Mexican maize landraces. *16*(1), 96-104.
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. d., Coube, C. S., & Leitão, S. G. J. P. r. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *15*(2), 127-130.
- Mersmann, A. (2001). Revised and Expanded.
- Montero, P., Giménez, B., Pérez-Mateos, M., & Gómez-Guillén, M. C. J. F. C. (2005). Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. *93*(1), 17-23.
- Morales, H., di Sciascio, F., & Amicarelli, A. (2018). Estimación de la Sobresaturación en el Proceso de Cristalización de la Industria Azucarera.
- Morrissey, P. (1985). Lactose: chemical and physicochemical properties. In *Developments in dairy chemistry—3* (pp. 1-34): Springer.
- Myerson, A. (2002). *Handbook of industrial crystallization*: Butterworth-Heinemann.
- Nickerson, T., & Moore, E. J. J. o. D. S. (1974). Factors influencing lactose crystallization. *57*(11), 1315-1319.
- Numata, Y., & Tanaka, H. J. F. C. (2011). Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy. *126*(2), 751-755.
- Patel, S., Murthy, Z. J. C. R., & Technology. (2011). Effect of process parameters on crystal size and morphology of lactose in ultrasound- assisted crystallization. *46*(3), 243-248.
- Patel, S. R., Murthy, Z. J. S., & Reviews, P. (2012). Lactose recovery processes from whey: a comparative study based on sonocrystallization. *41*(4), 251-266.
- Patel, S. R., Murthy, Z. P. J. C. R., Experimental, T. J. o., & Crystallography, I. (2009). Ultrasound assisted crystallization for the recovery of lactose in an anti- solvent acetone. *44*(8), 889-896.
- Patole, T., Deshpande, A. J. I. J. o. P. S., & Research. (2014). Co-crystallization-a technique for solubility enhancement. *5*(9), 3566.
- Pawar, N., Saha, A., Nandan, N., & Parambil, J. V. J. C. (2021). Solution cocrystallization: A scalable approach for cocrystal production. *11*(3), 303.
- Pawlikowska-Pawłęga, B., Dziubińska, H., Król, E., Trębacz, K., Jarosz-Wilkołazka, A., Paduch, R., . . . Gruszecki, W. I. J. B. e. B. A.-B. (2014). Characteristics of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes. *1838*(1), 254-265.
- Peng, F., Xu, P., Zhao, B.-Y., Zong, M.-H., Lou, W.-Y. J. J. o. f. s., & technology. (2018). The application of deep eutectic solvent on the extraction and in vitro antioxidant activity of rutin from Sophora japonica bud. *55*(6), 2326-2333.
- Pisponen, A., Pajumägi, S., Mootse, H., Karus, A., Poikalainen, V. J. D. S., & Technology. (2013). The lactose from Ricotta cheese whey: the effect of pH and concentration on size and morphology of lactose crystals. *93*(4), 477-486.
- Pisponen, A., Pajumägi, S., Mootse, H., Sats, A., Poikalainen, V., & Karus, A. J. A. R. (2014). Effect of cooling rates and low crystallization temperatures on morphology of lactose crystals obtained from Ricotta cheese whey. *12*(3), 787-792.

- Pompeu, D. R., Larondelle, Y., Rogez, H., Abbas, O., Pierna, J. A. F., & Baeten, V. J. B. (2018). Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools.
- Pralhad, T., Rajendrakumar, K. J. J. o. p., & analysis, b. (2004). Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *34*(2), 333-339.
- Raghavan, S., Ristic, R., Sheen, D., & Sherwood, J. J. J. o. p. s. (2001). The bulk crystallization of α - lactose monohydrate from aqueous solution. *90*(7), 823-832.
- Rasaei, S., Ghanbarzadeh, S., Mohammadi, M., & Hamishehkar, H. J. P. s. (2014). Nano phytosomes of quercetin: A promising formulation for fortification of food products with antioxidants. *20*(3), 96-101.
- Rauf, A., Imran, M., Khan, I. A., ur- Rehman, M., Gilani, S. A., Mehmood, Z., & Mubarak, M. S. J. P. R. (2018). Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *32*(11), 2109-2130.
- Remanan, M. K., & Zhu, F. J. F. C. (2021). Encapsulation of rutin using quinoa and maize starch nanoparticles. *353*, 128534.
- Roy, S., Majumdar, S., Singh, A. K., Ghosh, B., Ghosh, N., Manna, S., . . . Mallick, S. J. B. t. e. r. (2015). Synthesis, characterization, antioxidant status, and toxicity study of vanadium–rutin complex in Balb/c mice. *166*(2), 183-200.
- Sahoo, N., Kakran, M., Shaal, L., Li, L., Müller, R., Pal, M., & Tan, L. J. J. o. p. s. (2011). Preparation and characterization of quercetin nanocrystals. *100*(6), 2379-2390.
- Salas-Vargas, C., Brunett-Pérez, L., Espinosa-Ortiz, V. E., & Martínez-García, C. G. J. J. o. C. P. (2021). Environmental impact of Oaxaca cheese production and wastewater from artisanal dairies under two scenarios in Aculco, State of Mexico. *311*, 127586.
- Samsonowicz, M., Kamińska, I., Kalinowska, M., Lewandowski, W. J. S. A. P. A. M., & Spectroscopy, B. (2015). Alkali metal salts of rutin–Synthesis, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV–VIS), antioxidant and antimicrobial studies. *151*, 926-938.
- Sánchez-García, Y. I., Bhangu, S. K., Ashokkumar, M., & Néstor, G.-M. (2018). Sonocrystallization of lactose from whey. In N. Koca (Ed.), *Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing* (First ed., pp. 51-69). London: IntechOpen.
- Sánchez-García, Y. I., García-Vega, K. S., Leal-Ramos, M. Y., Salmeron, I., & Gutiérrez-Méndez, N. (2018). Ultrasound-assisted crystallization of lactose in the presence of whey proteins and κ -carrageenan. *Ultrasonics Sonochemistry*, *42*(April), 714-722. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.12.020>
- Sánchez-García, Y. I., Gutiérrez-Méndez, N., Orozco-Mena, R. E., Ramos-Sánchez, V. H., & Leal-Ramos, M. Y. (2019). Individual and combined effect of pH and whey proteins on lactose crystallization. *Food Research International*, *116*, 455-461. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.061>
- Sánchez-García, Y. I., Gutiérrez-Méndez, N., Orozco-Mena, R. E., Ramos-Sánchez, V. H., & Leal-Ramos, M. Y. J. F. R. I. (2019). Individual and combined effect of pH and whey proteins on lactose crystallization. *116*, 455-461.
- Sánchez-García, Y. I., Gutiérrez-Méndez, N., Salmerón, I., Ramos-Sánchez, V. H., Leal-Ramos, M. Y., & Sepúlveda, D. R. (2021). Mutarotation and solubility of lactose as affected by carrageenans. *Food Research International*, *142*, 110204. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110204>

