



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**DIAGRAMA DE ESTADO COMPLEMENTADO PARA
CARACTERIZAR LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y
ESTADOS FÍSICOS DE ESCAMOLES CONGELADOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

I.A. ALMA DE JESÚS FLORES RAMÍREZ

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. ALICIA GRAJALES LAGUNES

DIRECTOR

DR. MIGUEL ÁNGEL RUIZ CABRERA

Co-DIRECTOR

DR. JORGE ALBERTO RAMIREZ TELLES

ASESOR

PROYECTO REALIZADO EN:

Laboratorio de Ingeniería en Alimentos-CIEP y el Laboratorio de Ciencia de Alimentos e investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca número 524711 brindada para la realización de mis estudios de maestría. A Fundación Produce San Luis Potosí en colaboración con el proyecto de Ciencia Básica (CB-179490).

Agradecimientos académicos

A lo largo del desarrollo de este proyecto he tenido el apoyo de mis directores de tesis, la Dra. Alicia Grajales Lagunes y el Dr. Miguel Ángel Ruiz Cabrera, quienes me han dado las herramientas para finalizar satisfactoriamente este trabajo, además de ayudarme a desarrollar diversas capacidades que hasta el momento creía no poseer; sumando a que mi crecimiento no fue solo académico sino también personal.

A las personas que forman parte del laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, especialmente a la IA Cecilia Rivera Bautista, por brindarme su apoyo y consejos durante el tiempo de realización de este proyecto.

Agradecimientos personales

El crepúsculo de cualquier evento en la vida de cada ser humano conlleva cuestiones destacables, cada senda tiene obstáculos, recovecos oscuros, pero siempre hay un ángel caritativo que se conmueve de tu lamento, sacrificio y se alegra con tu felicidad. Para mí no solo hay uno sino varios ángeles que han estado ahí y haré lo posible para que así permanezcan.

Agradezco:

- A Dios, por permitirme llegar hasta este punto, por haberme dado salud para cumplir mis metas, además de su infinita bondad y amor.
- A mis padres (María del Refugio Ramírez Zapata y José Godofredo Flores Zavala), por depositar su confianza en mí, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, por la motivación constante, por mostrarme como salir adelante, por su ayuda incondicional y principalmente por su amor.
- A mis familiares por su apoyo y paciencia principalmente a Verónica Aidé Gaspar Ramírez que a pesar de no ser mi hermana me ha brindado el amor de una.
- A mis amigos Sara, Carlos, Orlando, Ruth y Miguel, por sus consejos, por su ayuda constante y paciencia al responder a todas mis dudas.
- A mis compañeros de laboratorio en especial a la M.C. Amneris Iraida Castillo Andrade por su ayuda brindada y consejo.
- A Valentina Rodríguez Gallegos por su apoyo, preocupación y motivación en mis ánimos y desánimos a lo largo de mi vida.
- Sin dejar de lado a una persona que me ha apoyado desde hace mucho tiempo y que al igual que mis familiares ha estado ahí para apoyarme la Dra. María Luisa Carrillo Inungaray agradezco tu tiempo y apoyo a lo largo de este trabajo.

No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus apoyos, su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de este logro se ha sentido menos. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, mi maravillosa familia.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE TABLAS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	I
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1. Consumo de insectos en el mundo.....	4
1.2. Escamoles (<i>Limetopum apiculatum</i> Mayr).....	5
1.2.1. Estudios realizados sobre la composición química, caracterización de biomoléculas, actividad proteolítica y métodos de conservación de escamoles.....	6
1.3. Procesos de conservación de alimentos basados en la disminución de la temperatura	9
1.3.1 Refrigeración.....	10
1.3.2. Sub enfriamiento.....	10
1.3.2.1 Grado de sub enfriamiento de alimentos.....	11
1.3.3 Congelación.....	12
1.4. Transición vítrea y diagramas de estado en sistemas alimentarios.....	13
1.4.1 Transiciones de fase y estado.....	13
1.4.2 Estado amorfo o vítreo.....	14
1.4.3 Transición vítrea.....	15
1.4.3.1 Importancia de la transición vítrea en la industria alimentaria.....	16
1.4.4 Diagramas de estado en sistemas alimentarios.....	16
1.4.4.1 Diagrama de estado complementado.....	17
1.4.4.2 Componentes de un diagrama de estado.....	18
1.4.4.2.1 Curva de fusión y/o congelación.....	18
1.4.4.2.2 Curva o línea de transición vítrea.....	19
1.4.4.2.3 Punto de máxima congelación-concentración.....	19
1.5 Determinación de los componentes de diagrama de estado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).	20
1.6 Modelación matemática de la curva Tg.....	23
1.7 Modelación matemática de la curva Tm.....	24
1.8 Uso de los diagramas de estado complementado en la industria de alimentos.....	25
1.9 Justificación.....	27
1.10 Hipótesis.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo general.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Recolección de escamoles.....	29
3.2 Análisis proximal de la composición química de los escamoles.....	29

3.3 Preparación de escamoles en estado anhidro	29
3.4 Preparación de escamoles con diferentes contenidos de humedad	30
3.4.1. Preparación de muestras con contenidos de humedad de 0 a 50% (b.h.)	30
3.4.2. Preparación de muestras con contenidos de humedades superiores a 50% (b.h.)..	30
3.5. Análisis termogravimétrico (TGA)	31
3.6. Análisis térmico por calorimetría diferencia de barrido (DSC).....	31
3.7. Modelado de las transiciones térmicas.....	33
3.8. Cálculo de la fracción másica de agua no congelable (xw').....	34
3.8. Almacenamiento de escamoles a diferentes temperaturas de congelación.	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1 Composición química del escamol (<i>liometopum apiculatum</i>)	36
4.2 Análisis termogravimétrico	37
4.3 Análisis térmico por DSC.....	38
4.3.1 Análisis calorimétrico del escamol fresco.....	38
4.3.2 Análisis calorimétrico del escamol liofilizado	40
4.3.3 Análisis calorimétrico de lípidos extraídos en escamol liofilizado	42
4.3.4 Análisis térmico en muestras de escamol con agua congelable.....	43
4.4 Variación de la temperatura de desnaturalización (Td2) en función del contenido de humedad en las muestras	49
4.5 Diagrama de estado	51
4.6 Cambios estructurales externos	57
5. CONCLUSIONES.....	60
6. BIBLIOGRAFIA.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.1	Escamoles (pupas de la especie <i>Liometopum apiculatum</i> M)	6
Figura 1.2	Curva de enfriamiento del agua pura y agua-solutos donde se observa las etapas del proceso de congelación.	12
Figura 1.3	Representación típica de un diagrama de estado complementado de un sistema alimentario. En donde se muestra la línea de transición vítrea Tg, curva de fusión/congelación Tm, en función de la concentración de solidos (xs). Tm' y Tg' limitan la zona máxima congelación-concentración, xs' fracción másica máxima a la que se puede congelar el agua.	17
Figura 1.4	Representación esquemática de un termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC).	21
Figura 1.5	Evolución del flujo de calor versus la temperatura medida con DSC en la zona de transición vítrea de un material amorfo.	22
Figura 4.1	Curvas TGA obtenidas para el escamol liofilizado (2.2% b.h.).	39
Figura 4.2	Termogramas DSC analizados para la determinación de Tm, Td1 y Td2 en escamoles frescos (72±0.09 % b.h).	40
Figura 4.3	Termogramas DSC analizados para la determinación de Tm, Tg y Td en escamoles liofilizados (2.2±0.009 % b.h).	41
Figura 4.4	Termogramas DSC analizados para la determinación de Tm de la fase lipídica extraída del escamol.	43
Figura 4.5	Termogramas DSC analizados para la determinación Tg', Tm' y Tm en escamoles preparados a diferentes contenidos de humedad congelable (% b.h.). (a) 25, (b) 31, (c) 38, (d), 48, (e) 50, (f), 55, (g) 75.	48
Figura 4.6	Termogramas DSC analizados para la determinación de Tm, Tg y Td2 en escamoles preparados con diferentes contenidos de agua no congelable (% b.h). (1) 4, (2) 5.8, (3) 10.	49
Figura 4.7	Variación de la temperatura de desnaturalización de proteína con el contenido de humedad (% b.h) en muestras de escamoles. (1) 4.04, (2) 5.4, (3) 10.9, (4)15, (5) 20.5, (6) 25, (7) 32.7, (8) 38.33.	50
Figura 4.8	Curva Tm en función de la fracción másica para fructosa, glucosa, sacarosa y escamol.	53
Figura 4.9	Diagrama de estado elaborado para la conservación y procesamiento del escamol.	56
Figura 4.10	Evaluación de los cambios estructurales externos en escamoles después de ser almacenado a -20°C, -35°C, y -80°C y posteriormente descongelados a 4°C.	59

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.1	Composición proximal de los escamoles recolectados en diferentes estados de la República Mexicana.	7
Tabla 4.1	Composición química proximal de escamol (<i>Liometopum apiculatum</i> M) % en base seca.	36
Tabla 4.2	Porcentaje de humedad del escamol fresco y liofilizado (% b.h.).	37
Tabla 4.3	Parámetros de la ecuación de Clausius-Clapeyron, ecuación de Gordon-Taylor y en la máxima concentración-congelación obtenidos para escamol <i>Liometopum apiculatum</i> .	55