- Sánchez- Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura- Calixto, F. J. J. o. t. S. o. F., & Agriculture. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *76*(2), 270-276.
- Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., & Akbari, M. J. J. o. F. P. E. (2019). Physicochemical properties and antioxidant stability of microencapsulated marjoram extract prepared by co- crystallization method. *42*(1), e12949.
- Sarraguça, M. C., Ribeiro, P. R., Dos Santos, A. O., & Lopes, J. A. J. J. o. p. s. (2015). Batch statistical process monitoring approach to a cocrystallization process. *104*(12), 4099-4108.
- SIAP-SAGARPA. (2019). *Boletín de leche (Enero-Marzo 2019)*. Mexico City: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) Secretaría de Agricultura y Desarrollo Retrieved from <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Bolet%C3%ADn%20de%20Leche%20enero-marzo%202019.pdf>
- Singh, D., SM Rawat, M., Semalty, A., & Semalty, M. J. C. D. D. T. (2012). Quercetin-phospholipid complex: an amorphous pharmaceutical system in herbal drug delivery. *9*(1), 17-24.
- Skibola, C. F., Smith, M. T. J. F. r. b., & medicine. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *29*(3-4), 375-383.
- Smart, J. B., & Smith, J. M. J. I. D. J. (1992). Effect of selected compounds on the rate of α -lactose monohydrate crystallization, crystal yield and quality. *2*(1), 41-53.
- Smithers, G. W., & Augustin, M. A. (2012). *Advances in dairy ingredients* (Vol. 79): John Wiley & Sons.
- Song, X., Li, J., Wang, J., & Chen, L. J. T. (2009). Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction. *80*(2), 694-702.
- Sousa, C. M. d. M., Silva, H. R., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S. d., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., . . . Chaves, M. H. J. Q. n. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *30*(2), 351-355.
- Sri, K. V., Kondaiah, A., Ratna, J. V., Annapurna, A. J. D. d., & pharmacy, i. (2007). Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. *33*(3), 245-253.
- Terahara, N. J. N. p. c. (2015). Flavonoids in foods: a review. *10*(3), 1934578X1501000334.
- Thayyil, A. R., Juturu, T., Nayak, S., & Kamath, S. J. A. P. B. (2020). Pharmaceutical cocrystallization: regulatory aspects, design, characterization, and applications. *10*(2), 203.
- Vasconcelos Corrêa, C. (2013). Estudio de la cristalización y recuperación de hidroxapatita en un reactor de tanque agitado.
- Vasisht, K., Chadha, K., Karan, M., Bhalla, Y., Jena, A. K., & Chadha, R. J. C. (2016). Enhancing biopharmaceutical parameters of bioflavonoid quercetin by cocrystallization. *18*(8), 1403-1415.
- Vekilov, P. G. J. C. g., & design. (2010). Nucleation. *10*(12), 5007-5019.
- Vicente-Vicente, L., Prieto, M., & Morales, A. J. R. d. T. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *30*(2), 171-181.
- Wach, A., Pyrzyńska, K., & Biesaga, M. J. F. c. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *100*(2), 699-704.

- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurst, T. M. (2006). *Dairy Science and Technology* (Second ed.). Boca Raton FL: CRC press.
- Wong, S. Y., & Hartel, R. W. J. J. o. f. s. (2014). Crystallization in lactose refining—A review. *79*(3), R257-R272.
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. J. B. a. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *33*(6), 756-774.
- Yang, R., Zhou, Z., Sun, G., Gao, Y., Xu, J., Strappe, P., . . . Ding, X. J. R. A. (2015). Synthesis of homogeneous protein-stabilized rutin nanodispersions by reversible assembly of soybean (*Glycine max*) seed ferritin. *5*(40), 31533-31540.
- Zadow, J. (2012). *Whey and lactose processing*: Springer Science & Business Media.
- Zamanipoor, M. H., Mancera, R. L. J. T. i. f. s., & technology. (2014). The emerging application of ultrasound in lactose crystallisation. *38*(1), 47-59.
- Zhang, M., Swarts, S. G., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y., . . . Zhang, K. (2011). Antioxidant properties of quercetin. In *Oxygen transport to tissue XXXII* (pp. 283-289): Springer.
- Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X., & Zou, G. J. J. o. A. P. S. (2008). Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin- loaded chitosan nanoparticles. *107*(2), 891-897.
- Zielinska, D., Szawara-Nowak, D., Zielinski, H. J. P. j. o. f., & sciences, n. (2010). Determination of the antioxidant activity of rutin and its contribution to the antioxidant capacity of diversified buckwheat origin material by updated analytical strategies. *60*(4).

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1. Tablas de composición.

Tabla 9. Composición promedio del lactosuero de queso de la elaboración de queso Panela.

Componente	Contenido
Lactosa (g / 100 mL)	3.617 ± 0.124
Proteína (g / 100 mL)	2.52 ± 0.091
Sales (g / 100 mL)	0.63 ± 0.056
Densidad (Kg / m ³)	1024.77 ± 0.843
pH	6.65 ± 0.044
Sólidos no grasos (g / 100 mL)	6.77 ± 0.23
Sólidos (°Brix)	7.97 ± 0.81

Composición de lactosuero descremado de la fabricación de queso panela

10.2 Anexo 2. Curvas de calibración

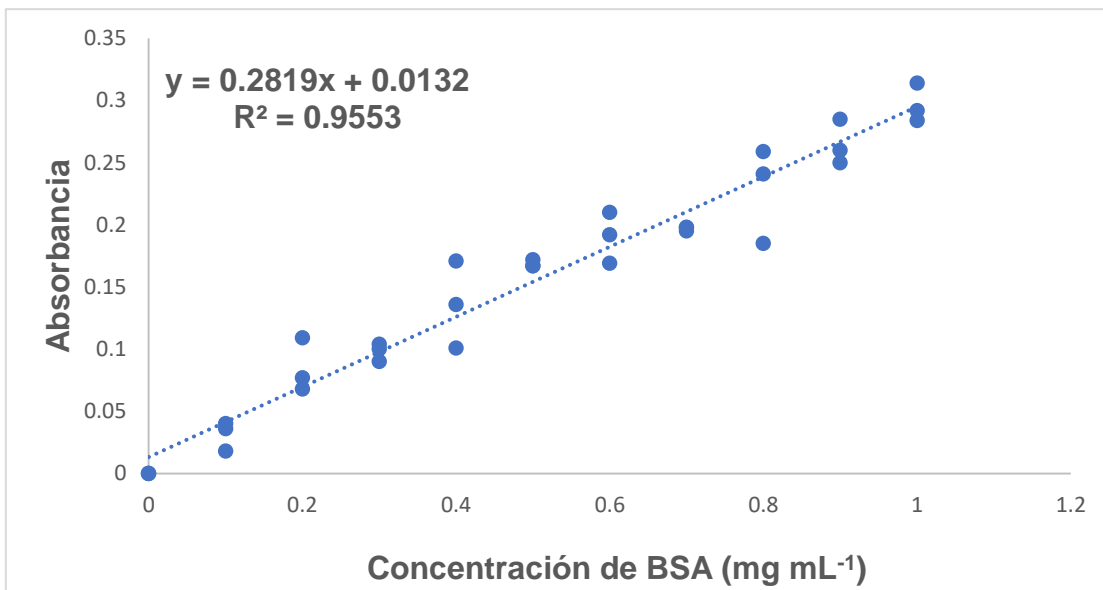


Figura 26. Curva de calibración construida a partir de concentraciones de BSA conocidas para la cuantificación de proteínas.

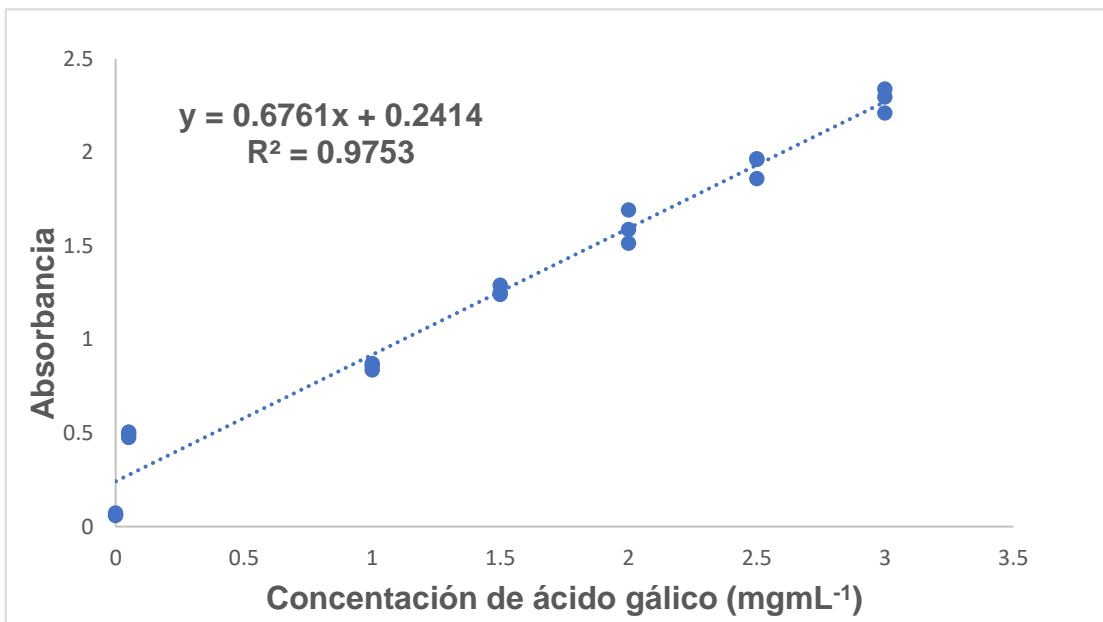


Figura 27. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

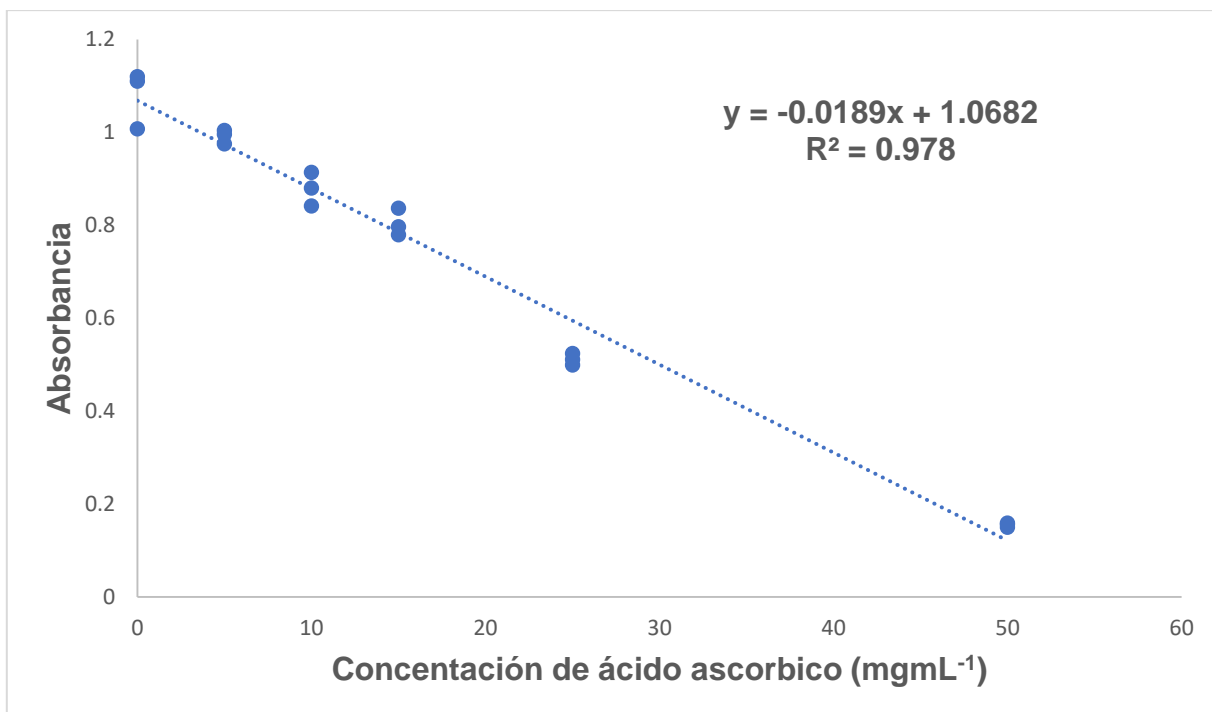


Figura 28. Curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de ácido ascórbico para actividad antioxidante.

10.3 Anexo 3. Análisis estadístico

10.3.1 Análisis estadístico de seguimiento de cristalización Etapa 1

10.3.1.1 Modelo lineal general: Max. Δ abs vs. pH, Tipo de Cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	3.4406	3.4406	96.37	0.000
Tipo de cristalización	1	14.7450	14.7450	413.02	0.000
pH*Tipo de cristalización	1	0.0001	0.0001	0.00	0.965
Error	20	0.7140	0.0357		
Total	23	19.0033			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.188946	96.24%	95.68%	94.23%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	1.5110	0.0391	38.63	0.000	
pH					
3.8	0.3840	0.0391	9.82	0.000	1.03
Tipo de cristalización					
Espontanea	-0.7949	0.0391	-20.32	0.000	1.00
pH*Tipo de cristalización					
3.8 Espontanea	0.0017	0.0391	0.04	0.965	1.03

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 a = & 1.5110 + 0.3840 \text{ pH}_{3.8} - 0.3840 \text{ pH}_{6.9} - 0.7949 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Espontanea}} \\
 & + 0.7949 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Inducida}} + 0.0017 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{3.8} \\
 & \text{Espontanea} - 0.0017 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{3.8} \text{ Inducida} \\
 & - 0.0017 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{6.9} \text{ Espontanea} \\
 & + 0.0017 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{6.9} \text{ Inducida}
 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	a	Ajuste	Resid	Resid est.
1	3.1228	2.6882	0.4346	2.57 R

Comparaciones para Max. Δ abs

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
3.8	12	1.89496	A
6.9	12	1.12696	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de Cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	10	2.30590	A
Espontanea	14	0.71602	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de Cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
3.8 Inducida	5	2.68818	A
6.9 Inducida	5	1.92362	B
3.8 Espontanea	7	1.10174	C
6.9 Espontanea	7	0.33030	D

10.3.1.2 Modelo lineal general: k vs. pH, Tipo de Cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	276.8	276.79	5.35	0.031
Tipo de cristalización	1	1401.0	1400.97	27.08	0.000

pH*Tipo de cristalización	1	254.4	254.42	4.92	0.038
Error	20	1034.6	51.73		
Total	23	2891.0			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.19230	64.21%	58.85%	44.08%

Coefficientes

Término	Coef	EE del		Valor T	Valor p	FIV
		Coef	coef.			
Constante	8.09	1.49		5.43	0.000	
pH						
3.8	3.44	1.49		2.31	0.031	1.03
Tipo de cristalización						
Espontanea	-7.75	1.49		-5.20	0.000	1.00
pH*Tipo de cristalización						
3.8 Espontanea	-3.30	1.49		-2.22	0.038	1.03

Ecuación de regresión

$k = 8.09 + 3.44 \text{ pH}_{3.8} - 3.44 \text{ pH}_{6.9} - 7.75 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Espontanea}}$
 $+ 7.75 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Inducida}} - 3.30 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{3.8 \text{ Espontanea}}$
 $+ 3.30 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{3.8 \text{ Inducida}} + 3.30 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{6.9 \text{ Espontanea}}$
 $- 3.30 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{6.9 \text{ Inducida}}$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	k	Ajuste	Resid	Resid est.
5	39.22	22.58	16.64	2.59 R
7	29.76	9.09	20.67	3.21 R