RESUMEN

El estudio del punto de congelación (T_m) y la temperatura de transición vítrea (T_g) en función de la fracción másica del agua (x_w) o del sólido (x_s) ha recibido un interés considerable para la construcción de diagramas de estado complementarios (DEC) de diversos alimentos. Un DEC es un mapa de los diferentes estados de un alimento en función de la temperatura en todo el rango o escala de la fracción másica del sólido que es muy útil para desarrollar formulaciones, estrategias de procesamiento o las condiciones de almacenamiento para asegurar la estabilidad de alimentos que contienen agua congelable y no congelable. Una caracterización térmica mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) fue realizada en escamoles (*Liometopum apiculatum* M) frescos, deshidratados y acondicionados a diferentes contenidos de humedad, con el objetivo de desarrollar el diagrama de estado complementado de escamoles mediante la determinación de la curva de transición vítrea (T_g), curva de enfriamiento (T_m), así como del punto de concentración de máxima congelación (T_g' y T_m'), por (DSC), con el fin de caracterizar las condiciones de almacenamiento y estados físicos de escamoles congelados. Así mismo se determinaron las temperaturas de desnaturalización de enzimas (T_{d1}) y de proteínas (T_{d2}). Un calorímetro diferencial de barrido Q2000 (TA instrument) equipado con un sistema de enfriamiento RCS90 y el software Análisis 2000[©] fue utilizado en todos los experimentos. El método de escaneo convencional lineal y complementado con un procedimiento de “*annealing*” fue implementado para la determinación de dichas temperaturas. Tres transiciones térmicas de primer orden correspondientes a la fusión del complejo agua-fase grasa ($T_m=1.2^{\circ}\text{C}\pm 0.5$), a la desnaturalización de enzimas ($T_{d1}=62.5^{\circ}\text{C}\pm 3.9$) y desnaturalización de proteínas ($T_{d2}=126.5^{\circ}\text{C}\pm 5.3$) fueron observadas en escamoles frescos. Sin embargo, en escamoles liofilizados (2.2% b.h.), el pico (T_{d1}) no fue percibido pero una $T_g=61.6\pm 6.4^{\circ}\text{C}$ fue caracterizada. Los modelos de Gordon-Taylor y Clausius-Clapeyron fueron usados para modelar la curva T_g y la curva de congelación, respectivamente. Los resultados mostraron que pequeñas variaciones en el contenido de humedad provocaron una depresión en el valor de T_g y que el punto de congelación (T_m) disminuyó con el incremento de sólidos. A partir del diagrama de estado, fueron determinados los siguientes valores de $T_g'=-30.9^{\circ}\text{C}$, $T_m'=-22.7^{\circ}\text{C}$, $x_w'=0.0961$ kg agua/kg total. Así mismo, fue encontrado que la temperatura de desnaturalización de la proteína (T_{d2}) varió muy poco con el contenido de humedad de los escamoles.

ABSTRACT

The study of freezing point (T_m) and glass transition temperature (T_g) as a function of moisture (x_w) or solid mass fraction (x_s) have received considerable interest for the construction of supplemented state diagrams (SSD) of discriminatively food. A SSD is a map of the different states of food as function of temperature over the entire solid mass fraction scale which is so helpful to develop formulations, processing strategies or storage conditions to ensure the stability of food containing freezable and unfreezable water. A thermic characterization by differential scanning calorimetry (DSC) was performed in escamoles (*Liometopum apiculatum M*) fresh, dried and conditioned at different moisture contents; with the objective of developing a state diagram supplemented of escamoles by determining the glass transition curve (T_g) melting curve (T_m) and the maximal-freeze-concentration conditions (T_g' and T_m') by (DSC), for the purpose of characterize the storage conditions and physical states of frozen escamoles. Moreover denaturation enzyme temperatures (T_{d1}) and protein (T_{d2}) was determined. A Q2000 Differential Scanning Calorimeter (TA instruments) equipped with a RCS90 cooling system and Universal Analysis 2000[®] software was used in all experiments. A linear-scan conventional protocol was implemented for the determination of these temperatures and It was complemented with “annealing” for some experiments. Three thermal transition of first order was observed in fresh escamol; melting of water-fat ($1.2^{\circ}\text{C}\pm 0.5$), enzyme denaturation ($62.5^{\circ}\text{C}\pm 3.9$) and proteins denaturation ($126.5^{\circ}\text{C}\pm 5.3$). However, in lyophilized Escamoles (2.2% (b.h.)), peak (T_{d1}) was not perceived but $T_g = 61.6 \pm 6.4^{\circ}\text{C}$ was characterized. Gordon-Taylor and Clausius-Clapeyron methods were used to model the T_g line and freezing curve, respectively. Results shows that small amounts of moisture provoked a dramatic depression on the T_g meanwhile and T_m decreased as solid mass fraction was increased. The values of $T_g' = -30.9^{\circ}\text{C}$, $T_m' = -22.7^{\circ}\text{C}$ and $x_w' = 0.0961$ kg water / kg total were determined from the state diagram. Also, It was found that the temperature of protein denaturation (T_{d2}) varied little with the moisture content of Escamoles.

INTRODUCCIÓN

La entomofagia ha sido practicada desde la prehistoria en diversos lugares del mundo como un mecanismo para satisfacer las necesidades alimentarias y/o medicinales, destacándose el consumo de los insectos debido a sus características nutritivas y organolépticas.

En México, uno de los insectos de mayor consumo son los escamoles, que consisten en pupas o hueva de la hormiga reina de la especie *Liometopum apiculatum*, los cuales son recolectados en el periodo seco del año en los meses de febrero a abril. Los escamoles son considerados altamente nutritivos por su alto contenido de proteínas (% base seca) (37.36 ± 0.37), lípidos (22.26 ± 0.66), carbohidratos (37.54 ± 0.74) y algunas vitaminas del complejo B. No obstante, la principal desventaja de este producto es su rápido deterioro de alrededor de 5 días en condiciones de refrigeración a 4°C. Por tal motivo la congelación a -18°C ha sido propuesta como una alternativa para incrementar la vida de anaquel de este alimento. Pero se ha observado que al descongelar los escamoles, presentan una disminución en su capacidad de retención de agua aunado a la desnaturalización de proteínas. Así mismo, después de realizarles una curva de enfriamiento, se ha notado que no presentan un grado de sub-enfriamiento significativo, es decir, la diferencia entre el punto de nucleación y punto inicial de congelación es muy pequeña, induciendo la presencia de cristales de hielo de gran tamaño y como consecuencia se fomentan la desnaturalización de proteínas así como daños estructurales.

Por otro lado, un diagrama de estado complementado es un mapa de los diferentes estados físicos de un alimento en función de la temperatura considerando todo el rango de la fracción másica del agua o fracción másica sólida. Este debe contener información sobre estados de equilibrio como la curva de congelación (T_m vs. x_s), curva de solubilidad y estados de no equilibrio como la curva de transición vítrea (T_g vs. x_s), así como las temperaturas y concentración correspondiente de la solución concentrada en el punto de máxima congelación caracterizados por T_m' , T_g' , x_s' . Es importante recalcar que T_m' y T_g' , teóricamente deben ser independientes del contenido de agua para ser considerados como las temperaturas correspondientes de la solución concentrada en la máxima

congelación. Los diagramas de estados complementados han sido de gran utilidad para el desarrollo de formulaciones, estrategias o procedimientos para el procesamiento y almacenamiento para optimizar la estabilidad de alimentos y formulaciones farmacéuticas conteniendo agua congelable y no congelable.

Con respecto al almacenamiento de alimentos congelados, las temperaturas T_m' y T_g' , son los parámetros más importantes a ser considerados en los diagramas de estado complementados para fijar la temperatura del congelador. Por ejemplo, en la literatura se ha reportado que si la temperatura del congelador es establecida por encima de T_g' , pueden ocurrir modificaciones micro-estructurales afectando negativamente la calidad de los alimentos congelados. Estas modificaciones micro-estructurales pueden ser similares al proceso de recristalización observada cuando los productos congelados son sometidos a fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento y distribución. Un incremento en la temperatura promueve el fundido parcial y reducción de tamaño del cristal de hielo. Un re-enfriamiento adicional puede resultar en el crecimiento del cristal de hielo y en la disminución en el número de cristales de hielos. Estos cambios micro-estructurales pueden ser reducidos si la temperatura del congelador se establece por debajo de T_g' puesto que ha sido asumido que T_g' es el umbral de temperatura o temperatura de referencia para incrementar la estabilidad de los alimentos congelados.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha sido el método más utilizado para la construcción de diagramas de estado en sistemas alimentarios por ser una metodología rápida, por su aplicabilidad en alimentos con bajo y alto contenido de humedad y en un rango amplio de temperatura. Por tanto, diversos investigadores se han dado a la tarea de determinar los valores de T_m' , T_g' x_s' , para sistemas alimentario. Ha sido encontrado que el valor de T_g' , T_m' , x_s' y T_g son dependientes de la composición química del producto y que el valor de x_s' se encuentra alrededor de 0.8 y 0.9 y que los valores de T_g' reportados son muy por debajo de la temperatura de congelación (≈ -18 °C) utilizada en los procesos industriales.

Por tanto, es necesaria la determinación de algunos parámetros térmicos para una mejor comprensión de los cambios físicos inducidos en los escamoles durante la congelación y así proponer temperaturas adecuadas para su almacenamiento. Por lo tanto el objetivo de esta investigación consistió en desarrollar el diagrama de estado

complementado de escamoles mediante la determinación de la curva de transición vítrea, curva de enfriamiento así como del punto de concentración de máxima congelación por calorimetría diferencial de barrido (DSC), con el fin de caracterizar las condiciones de almacenamiento y estados físicos de escamoles congelados.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Consumo de insectos en el mundo

El crecimiento demográfico, la urbanización y el crecimiento de la clase media, han aumentado la demanda de alimentos a escala mundial, principalmente fuentes de proteína de origen animal (FAO, 2013). La FAO prevé que en el año 2030 se tendrá que alimentar a más de 9000 millones de personas, por lo cual es necesario encontrar fuentes alternativas de alimentos para satisfacer las necesidades de esta población. Los insectos constituyen la mayor diversidad en el planeta ya que forman 4/5 partes de las especies del reino animal, son un recurso renovable y los beneficios que proporcionan en la salud humana son diversos. Proporcionan nutrientes de alta calidad, ayudan a la digestibilidad y producen mayores cantidades de energía (Ramos-Elorduy *et al*, 1998; Sutton 1988; Jones y Madsen 1991).