Residuo grande R

Comparaciones para k

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
3.8	12	11.5298	A
6.9	12	4.6415	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de Cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de Cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	10	15.8343	A
Espontanea	14	0.3370	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de Cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
3.8 Inducida	5	22.5806	A
6.9 Inducida	5	9.0880	B
3.8 Espontanea	7	0.4791	B
6.9 Espontanea	7	0.1949	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

10.3.1.3 Modelo lineal general: T₀ tiempo de inducción vs. pH, Tipo de Cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles Valores
pH	Fijo	2 3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2 Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	36.4638	36.4638	22.30	0.000
Tipo de cristalización	1	0.5719	0.5719	0.35	0.561
pH*Tipo de cristalización	1	9.0246	9.0246	5.52	0.029
Error	20	32.7059	1.6353		
Total	23	86.2854			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.27879	62.10%	56.41%	47.47%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0.608	0.265	2.30	0.033	
pH					
3.8	-1.250	0.265	-4.72	0.000	1.03
Tipo de cristalización					
Espontanea	-0.157	0.265	-0.59	0.561	1.00
pH*Tipo de cristalización					
3.8 Espontanea	-0.622	0.265	-2.35	0.029	1.03

Ecuación de regresión

$$T0 = 0.608 - 1.250 \text{ pH}_{3.8} + 1.250 \text{ pH}_{6.9} - 0.157 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Espontanea}} + 0.157 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Inducida}} - 0.622 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{3.8 \text{ Espontanea}} + 0.622 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{3.8 \text{ Inducida}} + 0.622 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{6.9 \text{ Espontanea}} - 0.622 \text{ pH} * \text{Tipo de Cristalización}_{6.9 \text{ Inducida}}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	T0	Ajuste	Resid	Resid est.
18	5.567	2.324	3.243	2.74 R

Residuo grande R

Comparaciones para T₀ tiempo de inducción.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	12	1.85827	A
3.8	12	-0.64192	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de Cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	10	0.764734	A
Espontanea	14	0.451619	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Espontanea	7	2.32362	A
6.9 Inducida	5	1.39292	A B
3.8 Inducida	5	0.13655	B C
3.8 Espontanea	7	-1.42038	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

10.3.1.4 Modelo lineal general: T_c (tiempo medio de cristalización) vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles Valores
pH	Fijo	2 3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2 Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	196.91	196.913	112.05	0.000
Tipo de cristalización	1	284.13	284.132	161.68	0.000
pH*Tipo de cristalización	1	97.76	97.765	55.63	0.000
Error	20	35.15	1.757		
Total	23	669.95			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.32565	94.75%	93.97%	92.80%

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	4.592	0.274	16.73	0.000	
pH					
3.8	-2.905	0.274	-10.59	0.000	1.03
Tipo de cristalización					
Espontanea	3.490	0.274	12.72	0.000	1.00
pH*Tipo de cristalización					
3.8 Espontanea	-2.047	0.274	-7.46	0.000	1.03

Ecuación de regresión

T_c = 4.592 - 2.905 pH_{3.8} + 2.905 pH_{6.9} + 3.490 Tipo de Cristalización_Espontanea - 3.490 Tipo de Cristalización_Inducida - 2.047 pH*Tipo de Cristalización_3.8 Espontanea + 2.047 pH*Tipo de Cristalización_3.8 Inducida + 2.047 pH*Tipo de Cristalización_6.9 Espontanea - 2.047 pH*Tipo de Cristalización_6.9 Inducida

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	T _c	Ajuste	Resid	Resid est.
18	16.400	13.033	3.367	2.74 R
24	9.782	13.033	-3.251	-2.65 R

Residuo grande R

Comparaciones para Tc

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	12	7.49660	A
3.8	12	1.68656	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de Cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Espontanea	14	8.08115	A
Inducida	10	1.10201	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Espontanea	7	13.0331	A
3.8 Espontanea	7	3.1292	B
6.9 Inducida	5	1.9601	B C
3.8 Inducida	5	0.2439	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

10.3.1.5 Modelo lineal general: 2Tc vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	787.4	787.43	112.27	0.000
Tipo de cristalización	1	1136.3	1136.26	162.00	0.000

pH*Tipo de cristalización	1	390.9	390.90	55.73	0.000
Error	20	140.3	7.01		
Total	23	2678.8			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.64839	94.76%	93.98%	92.82%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	9.182	0.548	16.75	0.000	
pH					
3.8	-5.809	0.548	-10.60	0.000	1.03
Tipo de cristalización					
Espontanea	6.978	0.548	12.73	0.000	1.00
pH*Tipo de cristalización					
3.8 Espontanea	-4.093	0.548	-7.47	0.000	1.03

Ecuación de regresión

$$2Tc = 9.182 - 5.809 \text{ pH}_{3.8} + 5.809 \text{ pH}_{6.9} + 6.978 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Espontanea}} - 6.978 \text{ Tipo de Cristalización}_{\text{Inducida}} - 4.093 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{3.8 \text{ Espontanea}} + 4.093 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{3.8 \text{ Inducida}} + 4.093 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{6.9 \text{ Espontanea}} - 4.093 \text{ pH*Tipo de Cristalización}_{6.9 \text{ Inducida}}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	2Tc	Ajuste	Resid	Resid est.
18	32.78	26.06	6.71	2.74 R
24	19.56	26.06	-6.50	-2.65 R

Residuo grande R

Comparaciones para 2Tc

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	12	14.9916	A
3.8	12	3.3731	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Espontanea	14	16.1607	A
Inducida	10	2.2040	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Espontanea	7	26.0629	A
3.8 Espontanea	7	6.2584	B
6.9 Inducida	5	3.9202	B C
3.8 Inducida	5	0.4878	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

10.3.2 Análisis estadístico de seguimiento cristalización Etapa 2

10.3.2.1 ANOVA de un solo factor: a vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	2.1091	1.05453	16.01	0.002
Error	8	0.5271	0.06588		
Total	10	2.6361			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.256675	80.01%	75.01%	64.35%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero	5	2.688	0.299	(2.423, 2.953)
Suero-Quercetina	3	1.6766	0.1693	(1.3349, 2.0183)
Suero-Rutina	3	2.604	0.237	(2.262, 2.946)

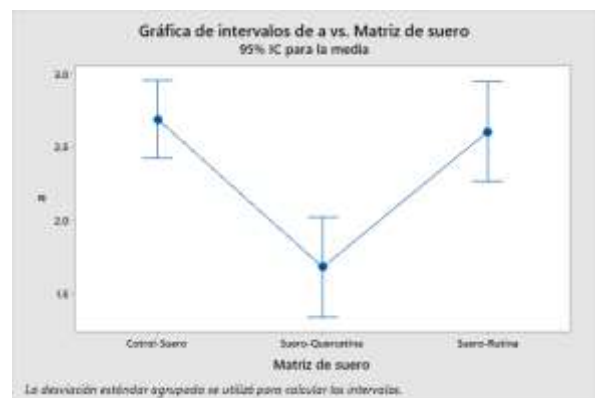
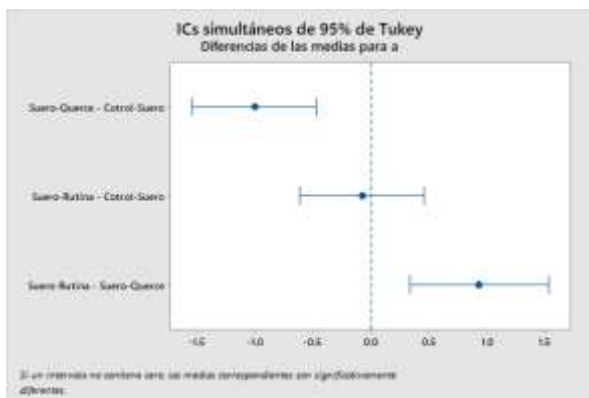
Desv.Est. agrupada = 0.256675

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Cotrol-Suero	5	2.688	A
Suero-Rutina	3	2.604	A
Suero-Quercetina	3	1.6766	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.2.2 ANOVA de un solo factor: k vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	283.5	141.75	1.94	0.206
Error	8	584.9	73.12		

Total 10 868.4

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
8.55080	32.64%	15.81%	0.00%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero	5	22.58	10.89	(13.76, 31.40)
Suero-Quercetina	3	11.95	5.22	(0.57, 23.34)
Suero-Rutina	3	12.86	5.30	(1.48, 24.24)

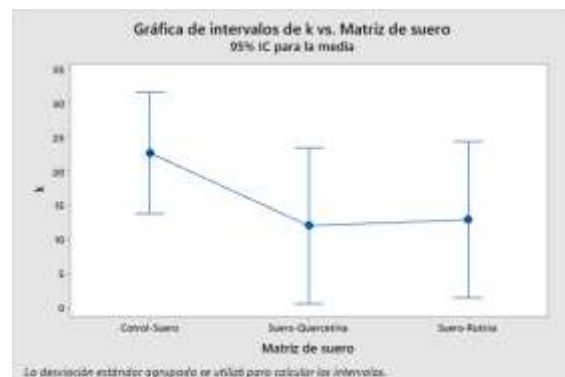
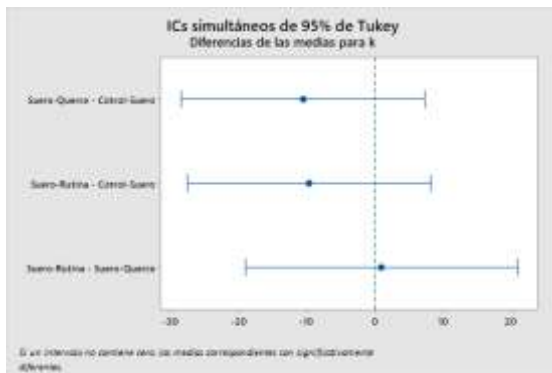
Desv.Est. agrupada = 8.55080

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Cotrol-Suero	5	22.58	A
Suero-Rutina	3	12.86	A
Suero-Quercetina	3	11.95	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.2.3 ANOVA de un solo factor: T0 vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	0.01005	0.005024	0.15	0.867
Error	8	0.27552	0.034440		
Total	10	0.28557			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.185581	3.52%	0.00%	0.00%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero	5	0.137	0.256	(-0.055, 0.328)
Suero-Quercetina	3	0.0681	0.0713	(-0.1790, 0.3151)
Suero-Rutina	3	0.0869	0.0432	(-0.1602, 0.3340)

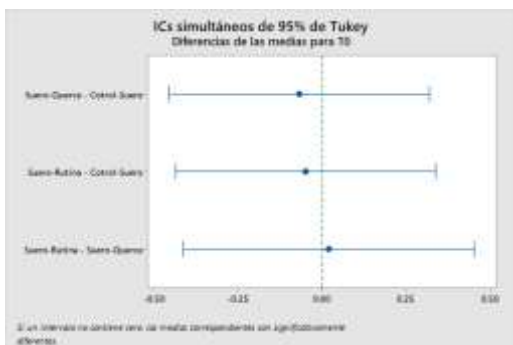
Desv.Est. agrupada = 0.185581

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Cotrol-Suero	5	0.137	A
Suero-Rutina	3	0.0869	A
Suero-Quercetina	3	0.0681	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.2.4 ANOVA de un solo factor: Tc vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	0.000762	0.000381	0.01	0.992
Error	8	0.377707	0.047213		
Total	10	0.378469			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.217286	0.20%	0.00%	0.00%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero	5	0.244	0.305	(0.020, 0.468)
Suero-Quercetina	3	0.2620	0.0395	(-0.0273, 0.5512)
Suero-Rutina	3	0.2590	0.0304	(-0.0303, 0.5483)

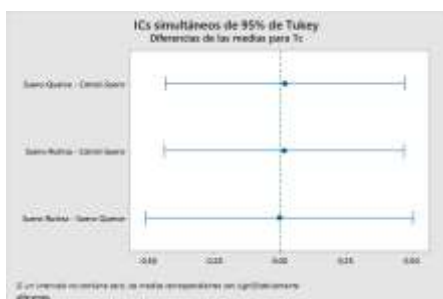
Desv.Est. agrupada = 0.217286

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Quercetina	3	0.2620	A
Suero-Rutina	3	0.2590	A
Cotrol-Suero	5	0.244	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.2.5 ANOVA de un solo factor: 2Tc vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	0.00305	0.001524	0.01	0.992
Error	8	1.51083	0.188853		
Total	10	1.51387			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.434573	0.20%	0.00%	0.00%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero	5	0.488	0.611	(0.040, 0.936)
Suero-Quercetina	3	0.5239	0.0790	(-0.0547, 1.1025)
Suero-Rutina	3	0.5181	0.0607	(-0.0605, 1.0967)

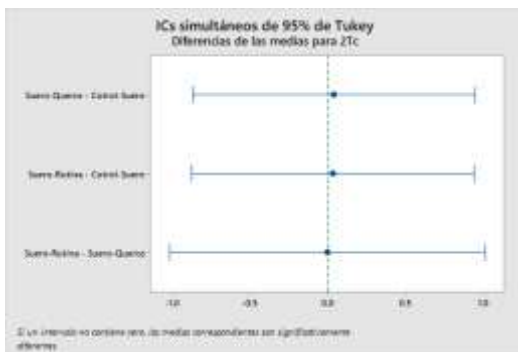
Desv.Est. agrupada = 0.434573

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Quercetina	3	0.5239	A
Suero-Rutina	3	0.5181	A
Cotrol-Suero	5	0.488	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.3 Análisis estadístico de composición de cristales y rendimiento Etapa1

10.3.3.1 Modelo lineal general: Rendimiento cristalización (%) vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	6.297	6.297	1.50	0.240
Tipo de cristalización	1	175.628	175.628	41.93	0.000
pH*Tipo de cristalización	1	179.633	179.633	42.88	0.000
Error	14	58.643	4.189		
Total	17	468.665			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.04666	87.49%	84.81%	81.53%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	29.088	0.512	56.85	0.000	
pH					
3.8	-0.627	0.512	-1.23	0.240	1.13
Tipo de cristalización					
Espontanea	-3.313	0.512	-6.48	0.000	1.00
pH*Tipo de cristalización					
3.8 Espontanea	3.351	0.512	6.55	0.000	1.13

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento cristalización (\%)} = & 29.088 - 0.627 \text{ pH}_{3.8} + 0.627 \text{ pH}_{6.9} \\ & - 3.313 \text{ Tipo de cristalización}_{\text{Espontanea}} \\ & + 3.313 \text{ Tipo de cristalización}_{\text{Inducida}} \\ & + 3.351 \text{ pH} * \text{Tipo de cristalización}_{3.8} \\ & \text{Espontanea} \\ & - 3.351 \text{ pH} * \text{Tipo de cristalización}_{3.8} \text{ Inducida} \\ & - 3.351 \text{ pH} * \text{Tipo de cristalización}_{6.9} \\ & \text{Espontanea} \\ & + 3.351 \text{ pH} * \text{Tipo de cristalización}_{6.9} \text{ Inducida} \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Rendimiento cristalización (%)	Ajuste	Resid	Resid est.
8	40.15	36.38	3.77	2.02 R

Residuo grande R

Comparaciones para Rendimiento cristalización (%)