De manera general, los insectos presentan un elevado contenido de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales los cuales varían de acuerdo a la especie, la etapa de vida, su hábitat y su dieta (Rumpold y Schlüter, 2013).

Debido a estos beneficios, la entomofagia o consumo de insectos se ha incrementado significativamente en diversos países como Australia, Indonesia, Venezuela, Colombia, Angola, Congo, donde algunas etnias utilizan a los insectos como su principal fuente de alimento. En países desarrollados como Francia, Japón, Estados Unidos y Holanda el consumo de insectos es por placer ya que estos son considerados como platillos exóticos.

En México la entomofagia existe desde la época prehispánica y se ha incrementado significativamente en los últimos años. En la actualidad los insectos son consumidos en restaurantes de alto prestigio de grandes ciudades donde son considerados como platillo típico o exótico. En la República Mexicana existen alrededor de 540 especies de insectos comestibles, los cuales son consumidos en cualquiera de sus estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa, ninfas o adultos. El mayor grupo son los *Coleópteros* (443 especies) que comprenden a los escarabajos y luciérnagas, seguido de los *Hymenópteros* (307 especies) a la cual pertenecen las abejas, avispas y las hormigas, los *Ortópteros* (235 especies) comprenden a los grillos y langostas y a los *Lepidópteros* (228 especies) pertenecen las mariposas y polillas (Costa-Neto, 2003; Ramos-Elorduy y Pino, 2006).

Sin embargo son pocas las especies que se comercializan, la venta de muchas especies de insectos comestibles se lleva a cabo de acuerdo a la época de abundancia de cada insecto, pero en general es durante la época de lluvias. Los insectos que tienen mayor comercialización son los gusanos blancos (*Aegiale hesperiaris*), y rojos (*Comadia redtembacheri*) del maguey, los chapulines (*Sphenarium mexicanum histrio* Gerstaecker), las chicatanas (*Atta mexicana* Smith, *Atta cephalotes*), las abejas sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana* Guérin) y los escamoles (*Liometopum apiculatum* Mayr).

El consumo de escamoles se ha ido incrementando significativamente, no solamente en zonas rurales (cultura indígenas) sino también en mercados y restaurantes de alto prestigio (tipo gourmet) de zonas urbanas de la parte centro y sur del país (San Luis Potosí, Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Oaxaca, Chiapas, Puebla y Veracruz) (Ramos-Elorduy, 2006).

1.2 Escamoles (*Liometopum apiculatum* Mayr)

Los escamoles son la pupa o huevo de la hormiga reina de la especie *Liometopum apiculatum* Mayr. La palabra escamol proviene del náhuatl azcatlmolli (escamoles, de *azcatl* - hormiga y *molli*-guisado) guisado de hormiga (Pino-Moreno, 2006; Ramos Elorduy *et al.*, 2001, 2007). Se caracterizan por tener un color amarillo aperlado similar al arroz, poseen una forma alargada con una longitud de 10 mm y con un diámetro de 3-5 mm (Figura 1.1) además de poseer un sabor dulce.

En la literatura los estudios reportados sobre esta especie, han sido enfocados a aspectos biogeográficos, a su valor nutritivo, a la caracterización de biomoléculas, y al desarrollo de métodos para su conservación. Estos resultados han proporcionado información valiosa acerca de su distribución geográfica, su estacionalidad y su comercialización, así como su composición química. De esta manera se conoce que los escamoles están distribuidos principalmente en los estados de México, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Zacatecas y San Luis Potosí. Su recolección es muy corta ya que únicamente se recolectan durante el periodo de febrero-abril y cada nido puede proveer hasta 2 kilogramos. Su comercialización se realiza en los restaurantes de prestigio del Distrito Federal y de los diferentes estados del país, es considerado “platillo gourmet” por su sabor especial y su precio. El kilogramo de este producto en el sector restauranero llega a valer

hasta \$3000.00. El platillo típico que se utiliza para su comercialización es “A la mantequilla” (Castillo-Lara y Aguirre-Rivera, 2008; Ramos-Elorduy *et al.* 2007).

1.2.1 Estudios realizados sobre la composición química, caracterización de biomoléculas, actividad proteolítica y métodos de conservación de escamoles

En la Tabla 1.1 se indica la composición química de los escamoles, reportados por diferentes autores. En esta Tabla se puede observar que a pesar de la variabilidad entre los componentes los escamoles presentan un alto valor nutritivo que los hace altamente competitivos con cualquier otro alimento.



Figura 1.1 Escamoles (pupas de la especie *Liometopum apiculatum M.*)

El contenido de aminoácidos, minerales y vitaminas de los escamoles también ha sido reportado en la literatura, por ello se sabe que estos presentan aminoácidos esenciales como metionina, valina, triptófano, minerales como calcio, potasio, sodio y vitaminas del complejo B (Ladrón de Guevara *et al.*, 1995; Ramos Elorduy *et al.*, 1998; 2007).

La composición química y las propiedades fisicoquímicas como pH y actividad de agua (*aw*) hacen que los escamoles sean altamente perecederos y que por lo tanto tengan, una corta vida de anaquel. Por ello, el trabajo realizado por Castillo Andrade *et al.*, (2015), fue enfocado en determinar la vida de anaquel de los escamoles en base a la actividad enzimática de diferentes tipos de proteasas y sobre los cambios estructurales durante el

almacenamiento. En dicho estudio se logró elucidar que la causa principal del deterioro de los escamoles es la elevada actividad proteolítica de las enzimas endógenas cisteína y serina (proteasas). Esta actividad enzimática conduce a una degradación de la estructura del escamol afectando directamente su calidad y por consecuencia la disminución de su vida de anaquel a 5 días a 4°C.

Tabla 1.1 Composición proximal de los escamoles recolectados en diferentes estados de la República Mexicana.

Componentes (%)				Autor
Proteínas	Carbohidratos	Grasas	Cenizas	
39.67	19.22	36.87	1.8	Ramos Elorduy (2001)*
31.41	21.60	33.27	5.27	Pino Moreno (2006)**
37.36±0.37	37.54±0.74	22.26±0.66	2.83±0.07	Ramírez García (2011)+

*Recolectados en el Estado de Puebla, ** recolectados en el Estado de México, + recolectados en el Estado de San Luis Potosí.

Recientemente el estudio realizado por García-Muñoz (2016), fue enfocado a caracterizar de manera específica el tipo de proteínas, ácidos grasos y carbohidratos presentes en los escamoles. 134 tipos de proteínas fueron identificadas y clasificadas en 11 grupos, de acuerdo a su función biológica: estructura celular (7%), transcripción y traducción (13%), metabolismo y producción de energía (18%), plegamiento y degradación de proteínas(19%), señalización celular (2%), actividad antioxidante (5%), transporte (3%), proceso de óxido-reducción (8%), otros procesos (14%), de función no clasificada (3%) y función desconocida (8%). Algunas de estas proteínas son enzimas y están involucradas en los diferentes procesos mencionados anteriormente.

Con respecto a los ácidos grasos identificados, fue reportado que el 66.96% corresponde a los ácidos grasos insaturados, dentro de los cuales los más predominantes fueron: ácido oleico (C18:1n-9cis) (56%), ácido linoleico (C18:2n-6cis) (4.2 %), ácido palmitoleico (C16:1 cis) (4%), ácido cis-11-eicosenoico (C20:1 cis) (0.73%), ácido linolénico (C18:3n-3cis) (0.612%). Los ácidos grasos saturados fueron reportados en menor proporción (31.4%) que los ácidos grasos insaturados, siendo los más predominantes el ácido palmítico (C16:0) (22.3%), el ácido esteárico (C18:0) (4.6%) y el ácido mirístico

(C14:0) (2.39%). De igual manera García-Muñoz (2016), reportó que los escamoles presentan un bajo contenido de colesterol 0.32mg/g valor inferior a lo reportado para alimentos convencionales como huevo y carne bovina.

En lo que concierne a la identificación de carbohidratos, la trealosa y la glucosa fueron los principales azúcares identificados. La glucosa fue reportada como el azúcar predominante en los escamoles (larva) pero cuando estos son convertidos en adultos la trealosa es sintetizada a partir de glucosa convirtiéndose así en el azúcar principal de los insectos adultos (Becker *et al.*, 1996).

Un estudio de modelado molecular de la trealosa en solución, sugiere que la este azúcar puede proteger a las macromoléculas contra la eliminación de agua durante la deshidratación o congelación (Donnamaria *et al.*, 1994) ayudando a la estabilidad de las biomoléculas e inhibiendo la desnaturalización irreversible. Su mecanismo protector puede ser dividido en dos teorías: remplazamiento de agua y la formación del estado amorfo o vítreo (Colaço y Roser, 1995).

La teoría de sustitución del agua propone que todas las macromoléculas biológicas normalmente se estabilizan por agua que forma enlaces de hidrógeno en torno a estas moléculas. La trealosa parece tener una mayor flexibilidad en el enlace glicosídico entre las dos moléculas de d-glucosa en comparación con otros disacáridos. Esta característica permite que la trealosa se conforme con los grupos polares irregulares de macromoléculas remplazando la interacción que existe de estas con el agua (Colaço y Roser, 1995) formando una capsula protectora alrededor de las biomoléculas.

Con respecto a la teoría vítrea, sugiere que este azúcar posee una mayor estabilidad porque al adicionar una pequeña cantidad de agua puede formar un dihidrato de trealosa en los bordes exteriores del estado vítreo (Crowe *et al.*, 1988). Esto puede resultar en una estructura que encierra la forma vítrea restante, aislándolo de los efectos destructivos de la cristalización. La capacidad de alternar entre las formas dihidrato y anhídrico es única para trealosa. Este carbohidrato controla de manera efectiva la actividad de agua en matrices complejas, tales como alimentos deshidratados o congelados (Richards *et al.*, 2002).