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	9	29.7150	A
3.8	9	28.4604	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	12	32.4008	A
Espontanea	6	25.7746	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Inducida	6	36.3788	A
3.8 Espontanea	3	28.4980	B
3.8 Inducida	6	28.4228	B
6.9 Espontanea	3	23.0512	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

10.3.3.2 Modelo lineal general: Rendimiento de recuperación de lactosa (%) vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	0.09	0.085	0.01	0.939
Tipo de cristalización	1	563.47	563.465	40.54	0.000
pH*Tipo de cristalización	1	533.63	533.628	38.40	0.000
Error	14	194.57	13.898		
Total	17	1363.52			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.72800	85.73%	82.67%	78.64%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	52.049	0.932	55.85	0.000	
pH 3.8	-0.073	0.932	-0.08	0.939	1.13
Tipo de cristalización Espontanea	-5.934	0.932	-6.37	0.000	1.00
pH*Tipo de cristalización 3.8 Espontanea	5.775	0.932	6.20	0.000	1.13

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned} \text{Ren.d recuperacion de lac (\%)} = & 52.049 - 0.073 \text{ pH}_{3.8} + 0.073 \text{ pH}_{6.9} \\ & - 5.934 \text{ Tipo de cristalización_Espontanea} \\ & + 5.934 \text{ Tipo de cristalización_Inducida} \\ & + 5.775 \text{ pH*Tipo de cristalización_3.8} \\ & \text{Espontanea} \\ & - 5.775 \text{ pH*Tipo de cristalización_3.8 Inducida} \\ & - 5.775 \text{ pH*Tipo de cristalización_6.9} \\ & \text{Espontanea} \\ & + 5.775 \text{ pH*Tipo de cristalización_6.9 Inducida} \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Ren.d recuperacion de lac (%)	Ajuste	Resid	Resid est.
12	56.89	63.83	-6.94	-2.04 R

Comparaciones para Rendimiento de recuperación de lactosa (%)

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	9	52.1216	A
3.8	9	51.9756	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	12	57.9829	A
Espontanea	6	46.1142	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Inducida	6	63.8311	A
3.8 Inducida	6	52.1348	B
3.8 Espontanea	3	51.8163	B

6.9 Espontanea 3 40.4122 C

10.3.3.3 Modelo lineal general: g de Lactosa en 100 g de crista vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	57.5559	57.5559	47.50	0.000
Tipo de cristalización	1	0.8442	0.8442	0.70	0.418
pH*Tipo de cristalización	1	1.1708	1.1708	0.97	0.342
Error	14	16.9637	1.2117		
Total	17	90.0320			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.10077	81.16%	77.12%	69.19%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	95.467	0.275	346.91	0.000	
pH 3.8	1.897	0.275	6.89	0.000	1.13
Tipo de cristalización Espontanea	-0.230	0.275	-0.83	0.418	1.00
pH*Tipo de cristalización 3.8 Espontanea	-0.271	0.275	-0.98	0.342	1.13

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \text{g de Lactosa en 100 g de crista} &= 95.467 + 1.897 \text{ pH}_{3.8} - 1.897 \text{ pH}_{6.9} \\
 &- 0.230 \text{ Tipo de cristalización}_{\text{Espontanea}} \\
 &+ 0.230 \text{ Tipo de cristalización}_{\text{Inducida}} \\
 &- 0.271 \text{ pH} \times \text{Tipo de cristalización}_{3.8 \text{ Espontanea}} \\
 &+ 0.271 \text{ pH} \times \text{Tipo de cristalización}_{3.8 \text{ Inducida}} \\
 &+ 0.271 \text{ pH} \times \text{Tipo de cristalización}_{6.9 \text{ Espontanea}} \\
 &- 0.271 \text{ pH} \times \text{Tipo de cristalización}_{6.9 \text{ Inducida}}
 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	g de Lactosa en 100 g de crista	Ajuste	Resid	Resid est.
11	95.645	93.530	2.116	2.11 R

Residuo grande R

Comparaciones para g de Lactosa en 100 g de crista

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
3.8	9	97.3639	A
6.9	9	93.5706	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	12	95.6969	A
Espontanea	6	95.2375	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
3.8 Inducida	6	97.8641	A
3.8 Espontanea	3	96.8637	A
6.9 Espontanea	3	93.6114	B
6.9 Inducida	6	93.5298	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Modelo lineal general: g de proteína en 100 g de crist vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	9.972	9.9721	29.10	0.000
Tipo de cristalización	1	2.910	2.9098	8.49	0.011
pH*Tipo de cristalización	1	1.104	1.1040	3.22	0.094
Error	14	4.798	0.3427		
Total	17	22.656			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.585392	78.82%	74.29%	68.76%

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	1.122	0.146	7.66	0.000	
pH					
3.8	-0.789	0.146	-5.39	0.000	1.13
Tipo de cristalización					
Espontanea	-0.426	0.146	-2.91	0.011	1.00
pH*Tipo de cristalización					
3.8 Espontanea	0.263	0.146	1.79	0.094	1.13

Ecuación de regresión

g de proteína en 100 g de crist = 1.122 - 0.789 pH_3.8 + 0.789 pH_6.9
 - 0.426 Tipo de cristalización_Espontanea
 + 0.426 Tipo de cristalización_Inducida
 + 0.263 pH*Tipo de cristalización_3.8
 Espontanea
 - 0.263 pH*Tipo de cristalización_3.8 Inducida
 - 0.263 pH*Tipo de cristalización_6.9
 Espontanea
 + 0.263 pH*Tipo de cristalización_6.9 Inducida

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	g de proteína en 100 g de crist	Ajuste	Resid	Resid est.
7	3.753	2.600	1.153	2.16 R

Residuo grande R

HOJA DE TRABAJO 1

Comparaciones para g de proteína en 100 g de crist

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	9	1.91108	A
3.8	9	0.33215	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	12	1.54807	A
Espontanea	6	0.69516	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Inducida	6	2.60021	A
6.9 Espontanea	3	1.22195	B
3.8 Inducida	6	0.49592	B
3.8 Espontanea	3	0.16838	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

HOJA DE TRABAJO 1

Modelo lineal general: g de cenizas en 100 g de crista vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	14.5415	14.5415	16.78	0.001
Tipo de cristalización	1	10.7147	10.7147	12.36	0.003
pH*Tipo de cristalización	1	0.0011	0.0011	0.00	0.972
Error	14	12.1341	0.8667		
Total	17	39.3046			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.930980	69.13%	62.51%	45.26%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	2.967	0.233	12.75	0.000	
pH					
3.8	-0.953	0.233	-4.10	0.001	1.13
Tipo de cristalización					
Espontanea	0.818	0.233	3.52	0.003	1.00
pH*Tipo de cristalización					
3.8 Espontanea	0.008	0.233	0.04	0.972	1.13

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
\text{g de cenizas en 100 g de} &= 2.967 - 0.953 \text{ pH}_{3.8} + 0.953 \text{ pH}_{6.9} \\
\text{crista} &+ 0.818 \text{ Tipo de cristalización}_{\text{Espontanea}} \\
&- 0.818 \text{ Tipo de cristalización}_{\text{Inducida}} \\
&+ 0.008 \text{ pH*Tipo de cristalización}_{3.8} \\
&\text{Espontanea} \\
&- 0.008 \text{ pH*Tipo de cristalización}_{3.8} \text{ Inducida} \\
&- 0.008 \text{ pH*Tipo de cristalización}_{6.9} \\
&\text{Espontanea} \\
&+ 0.008 \text{ pH*Tipo de cristalización}_{6.9} \text{ Inducida}
\end{aligned}$$