A la fecha, los únicos estudios realizados para incrementar la vida de anaquel de los escamoles fueron basados en utilizar el método de barreras y la esterilización térmica para el proceso de enlatado. El método de barreras consiste en una combinación de factores de

conservación que evitan la aplicación de uno solo en forma severa, lo cual mejora la calidad organoléptica y nutricional del alimento para así obtener un alimento “mínimamente procesado” de características similares a las del producto fresco. (Alzamora, 2002). Ramírez-García (2012), implementó el método de barreras en muestras de escamoles combinando los factores de a_w (0.90 y 0.95), pH (5 y 6.5) y tiempo de escaldado (10 y 15s), la combinación de 0.90, 5 y 10, a_w , pH, y tiempo de escaldado, respectivamente, permitió la conservación del producto hasta 45 días de almacenamiento a 4°C sin dañar las características fisicoquímicas y sensoriales del alimento.

La esterilización térmica durante el proceso de enlatado se basa en la utilización de una temperatura superior a 100°C y un tiempo determinado para destruir microorganismos e inactivar enzimas preservando así la seguridad y calidad de un alimento (Farkas, 2001). Por tal motivo Ruiz-Cabrera *et al.*, (2015), utilizaron este proceso como una alternativa para la conservación de escamoles, dos productos enlatados a base de escamoles en escabeche y salmuera fueron obtenidos con características nutritivas y sensoriales aceptadas por el consumidor con una vida de anaquel de 2 años.

La conservación de escamoles basada en la disminución de temperatura (refrigeración y congelación), también ha sido utilizada por los recolectores de escamoles, sin embargo, la temperatura de congelación utilizada (-10 y -20°C), no ha sido la adecuada para evitar los daños estructurales después del descongelamiento. En este sentido, a continuación se hace una revisión detallada sobre los procesos de conservación de alimentos basados en la disminución de la temperatura, así como el concepto de transición vítrea y diagramas de estado en sistemas alimentarios congelados, con la finalidad de comprender el proceso de congelación y la estabilidad del alimento.

1.3 Procesos de conservación de alimentos basados en la disminución de la temperatura

Los alimentos frescos, especialmente carnes, pescados, lácteos y vegetales, son productos altamente perecederos y requieren de procesos de conservación que incrementen su vida útil y reduzcan el riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos. En este contexto se han empleado diferentes métodos de conservación para el almacenamiento y distribución de productos alimenticios, basados principalmente en la disminución de temperatura. Los métodos más utilizados incluyen la refrigeración entre 0 y 4°C, el sub

enfriamiento entre -1 y -4°C y la congelación entre -18 y -40°C (Gallart-Jornet *et al.*, 2007). El uso de estos métodos no solamente garantiza una mayor diversidad de productos para el consumidor, si no también incrementa la estacionalidad y la distribución de los mismos fuera de su área de producción (Stonehouse y Evans, 2015).

1.3.1 Refrigeración

La refrigeración se basa en mantener la temperatura de los alimentos entre 0 y 14°C , con la finalidad de incrementar la vida útil de los alimentos frescos. El rango de temperatura más utilizado en la industria alimenticia ha sido entre 0 y 4°C . En este rango de temperatura el crecimiento microbiano ocurre de manera lenta y las reacciones de deterioro como la actividad enzimática son parcialmente inhibidas resultando así una extensión de la calidad de los alimentos. Sin embargo, a esta temperatura ninguna porción del agua contenida en el alimento cambia de estado líquido a estado sólido, por lo que sigue estando disponible para que las reacciones de deterioro se sigan llevando a cabo y finalmente se deteriore el producto. El tiempo de vida útil de los alimentos almacenados en refrigeración puede variar en el orden de días a semanas, debido a que es dependiente de la temperatura y de la composición química de los mismos. Con respecto a los escamoles ha sido observado que la vida de anaquel es de 5 días a 4°C , tiempo insuficiente para llevar a cabo su comercialización y consumo (Berk, 2013; Castillo-Andrade *et al.*, 20015).

1.3.2 Sub enfriamiento

El sub enfriamiento es una técnica utilizada en el procesamiento de alimentos para incrementar la vida de anaquel de los mismos. Este proceso, implica temperaturas en el límite entre la refrigeración y la congelación, es decir, que la temperatura del alimento se encuentra entre 1 y 2°C por debajo del punto de congelación inicial del producto sin que exista la formación de cristales de hielo (Stonehouse y Evans, 2015). En la literatura ha sido indicado que el punto de congelación inicial en la mayoría de los alimentos se encuentra entre -0.5°C y -2.8°C (Duun y Rustad, 2007). Por debajo de la temperatura del punto de congelación las reacciones enzimáticas y el crecimiento microbiano son más lentas que la de los alimentos refrigerados por lo que su vida útil se mantiene durante mayor tiempo, conservando sus características organolépticas similares a la de los alimentos frescos.

El alimento puede ser mantenido en este estado, a presión atmosférica siempre y cuando exista un control preciso de la temperatura para evitar la formación de cristales de hielo (Stonehouse y Evans, 2015).

El sub enfriamiento ha sido utilizado en alimentos de origen animal como carnes y pescado a -1.5 y -1°C respectivamente, sin provocar cambios estructurales u organolépticos (Jeremiah y Gibson, 2001; Cyprian *et al.*, 2012). En el caso particular del ajo, fue posible utilizar una temperatura de almacenamiento de -6.6°C debido a que su punto de congelación inicial fue de -2.9°C . A esta temperatura el ajo se mantuvo sin daños estructurales y fue muy similar a los ajos que fueron almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración a 1°C . Sin embargo, los ajos que fueron almacenados a -30°C presentaron daños estructurales importantes. Resultados similares fueron reportados en muestras de papas, es decir, efectos positivos fueron observados durante el almacenamiento a temperaturas de sub enfriamiento (Stonehouse y Evans, 2015).

1.3.2.1 Grado de sub enfriamiento de alimentos

El grado de sub enfriamiento se define como la diferencia entre el punto de nucleación y el punto de congelación (Figura 1.2). El punto de nucleación es la temperatura donde aparecen los primeros cristales de hielo en una solución, en algunas ocasiones se le conoce como punto de sobre-enfriamiento (super-cooling point, SCP) o temperatura de cristalización (Zachariassen y Kristiansen, 2000). La etapa de nucleación es definida como la formación de cristales y sucede ya sea en soluciones libres de cristales donde es llamada como nucleación primaria o en la presencia de cristales ya formados, donde es definida como nucleación secundaria. La nucleación primaria puede ser de dos tipos, homogénea si la solución no contiene partículas sólidas extrañas ni cristales o heterogénea, si tiene partículas presentes. La nucleación es acompañada por un incremento de la temperatura de la solución debido a la liberación del calor latente de cristalización hasta llegar al punto de inicial de congelación (Marthins y Lopes, 2007). Es importante mencionar que el grado de sub enfriamiento varía de un alimento a otro. Por ejemplo en frutas ha sido reportado que la variabilidad observada está relacionada con la concentración de $^{\circ}\text{Brix}$ ya que estos podrían reducir el punto inicial de congelación (Stonehouse y Evans, 2015).

Yin *et al.*, (2005) indicaron que resulta más difícil llevar a cabo el sub enfriamiento en alimentos sólidos que en líquidos, debido a que la estructura del alimento sólido

proporciona superficies para el desarrollo de los cristales de hielo, o bien podría inhibir el intercambio de calor por conducción. Por lo tanto el grado de sub enfriamiento alcanzado dependerá del tipo de alimento y de sus constituyentes. En el caso de los escamoles, fue encontrado que el grado de sub enfriamiento fue muy pequeño y por lo tanto el método de sub-enfriamiento para su conservación, puede ser inadecuado.

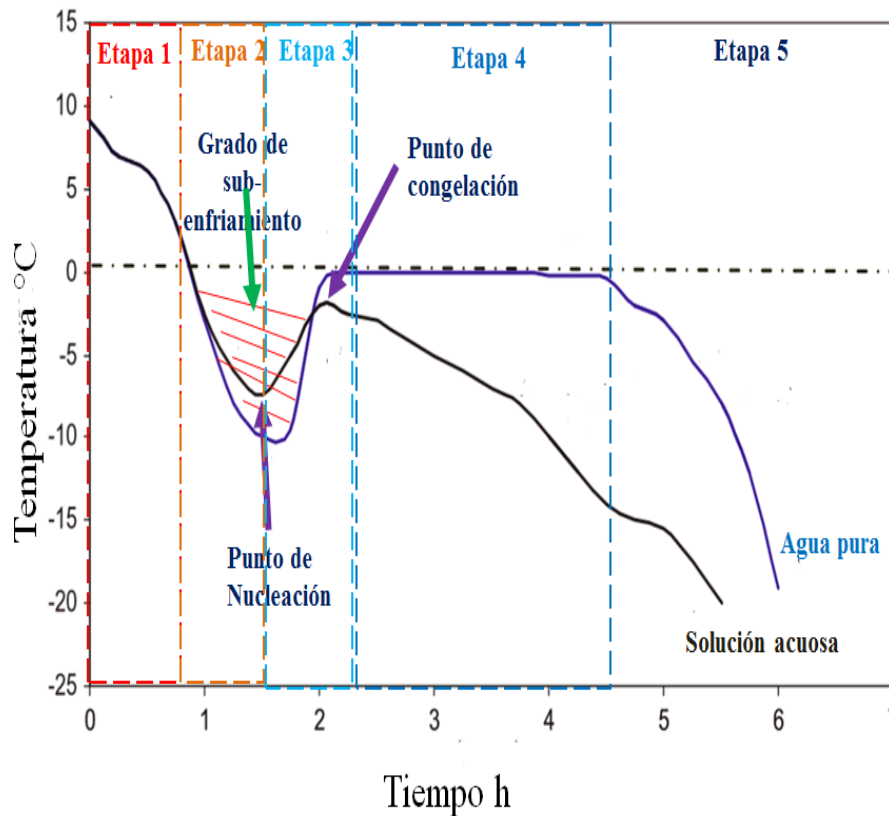


Figura 1.2 Curva de enfriamiento del agua pura y agua-solutos donde se observa las etapas del proceso de congelación (Marella y Muthukumarappan, 2013).