HOJA DE TRABAJO 1

Comparaciones para g de cenizas en 100 g de cristal

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	9	3.92000	A
3.8	9	2.01333	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Esponanea	6	3.78500	A
Inducida	12	2.14833	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Espontanea	3	4.73000	A
6.9 Inducida	6	3.11000	A
3.8 Espontanea	3	2.84000	B
3.8 Inducida	6	1.18667	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

10.3.3.4 Modelo lineal general: g de agua en 100 g de cristal vs. pH, Tipo de cristalización

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
pH	Fijo	2	3.8, 6.9
Tipo de cristalización	Fijo	2	Espontanea, Inducida

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
pH	1	0.37868	0.378676	12.61	0.003
Tipo de cristalización	1	0.42081	0.420812	14.01	0.002
pH*Tipo de cristalización	1	0.00000	0.000004	0.00	0.991
Error	14	0.42037	0.030026		
Total	17	1.26626			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.173282	66.80%	59.69%	49.17%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0.4445	0.0433	10.26	0.000	
pH 3.8	-0.1538	0.0433	-3.55	0.003	1.13
Tipo de cristalización Espontanea	-0.1622	0.0433	-3.74	0.002	1.00
pH*Tipo de cristalización 3.8 Espontanea	-0.0005	0.0433	-0.01	0.991	1.13

Ecuación de regresión

g de agua en 100 g de cristal = 0.4445 - 0.1538 pH_3.8 + 0.1538 pH_6.9
 - 0.1622 Tipo de cristalización_Espontanea
 + 0.1622 Tipo de cristalización_Inducida
 - 0.0005 pH*Tipo de cristalización_3.8
 Espontanea
 + 0.0005 pH*Tipo de cristalización_3.8 Inducida
 + 0.0005 pH*Tipo de cristalización_6.9
 Espontanea
 - 0.0005 pH*Tipo de cristalización_6.9 Inducida

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	g de agua en 100 g de cristal	Ajuste	Resid	Resid est.
2	0.8300	0.4533	0.3767	2.38 R

Comparaciones para g de agua en 100 g de cristal

Comparaciones por parejas de Tukey: pH

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH	N	Media	Agrupación
6.9	9	0.598333	A
3.8	9	0.290650	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
Inducida	12	0.606667	A
Espontanea	6	0.282317	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones por parejas de Tukey: pH*Tipo de cristalización

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

pH*Tipo de cristalización	N	Media	Agrupación
6.9 Inducida	6	0.760000	A
3.8 Inducida	6	0.453333	B
6.9 Espontanea	3	0.436667	B
3.8 Espontanea	3	0.127967	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

10.3.4 Análisis estadístico de composición de cristales y rendimiento Etapa 2

10.3.4.1 ANOVA de un solo factor: g de Lactosa en 100 g de crista vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	0.9653	0.4827	0.53	0.607
Error	9	8.2203	0.9134		
Total	11	9.1856			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.955702	10.51%	0.00%	0.00%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero ácido	6	97.921	0.729	(97.038, 98.803)
Suero-Quercetina	3	97.946	1.321	(96.698, 99.194)
Suero-Rutina	3	97.275	1.018	(96.026, 98.523)

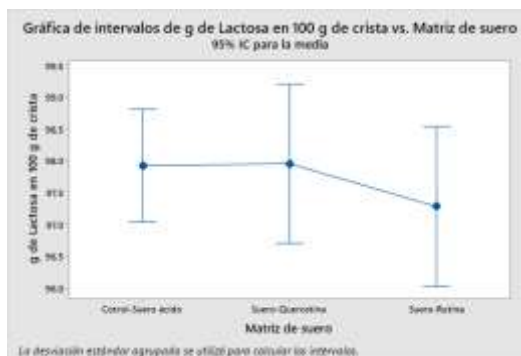
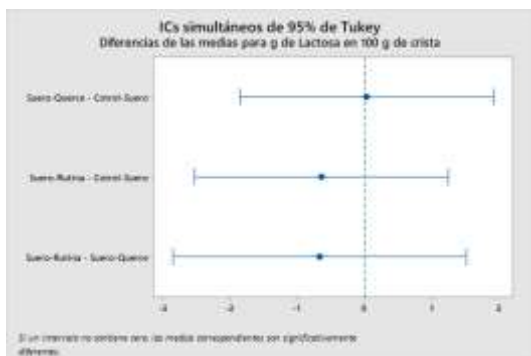
Desv.Est. agrupada = 0.955702

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Quercetina	3	97.946	A
Cotrol-Suero ácido	6	97.921	A
Suero-Rutina	3	97.275	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.4.2 ANOVA de un solo factor: g de proteína en 100 g de cristal vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	0.5499	0.27496	2.86	0.109
Error	9	0.8656	0.09618		
Total	11	1.4155			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.310130	38.85%	25.26%	11.66%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero ácido	6	0.496	0.415	(0.210, 0.782)
Suero-Quercetina	3	0.0856	0.0408	(-0.3194, 0.4907)
Suero-Rutina	3	0.0513	0.0289	(-0.3537, 0.4564)

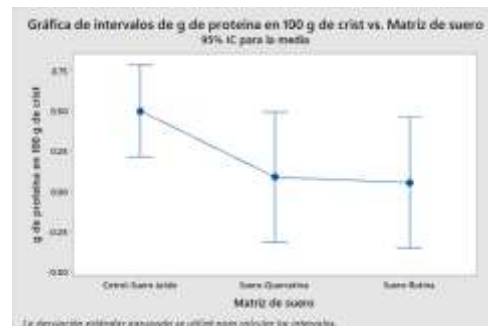
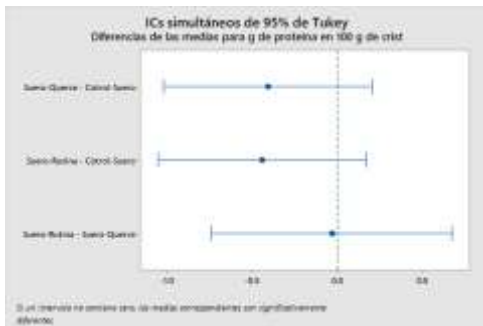
Desv.Est. agrupada = 0.310130

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Cotrol-Suero ácido	6	0.496	A
Suero-Quercetina	3	0.0856	A
Suero-Rutina	3	0.0513	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.4.3 ANOVA de un solo factor: g de cenizas en 100 g de crista vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	2.520	1.2598	1.35	0.307
Error	9	8.384	0.9316		
Total	11	10.904			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.965179	23.11%	6.02%	0.00%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero ácido	6	1.144	0.674	(0.253, 2.036)
Suero-Quercetina	3	1.808	1.339	(0.548, 3.069)
Suero-Rutina	3	2.219	1.124	(0.958, 3.479)

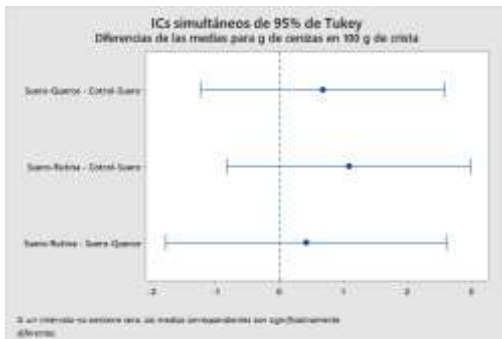
Desv.Est. agrupada = 0.965179

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Rutina	3	2.219	A
Suero-Quercetina	3	1.808	A
Cotrol-Suero ácido	6	1.144	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.4.4 ANOVA de un solo factor: g de agua en 100 g de cristal vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	0.1831	0.09153	2.63	0.126
Error	9	0.3126	0.03474		
Total	11	0.4957			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.186383	36.93%	22.91%	0.00%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero ácido	6	0.4391	0.2187	(0.2670, 0.6113)
Suero-Quercetina	3	0.1597	0.0264	(-0.0837, 0.4032)
Suero-Rutina	3	0.455	0.190	(0.212, 0.699)