1.3.3 Congelación

La congelación en la industria alimentaria, ha sido considerada como el mejor método de preservación de alimentos, debido a que estos pueden alcanzar una vida útil de meses e incluso hasta años dependiendo de la temperatura utilizada. La temperatura de congelación comúnmente utilizada en la industria oscila entre -18 y -40°C, siendo la mas utilizada -20°C. Generalmente estas temperaturas suelen ser seleccionadas en base al equipo disponible y a las buenas prácticas sin contar con ninguna evidencia científica. Ha

sido considerado que la congelación lenta incrementa el tamaño de cristal provocando daños significativos en la estructura de los mismos. Sin embargo, si la congelación es rápida, el tamaño del cristal de hielo disminuye y proporciona una mejor retención de la calidad de los alimentos. Los principales cambios de los alimentos congelados durante el almacenamiento son las reacciones enzimáticas y de oxidación, que afectan la calidad del producto. Otro problema importante que puede surgir en los alimentos congelados es la re-cristalización del hielo cuando existen fluctuaciones de temperatura y/o presencia de agua libre no congelado (Slade y Levine, 1989; Hartel, 2001; Syamaladevi *et al.*, 2012). En la literatura se ha propuesto que para disminuir los fenómenos de re-cristalización del hielo, los fenómenos difusivos, los cambios micro-estructurales e incrementar la estabilidad de los alimentos, estos deben ser congelados a una temperatura menor a la temperatura de transición vítrea (T_g'), puesto que se ha hipotetizado que es la temperatura de referencia para incrementar la estabilidad de los alimentos congelados.

El concepto de transición vítrea y la obtención de diagramas de estado a diferentes contenidos de humedad de diferentes alimentos y sistemas modelo han sido reportados en la literatura con la finalidad de incrementar la estabilidad de los alimentos congelados y deshidratados (Wang *et al.*, 2008; Ruiz Cabrera y Schmitt, 2015).

1.4 Transición vítrea y diagramas de estado en sistemas alimentarios

1.4.1 Transiciones de fase y estado

Los alimentos y materiales biológicos son sistemas multicomponentes y/o multifásicos cuyo estado físico es usualmente gobernado por las transiciones térmicas de sus principales componentes, ya que pueden experimentar cambios de fase y estado en intervalos amplios de temperatura o presión cuando son procesados, almacenados y/o consumidos (Roos, 1995; Lebail *et al.*, 2003). En alimentos frescos, el agua puede existir en los tres estados físicos básicos, gobernando diversos efectos sobre las propiedades físicas así como su comportamiento, procesamiento, estabilidad microbiana y bioquímica y transición de fase de los productos (Roos, 1995b; Lebail *et al.*, 2003). Debido a esto los alimentos frescos se conservan mediante congelación, deshidratación y concentración ya que se basan en la solidificación y ebullición del agua, sin tomar en cuenta el resto de los componentes.

En el caso de alimentos de humedad intermedia o reducida (concentrados y deshidratados), las transiciones de fase o estado de azúcares, lípidos y proteínas desempeñan un papel importante en las propiedades físicas de estos productos. Los alimentos con alto contenido de sólidos han sido referidos a mezclas de almidón, azúcares y gelatinas, los cuales son usados para conferir diferentes propiedades como textura, estabilidad, procesamiento así como una sensación agradable al paladar (Yu y Li, 2012; Kasapis, 2006). Dependiendo de las condiciones de proceso, los componentes en los alimentos se encuentran en estado amorfo (vítreo), parcialmente vítreo o totalmente cristalino (Lubbers y Guichard, 2003). En sistemas parcialmente vítreo/cristalino, transiciones bifásicas determinan sus propiedades estructurales, principalmente la cristalización/fusión a la temperatura de fusión o la vitrificación-ablandamiento a la temperatura de transición vítrea (Miguel y Hall, 2002).

1.4.2 Estado amorfo o vítreo

El término “estado amorfo o vítreo” es utilizado para describir a una clase de materiales que exhiben cierta fragilidad, alta resistencia, son transparentes y presentan baja movilidad molecular. Un material vítreo se ha definido como un líquido que ha perdido su habilidad de fluir (Kasapis, 2006). Este tipo de material también ha sido definido como un líquido sub-enfriado cuya viscosidad se encuentra entre 10^{12} y 10^{13} Pa*s, el cual se comporta como un sólido, pero con la habilidad de soportar su propio peso sin fluir debido a la gravedad (Angell, 1988). El estado vítreo también es referido como un estado meta-estable cuyas moléculas tienen una estructura desordenada y el volumen de este sistema es más grande que el del sistema cristalino, los cuales contienen la misma composición química (Roos, 1995; Slade y Levine, 1988).

La estructura de un sólido amorfo ha sido descrita tomando como referencia la estructura de un sólido cristalino, el cual tiene un arreglo molecular bien organizado (Schenz, 1995; Liu *et al.*, 2006; Rahman, 2010). A pesar que en el sólido amorfo el arreglo estructural es desordenado, en algunas zonas puede tener un orden molecular similar al de la estructura cristalina, sin embargo este orden similar solo se presenta en dimensiones moleculares y del orden de los angstroms (Liu *et al.*, 2006).

Los sólidos amorfos presentan una movilidad molecular reducida y con fenómenos de difusión limitados debido a su alta viscosidad (Rhaman, 2010; Ribeiro *et al.*, 2003;

Santivarangkna *et al.*, 2011). Sus movimientos moleculares están restringidos a vibraciones y movimientos rotacionales de corto alcance (Liu *et al.*, 2006). Es importante resaltar que los cambios que ocurren en el estado amorfo son extremadamente lentos y habitualmente son referidos como envejecimiento físico.

El desarrollo de una estructura amorfa puede resultar de un proceso de fusión, desnaturalización, gelatinización, tratamiento mecánico, remoción rápida de un solvente, y despolimerización de estructura compleja. Los procesos de conservación que inducen a los alimentos a un estado amorfo incluyen el secado, como el secado por aspersión, el secado con aire caliente y la liofilización, la congelación, y la extrusión entre otros.

En principio, todos los fluidos y materiales fundidos pueden ser convertidos en matrices amorfas, si la velocidad de enfriamiento es lo suficientemente rápida y el material no cristaliza durante el proceso (Sablani *et al.*, 2010; Rahman, 2010).

1.4.3 Transición vítrea

La transición vítrea, es una transición de segundo orden entre el estado amorfo y caucho (o viceversa), la cual es dependiente del tiempo, humedad y temperatura (Rahman, 2010; Sablani *et al.*, 2010). La temperatura a la cual el sistema experimenta la transición se le conoce como temperatura de transición vítrea o Tg, es decir, la temperatura a la cual un sistema amorfo cambia, desde un estado vítreo a un estado caucho. El estado vítreo se caracteriza por la discontinuidad en las propiedades físicas, mecánicas, eléctricas y las propiedades térmicas de un material (Rahman, 1995; 1999). Mientras que el estado caucho se caracteriza por producir cambios en el sistema causando; un incremento del volumen libre, la disminución de la viscosidad, así como un incremento en la expansión térmica (Shi *et al.*, 2012).

Los materiales biológicos por debajo de la temperatura de transición vítrea son rígidos y frágiles, sin embargo no cristalizan con una estructura regular pero mantienen el desorden del estado líquido o el estado amorfo (Rahman *et al.*, 2003; Schenz, 1996). El estado físico de los productos alimenticios por debajo de la temperatura de transición vítrea, es muy estable debido a que los compuestos que intervienen en las reacciones de deterioro toman muchos meses o incluso años para difundirse a través de distancias moleculares y acercarse entre sí para reaccionar (Rahman *et al.*, 2003; Slade y Levine, 1991). Por tal motivo, las moléculas de agua son retenidas en la solución concentrada disminuyendo su

movilidad, haciéndola incapaz de participar en las reacciones de deterioro como son las reacciones enzimáticas y no-enzimáticas, el crecimiento microbiano, la oxidación de lípidos (Mitchell, 1998; Rahman y Labuza, 2007). La técnica más ampliamente utilizada para determinar la transición vítrea ha sido la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Rahman, 2006; Roos, 1995). La cual será descrita en párrafos posteriores.

1.4.3.1 Importancia de la transición vítrea en la industria alimentaria

Actualmente, el concepto de transición vítrea ha tomado mayor relevancia en el desarrollo de procesos de la industria alimentaria, con la finalidad de obtener la mayor estabilidad de los alimentos. De igual manera el concepto de transición vítrea y estado vítreo, han sido de gran importancia para explicar fenómenos como la re-cristalización de productos congelados en función del tiempo, el fenómeno de colapso durante el proceso de liofilización y pegado durante el almacenamiento de polvos (Foster *et al.*, 2006; Santivarangkna *et al.*, 2011). En este contexto, algunas normas han sido establecidas a partir del concepto de transición vítrea dentro de las cuales destacan: a) la máxima estabilidad de un alimento se alcanza almacenándolo a su temperatura de transición vítrea o por debajo de ésta, b) mientras más grande sea la temperatura del entorno (T_{ent}) y la temperatura de transición vítrea del sistema ($T_{ent}-T_g$), mayor será la velocidad de degradación del sistema (Rahman, 2006; Sablani *et al.*, 2010).

1.4.4 Diagramas de estado en sistemas alimentarios

Un diagrama de estado es una representación gráfica de los estados físicos de los constituyentes de los alimentos respecto a la temperatura y fracción de sólidos (x_s) o contenido de agua (x_w) a presión constante, para sistemas en equilibrio y no equilibrio (Roos, 1995). Un diagrama de estado es más extenso que un diagrama de fase ya que contiene información de fases en equilibrio y estados en no equilibrio. Generalmente, los sistemas alimenticios son representados en diagramas de estado como sistemas binarios ya que contienen agua y sólidos disueltos en ella (Reid y Fennema, 2007). El diagrama de estado ha sido utilizado para observar y predecir los cambios de estado durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos frescos, congelados con contenidos de humedad media o baja (Slade y Levine, 1991).

Los diagramas de estado han sido reportados como diagramas de estado simples o diagramas de estado complementados. Los diagramas de estado simples, consisten en una

representación gráfica de T_g vs. x_w o T_g vs. x_s . Sin embargo, estos diagramas son aplicables solamente para alimentos de humedad intermedia o humedad reducida (Rahman, 2006; Sablani *et al.*, 2010; Syamaladevi *et al.*, 2009). Los diagramas de estado complementados presentan aplicabilidad en todo el rango de contenido de humedad o masa sólida. A continuación una descripción a detalle de los diagramas de estado complementados será presentada.

1.4.4.1 Diagrama de estado complementado

Un diagrama de estado complementado, es un mapa de los diferentes estados de un alimento en función de la temperatura, en todo el rango de la fracción másica del sólido (x_s) (Figura 1.3). Este diagrama de estado muestra información sobre estados de equilibrio o transiciones de primer orden, como la curva de congelación (T_m vs. x_s), la curva de solubilidad y estados de no equilibrio o transiciones de segundo orden como la curva de transición vítrea (T_g vs. x_s) así como las temperaturas y concentración correspondiente a la

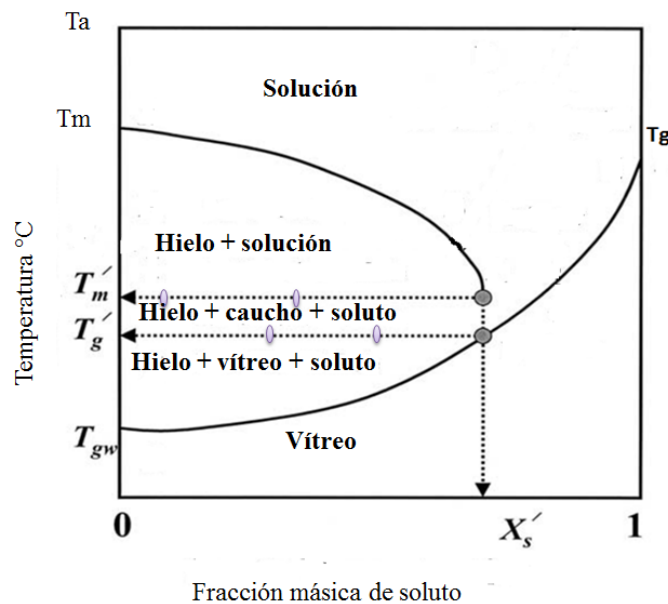


Figura 1.3. Representación típica de un diagrama de estado complementado de un sistema alimentario. En donde se muestra la línea de transición vítrea T_g , curva de fusión/congelación T_m , en función de la concentración de sólidos (x_s). T_m' y T_g' limitan la zona máxima congelación-concentración, x_s' fracción másica máxima a la que se puede congelar el agua (Rahman *et al.*, 2002).

solución concentrada en el punto de máxima congelación caracterizados por T_m' , T_g' y x_s' . T_m' y T_g' teóricamente deben ser independientes del contenido de agua para ser considerados como las temperaturas de la solución concentrada en la máxima congelación

Los diagramas de estado complementados han sido utilizados en el desarrollo de formulaciones, procesamiento, optimización de la estabilidad de alimentos durante el almacenamiento, así como también en formulaciones farmacéuticas. En la literatura han sido reportados diagramas de estado complementado para componentes puros (sacarosa, maltosa, pectina y almidón) proteínas, frutas y productos lácteos (Roos, 1995b; Icoz y Kokini, 2008; Silvia *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Simaladevi *et al.*, 2009) y recientemente se han reportado en sistemas puros, binarios y ternarios (Ruiz Cabrera y Schmidt, 2015; Ruiz Cabrera *et al.*, 2016).

1.4.4.2 Componentes de un diagrama de estado

1.4.4.2.1 Curva de fusión y/o congelación

La curva de fusión/congelación representa la depresión del punto de fusión o congelación conforme se incrementa el contenido de sólidos, siendo uno de los principales componentes del diagrama de estados de los sistemas alimentarios. El punto de fusión de sólidos se define generalmente como la temperatura cuando se pierde el estado cristalino de un material alimenticio. El punto de congelación se considera como la temperatura a la cual se forma hielo en la muestra, y es una transición de primer orden ya que el calor latente está involucrado (Rahman *et al.*, 2010). El punto de fusión o congelación ha sido determinado mediante calorimetría diferencial de barrido o por el método de la curva de enfriamiento donde T_m se designa como el punto inicial de congelación y T_m' como el punto final de congelación (Rahman, 2012). El punto de congelación del agua o el punto de fusión de hielo es una transición de primer orden, es decir un proceso de equilibrio donde ni la velocidad de enfriamiento o calentamiento afectan la temperatura a la cual se da la transición de fase de la cristalización del hielo. La congelación aumenta la estabilidad de los alimentos a temperaturas bajo cero mediante la reducción de la disponibilidad de agua para las reacciones químicas, microbianas y enzimáticas (Goff *et al.*, 1996). La cantidad de hielo cristalizado a temperaturas inferiores al punto de congelación inicial depende de la temperatura del sistema de alimentación, la concentración de sólidos de los alimentos, el tiempo y la historia de la temperatura de los alimentos.

1.4.4.2.2 Curva o línea de transición vítrea

La influencia del contenido de agua o sólidos sobre la temperatura de transición vítrea a presión constante, puede ser presentada trazando la línea vítrea en una gráfica que contenga la temperatura en el eje de las ordenadas y el contenido de agua o sólidos en el eje de las abscisas. La línea vítrea distingue los estados generales de los sistemas fuera de equilibrio, como un estado vítreo estable y un estado caucho metaestable. Para cualquier sistema alimentario, la línea vítrea depende de la composición química, contenido de agua, peso molecular y grado de polimerización, debido a que la Tg se incrementa a medida que el peso molecular, tamaño, rigidez, y enlaces cruzados de los componentes aumentan, y disminuye a medida que se incrementa la flexibilidad de la cadena de biopolímeros (Sablani *et al.*, 2010).

1.4.4.2.3 Punto de máxima congelación-concentración

El estado de máxima congelación concentración, se caracteriza por presentar una alta viscosidad. La formación del estado vítreo puede comenzar dentro de la matriz de los alimentos a temperaturas por debajo Tm' (inicio de la fusión del hielo). El tipo de constituyentes de los alimentos y la temperatura de congelación también puede desempeñar un papel en la naturaleza y la cantidad de hielo cristalizado (Blond *et al.*, 1997; Goff *et al.*, 1993; Simatos *et al.*, 1989; Wolfe *et al.*, 2002). La temperatura de transición vítrea correspondiente a la máxima congelación-concentración se observa como Tg' y el contenido de agua resultante del diagrama de estado es el agua no congelada en la matriz ($xw'=1-xs'$). La formación vítrea en soluciones de congelación concentración se produce como resultado de i) la separación de hielo en una fase sólida dispersa y ii) la disminución de la temperatura y aumento de la viscosidad de la fase no congelable. Debido a que la fase de congelación concentración se acerca a un alto contenido de sólidos y viscosidad elevada, se reduce la velocidad de cristalización del agua, por lo tanto, el crecimiento de cristales de hielo está restringido por la reducción de traslación y movimientos de rotación de las moléculas. De tal manera que debido al incremento de la viscosidad, la formación de cristales de hielo cesa, la viscosidad a la cual ha sido demostrado que la formación de hielo cesa fue de 10^7 Pas para soluciones de sacarosa (Roos y Karel, 1991). Las transiciones de Tg' y Tm' describen la transición vítrea compleja asociada a la formación y fusión de hielo.

1.5 Determinación de los componentes de diagrama de estado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido se ha utilizado para obtener información cuantitativa y cualitativa de las propiedades térmicas y físicas de sistemas alimentarios, como transición de fase, transición vítrea, entalpías de fusión y/o cristalización, calor específico, calor latente, polimorfismo, pureza, etc. Esta técnica se ha utilizado extensamente para caracterizar diversos materiales dentro de los que se incluyen alimentos, productos farmacéuticos y polímeros (Sablani *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). El DSC se ha caracterizado por presentar un gran número de ventajas como por ejemplo: facilidad en la preparación de la muestra, una metodología rápida, aplicabilidad en alimentos con alto y bajo contenido de humedad y puede ser utilizada en amplio rango de temperatura (Sablani *et al.*, 2010). Además, es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas (Surinach *et al.*, 1992). En DSC, tanto la muestra como la celdilla de referencia son sometidas a un flujo de calor constante, con la finalidad de mantenerlas a una misma temperatura, obteniéndose diagramas de flujo de calor en función de la temperatura llamados termogramas como se muestra en la Figura 1.4. Así, los datos se obtienen en forma de entradas diferenciales de calor ($\delta H/\delta T$), en función de la temperatura.

Durante el análisis DSC se pueden apreciar diversos fenómenos térmicos, dependiendo de la muestra a analizar. El primer cambio mostrado en la Figura 1.4, corresponde a la transición vítrea T_g y se presenta como un cambio en la discontinuidad de la pendiente de la curva. Conforme la temperatura se incrementa, la muestra gana suficiente energía para adoptar un estado ordenado cristalino lo que permite determinar la temperatura de cristalización (T_c). Si se continúa incrementando la temperatura más allá de la temperatura de cristalización éste absorberá la energía necesaria para finalmente alcanzar la temperatura de fusión (T_m) (Martínez-Navarrete *et al.*, 1999).