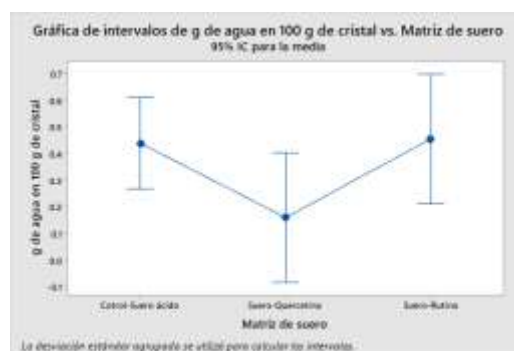
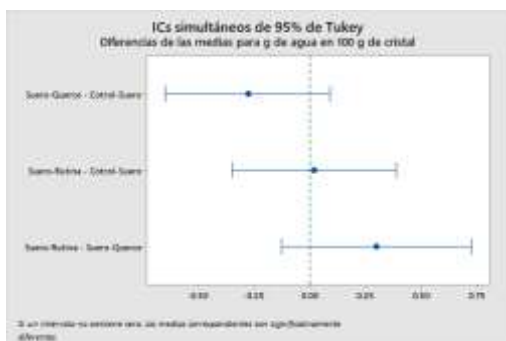
Desv.Est. agrupada = 0.186383

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Rutina	3	0.455	A
Cotrol-Suero ácido	6	0.4391	A
Suero-Quercetina	3	0.1597	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.4.5 ANOVA de un solo factor: Rendimiento cristalización (%) vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	55.47	27.733	10.06	0.005
Error	9	24.82	2.757		
Total	11	80.28			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.66050	69.09%	62.22%	43.80%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero ácido	6	28.423	1.627	(26.889, 29.956)
Suero-Quercetina	3	33.689	0.809	(31.520, 35.858)
Suero-Rutina	3	30.17	2.27	(28.00, 32.34)

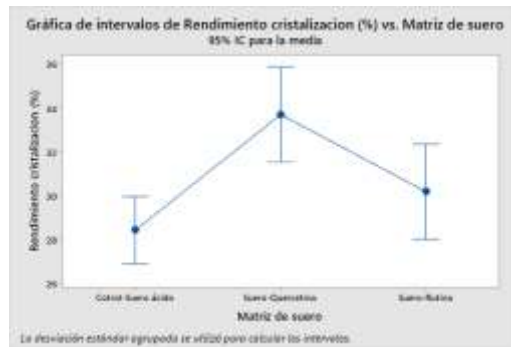
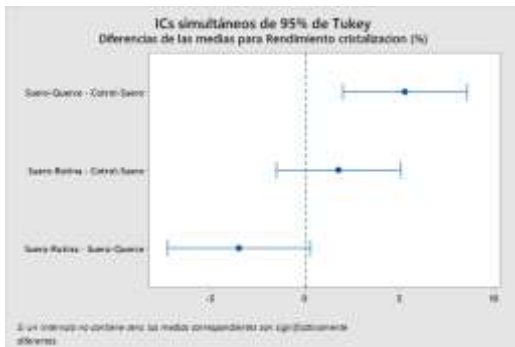
Desv.Est. agrupada = 1.66050

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Quercetina	3	33.689	A
Suero-Rutina	3	30.17	B
Cotrol-Suero ácido	6	28.423	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



ANOVA de un solo factor: Rendimiento de recuperación de lactosa (%) vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula: Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Control-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	189.50	94.748	11.12	0.004
Error	9	76.66	8.517		
Total	11	266.15			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.91846	71.20%	64.80%	46.34%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control-Suero ácido	6	52.13	2.71	(49.44, 54.83)
Suero-Quercetina	3	61.86	2.10	(58.05, 65.67)
Suero-Rutina	3	55.00	3.95	(51.19, 58.81)

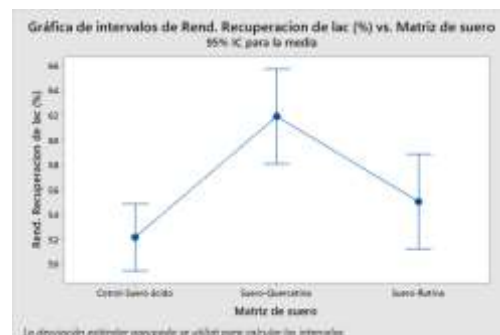
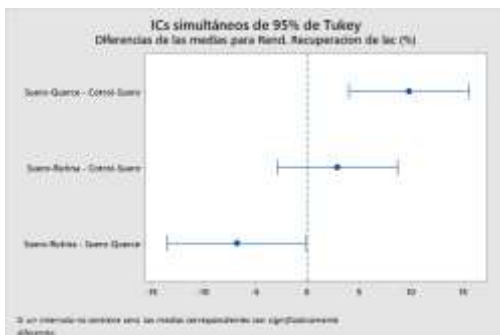
Desv.Est. agrupada = 2.91846

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Quercetina	3	61.86	A
Suero-Rutina	3	55.00	B
Control-Suero ácido	6	52.13	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



10.3.4.6 ANOVA de un solo factor: Rendimiento recuperación polifenol vs. Matriz de suero

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	13466	6733.2	15.40	0.001
Error	9	3936	437.3		
Total	11	17402			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
20.9126	77.38%	72.36%	49.11%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero ácido	6	0.000000	0.000000	(-19.313223, 19.313223)
Suero-Quercetina	3	75.7	21.9	(48.4, 103.0)
Suero-Rutina	3	55.1	38.6	(27.8, 82.4)

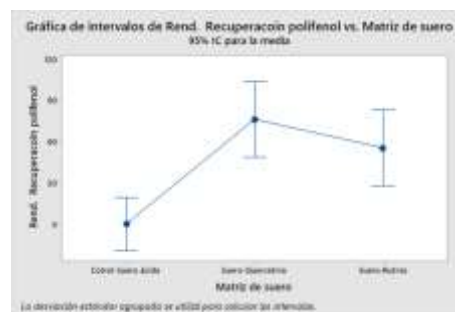
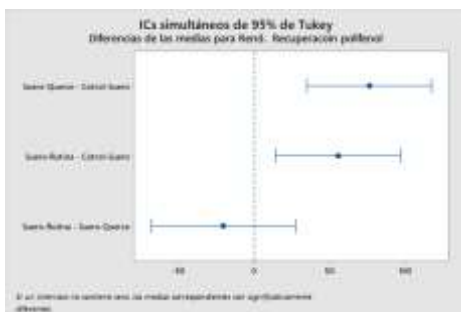
Desv.Est. agrupada = 20.9126

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Quercetina	3	75.7	A
Suero-Rutina	3	55.1	A
Cotrol-Suero ácido	6	0.000000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Matriz de suero

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Matriz de suero	3	Cotrol-Suero ácido, Suero-Quercetina, Suero-Rutina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Matriz de suero	2	0.03551	0.017757	12.12	0.003
Error	9	0.01318	0.001465		
Total	11	0.04870			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0382742	72.93%	66.91%	39.09%

Medias

Matriz de suero	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Cotrol-Suero ácido	6	0.000000	0.000000	(-0.035347, 0.035347)
Suero-Quercetina	3	0.1201	0.0369	(0.0701, 0.1701)
Suero-Rutina	3	0.0945	0.0723	(0.0445, 0.1445)

Desv.Est. agrupada = 0.0382742

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Matriz de suero	N	Media	Agrupación
Suero-Quercetina	3	0.1201	A
Suero-Rutina	3	0.0945	A
Cotrol-Suero ácido	6	0.000000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