Durante este análisis, la transición vítrea aparece como un cambio endotérmico en el flujo de calor, el cual resulta de un aumento en la capacidad calorífica cuando un material se calienta por encima de su transición vítrea.

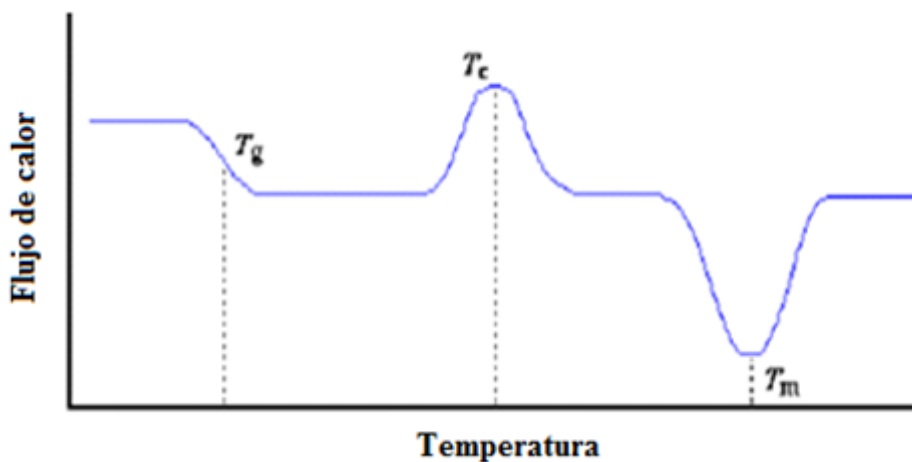


Figura 1.4. Representación esquemática de un termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Martínez-Navarrete *et al.*, 1999).

Los componentes de bajo peso molecular como azúcares simples presentan un rango estrecho de esta transición entre los 10-20°C, mientras que los componentes de alto peso molecular como las proteínas y el almidón pueden presentar un rango de temperatura superior a los 70°C (Forsel *et al.*, 1997; Sablani *et al.*, 2010). Debido a que los alimentos son en su mayoría sistemas multicomponentes y multifásicos, es posible que no presenten el fenómeno de transición vítrea global a menos de que exista una buena miscibilidad y compatibilidad entre los componentes (Katekawa y Silva, 2007).

A la fecha no existe un acuerdo general del valor que debe ser reportado entre T_g *onset*, T_g *midpoint* y T_g *endset* (Figura 1.5) ya que ninguno de ellos tiene un significado físico bien definido. El valor T_g *onset* se considera como el valor más apropiado. Sin embargo, diversos investigadores reportan el valor T_g *midpoint*, ya que se ha encontrado que la representación gráfica de la primera derivada de flujo de calor en función de la temperatura muestra un pico en T_g *midpoint* haciendo más fácil su identificación (Labuza, 1999; Hsu *et al.*, 2003; Roos, 2010; Sablani *et al.*, 2010; Ruiz- Cabrera *et al.*, 2016)

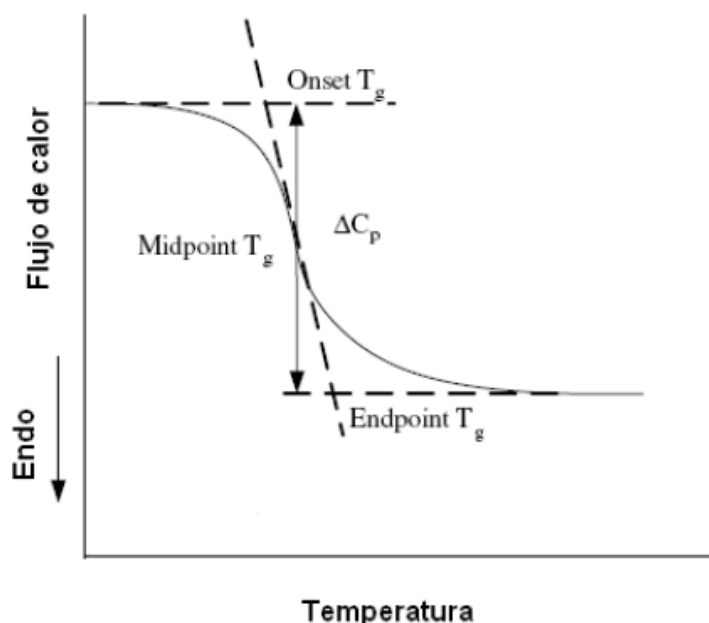


Figura I.5. Evolución del flujo de calor versus la temperatura medida con DSC en la zona de transición vítrea de un material amorfo (Liu *et al.*, 2007).

En el caso de las determinaciones del punto de fusión y/o congelación mediante DSC, la temperatura a la que los últimos cristales de hielo se funden cuando se enfría hasta una temperatura adecuada se designa como la temperatura de fusión del hielo (T_m'), y la temperatura a la que la fusión de los primeros cristales se produce es designado como el inicio de la fusión de hielo (T_m). Cuando se considera la temperatura de congelación del agua y hielo en los sistemas de alimentos la temperatura inicial de cristalización se designa como el punto de congelación inicial (T_f). Este se encuentra como el inicio de la cristalización del hielo, donde hay un aumento brusco de temperatura debido a la liberación de calor latente (Rahman *et al.*, 2002).

Debido a la dificultad que existe en determinar la T_g de manera precisa sin llegar a la degradación térmica, en el laboratorio de Ingeniería de Alimentos FCQ/UASLP, Saavedra-Leos (2011) desarrolló un método calorimétrico mejorado para determinar valores precisos de T_g en sistemas amorfos simples, binarios y ternarios de azúcares. Además, se ha comprobado su eficacia desde sistemas anhidros hasta un contenido de humedad del 15% (zona de agua no congelable). El método consiste en la fusión-enfriamiento rápido, recalentamiento del sistema con la finalidad de obtener sistemas

completamente amorfos, evitando así la presencia de transiciones de primer orden para el fácil análisis de la transición vítrea mediante el DSC convencional.

1.6 Modelación matemática de la curva Tg

La transición vítrea de un material alimenticio puede variar drásticamente de acuerdo a su contenido de agua. La capacidad plastificante del agua se atribuye a su bajo peso molecular y su baja temperatura de transición vítrea de (-135°C) así como a su capacidad de formar puentes de hidrogeno con las partes hidrofílicas de proteínas y carbohidratos (Sablani, 2010). En alimentos con contenidos de humedad bajos o intermedios, la Tg disminuye con el incremento del contenido de humedad, mientras que en alimentos con alto contenido de humedad este efecto es producido en menor grado.

Al adicionar agua a un sistema se produce un aumento en el espacio intermolecular o del volumen libre, produciendo la disminución de la viscosidad e incrementando la movilidad molecular (Collares *et al.*, 2002).

Se ha observado que la temperatura de transición vítrea total del sistema no sigue una ley aditiva de Tg de cada uno de los componentes además de que esta varía con el contenido de humedad del sistema. Se han propuesto diversos modelos matemáticos, como la ecuación de Couchman y Karasz, la ecuación de Kwei y modelo de Gordon y Taylor, para predecir la temperatura de transición vítrea en función de la fracción másica del sólido (khalloufi *et al.*, 2000). El modelo de Gordon y Taylor se ha utilizado para predecir Tg de azúcares y sistemas multicomponentes. Se presentan a continuación tres modelos matemáticos (Ec. 1.1 a 1.3) que han ayudado a la construcción de diagramas de estado formando la curva de transición vítrea en función de la fracción másica de los sólidos (Sablani *et al.*, 2010; Collares *et al.*, 2002; Roos y Karel, 1991; Rahman, 2006).

$$Tg = TgsXs + TgwXw \quad \text{Ec. 1.1}$$

$$\frac{1}{Tg} = \frac{Xs}{Tgs} + \frac{Xw}{Tgw} \quad \text{Ec. 1.2}$$

$$Tg = \frac{TgsXs + KTgwXw}{Xs + KXw} \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde Tg, Tgs y Tgw son las temperaturas de transición vítrea de la mezcla, el sólido anhidro y el agua, respectivamente; xs es la fracción másica de sólido, xw fracción másica

del agua y k es el parámetro de Gordon y Taylor. Los parámetros k y T_{gs} son estimados por regresión lineal y no lineal usando un valor de $T_{gw} = -135^{\circ}\text{C}$.

La curvatura o forma de la curva T_g puede ser descrita por k , el cual denota la fuerza de interacción entre el agua y los sólidos de alimento. Un valor grande de k indica que los sólidos son más plastificados por el agua, presentado una disminución en la temperatura de transición vítrea. Por otro lado, si el valor de k es 1, la relación de T_g en función de la fracción másica del solido es una línea recta. Con valores de $k > 1$ se obtienen relaciones cóncavas y con $k < 1$ relaciones convexas. En los almidones se ha encontrado que exhiben valores de k menores que proteínas y azúcares por tanto su efecto plastificante no es relevante (Sablani *et al.*, 2010).

1.7 Modelación matemática de la curva T_m

Los modelos para predecir el punto de congelación se pueden clasificar en tres grupos: (1) teóricos, (2) empíricos por ajuste y (3) modelos semi empíricos. Los modelos teóricos están generalmente basados bajo los supuestos de que los alimentos son soluciones binarias ideales. Mientras que los otros modelos están basados sobre mediciones experimentales a través del proceso de congelación. El modelo teórico más utilizado para predecir el punto de congelación ha sido la ecuación de Clausius- Claperon (Ec. 1.4):

$$\delta = -\frac{\beta}{\lambda_w} \ln \left[\frac{1-x_s}{1-x_s + E x_s} \right] \quad \text{Ec. 1.4}$$

donde δ es la depresión del punto de congelación/fusión relativo al incremento total de sólidos, β es la constante molar del punto de fusión/congelación del agua (1860 kgk/kgmol), λ_w es la masa molar del agua, x_s es la fracción másica del solido (kg de solidos/kg de muestra) y E es la relación de la masa molecular del agua y los sólidos (λ_w/λ_s). Los valores de E pueden ser estimados por regresión no lineal usando los puntos de congelación en función del contenido de agua inicial o de solido inicial (Rahman, 2004). Este modelo está limitado para soluciones ideales, es decir, soluciones diluidas. Los modelos teóricos pueden ser mejorados introduciendo parámetros de comportamiento no ideal cuando la fracción total de agua no está disponible para la formación de hielo. El contenido de agua no congelable puede ser definido como la relación de agua no congelada

a solidos totales, inclusive a temperaturas bajas. La ecuación 1.4 basándose en este concepto fue modificada y se le conoce como ecuación de Chen:

$$\delta = -\frac{\beta}{\lambda W} \ln \left[\frac{1-Xs-BXs}{1-Xs-BXs+EXs} \right] \quad \text{Ec. 1.5}$$

1.8 Uso de los diagramas de estado complementado en la industria de alimentos

El diagrama de estado de sistemas alimenticios puede ser usado para optimizar procesos y condiciones de almacenamiento, analizando la curva de transición vítrea, las condiciones de la fracción másica de máxima congelación y la curva de fusión/congelación. Los diagramas de estado tienen gran aplicación para establecer y optimizar los procesos de fabricación, almacenamiento y distribución de alimentos con alto contenido de humedad (agua congelable) así como de alimentos con contenidos de humedad media y baja conteniendo agua no congelable.

Por el ejemplo, el progreso del proceso de deshidratación se puede visualizar fácilmente en un diagrama de estado, debido a que la temperatura de la muestra se incrementa a la temperatura de bulbo húmedo, la humedad disminuye y se alcanza un estado caucho. Después de enfriar la muestra seca llega al estado vítreo, alcanzando un estado físico estable (Rahman, 2010). Los alimentos deshidratados son estables debido a que generalmente se encuentran en estado vítreo. Sin embargo, cuando se utiliza el secado por aspersión en ocasiones el alimento tiende a pegarse en las paredes del secador debido a que la temperatura de secado es mayor a la Tg del alimento.

Las regiones de temperatura donde se produce la pegajosidad, colapso y la cristalización se pueden representar en un diagrama de estado con la finalidad de incrementar las condiciones óptimas del secado por aspersión (Maltini *et al.*, 2003). El máximo aprovechamiento de los diagramas de estado para alimentos con contenido de humedad bajo o medio se realiza mediante la elección de las concentraciones óptimas de temperatura y humedad para evitar los efectos perjudiciales de los cambios estructurales. Isotermas de sorción y diagrama de estado junto con (T-Tg) se pueden usar para predecir la estabilidad física de los alimentos durante el procesamiento, el transporte, embalaje y almacenamiento (Fitzpatrick *et al.*, 2007).

Las velocidades de muchas reacciones químicas están influenciadas por la concentración de agua en los alimentos (Sablani *et al.*, 2010). La influencia de la

temperatura de transición vítrea en ciertas reacciones químicas no está claro, ya que el agua presente en alimentos tiene múltiples funciones, ya sea como plastificante, disolvente, reactivo o producto de las reacciones químicas (Buera *et al.*, 1995). Bell *et al.* (2002) informaron que la movilidad del agua en el sistema alimentario no se puede utilizar como un indicador para explicar la estabilidad química de los alimentos. La temperatura de transición vítrea y el estado físico de un sistema no son la única forma de predecir las reacciones de degradación química en los sistemas alimentarios, sino que existen otros factores como los constituyentes de los alimentos y su respectiva concentración.

Como se indicó anteriormente, durante el proceso de congelación de un alimento, el diagrama de estado es esencial ya que contienen los estados físicos de los alimentos conforme disminuye su temperatura, facilitando así establecer las temperaturas adecuadas de almacenamiento por congelación.

En la congelación de alimentos las temperaturas por debajo de T_g o T_g' son deseables para el almacenamiento seguro de los sistemas alimentarios con alto contenido de agua, ya que el material alimenticio se encuentra en los estados físicos de hielo, vidrio y soluto (Nelson y Labuza, 1994; Roos y Karel, 1991). La formación máxima de hielo en los sistemas alimentarios durante la congelación se lleva a cabo cuando los sistemas se almacenan por debajo de T_g' . A temperaturas superiores a T_m' , el sistema alimentario puede ser plastificado por la fusión del hielo y esta condición puede dar lugar a una congelación parcial de la matriz y puede no ser adecuado para el almacenamiento a largo plazo de los alimentos.

Los diagramas de estado también han sido utilizados para caracterizar los estados físicos de la harina de trigo, antes o durante el proceso de extrusión (Kaletune y Brealauer, 1996). Los diagramas de estado lograron identificar la temperatura y el contenido de humedad en el que los componentes proteicos de los productos extruidos quedaron en estado vítreo con propiedades crujientes (Koini *et al.*, 1994).

La adulteración de la miel, la leche y jugos de frutas pueden ser identificados a través del concepto de la T_g determinada por DSC (Cordella *et al.*, 2002; Goswami *et al.*, 2008). Así también a través de este concepto, es posible conocer el comportamiento de algunas proteínas del gluten, caseínas y proteínas de soya después de proceso de extrusión o de horneado (Bengoechea *et al.*, 2007).

En sistemas multicomponentes como alimentos de origen animal donde la muestra es muy heterogénea, debido a la variabilidad inter-animal, intermuscular e intramuscular es necesaria la construcción de diagramas de estado donde se puedan visualizar los diferentes estados físicos de alimentos ricos en proteínas frescos y congelados en función de la temperatura y del contenido de humedad.

1.9 Justificación

El consumo de insectos se ha incrementado significativamente en los últimos años por el alto valor nutritivo que estos presentan. Son considerados como una buena fuente de aminoácidos esenciales, ácidos grasos insaturados, vitamina del complejo B y minerales. En México uno de los insectos de mayor consumo son los escamoles, los cuales por su elevada actividad proteolítica son altamente perecederos, presentan una vida útil de 5 días a 4°C.

Para prolongar su vida útil, los recolectores de este producto han recurrido al proceso de congelación a -18°C, sin embargo, daños estructurales acompañado de pérdida de líquidos, cambios de color, apariencia y desnaturalización de proteínas han sido observados en los escamoles cuando éstos son descongelados. En la literatura, ha sido indicado que las temperaturas del punto de máxima congelación-concentración, caracterizadas por T_m' y T_g' son los parámetros de referencia para fijar la temperatura del congelador y para el control de la estabilidad de alimentos congelados. En este contexto es necesario elaborar diagramas de estado complementado de los escamoles preparados a diferentes concentraciones másicas con la finalidad de determinar la curva T_g , la curva de congelación T_m y los parámetros (T_m' , T_g' , x_s') en el punto de máxima congelación utilizando calorimetría diferencial de barrido. Lo anterior conllevará a determinar la temperatura de congelación adecuada de los escamoles para evitar los daños estructurales.

1.10 Hipótesis

La curva de transición vítrea y la curva fusión-congelación de la matriz de escamoles a diferentes contenidos de humedad expresado en un diagrama de estado complementado contribuirán a determinar las condiciones idóneas de almacenamiento de escamoles.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar el diagrama de estado complementado de escamoles mediante la determinación de la curva de transición vítrea, curva de enfriamiento así como del punto de concentración de máxima congelación por calorimetría diferencial de barrido (DSC), con el fin de caracterizar las condiciones de almacenamiento y estados físicos de escamoles congelados.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar las transiciones de fase (fusión) de escamol a diferentes contenidos de humedad y establecer la curva de enfriamiento- congelación en la zona de agua congelable.
- Determinar la transición vítrea de escamoles a diferentes porcentajes de agua mediante DSC y establecer la curva Tg en zonas de agua congelable y no congelable.
- Caracterizar el punto de concentración de máxima congelación (T_m' , T_g' y x_s') así como la fracción de agua no congelable ($1-x_s'$) en la matriz de escamoles.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección de escamoles

Escamoles de la especie *Liometopum apiculatum* M., fueron recolectados de diferentes nidos en la comunidad de Pocitos, Charcas, S.L.P. México. Enseguida fueron limpiados y lavados con agua potable para eliminar impurezas. Para evitar variabilidad entre las muestras, los escamoles fueron mezclados, y un solo lote de muestra homogénea fue obtenido. Dicho lote fue después separado en porciones de 100 g y almacenados a una temperatura de -80°C. De acuerdo a investigaciones anteriores realizadas en nuestro laboratorio, ha sido comprobado que el almacenamiento a -80°C, no produce daños estructurales en los escamoles después de que son descongelados.

3.2 Análisis proximal de la composición química de los escamoles.

El análisis de la composición química de los escamoles fue llevado a cabo de acuerdo a las técnicas de la Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.) (1990). El valor energético de los escamoles fue calculado tomando en cuenta las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos, utilizando los factores promedio de Atwater y propuestos por el U. K. Ministry of Agriculture Fisheries and Food Standard Comitte (Osborne, *et al.*, 1985).

3.3 Preparación de escamoles en estado anhidro

Los escamoles fueron primeramente homogenizados con un Ultra Turrax (IKA® T25) digital a una velocidad de 13,500 r.p.m durante 20 s. Posteriormente, el homogenizado fue deshidratado en un liofilizador (ilShin® Freeze Driyer) a una temperatura de -40 °C y presión de vacío de 5 mTorr durante 70 h. Las muestras liofilizadas fueron después pulverizadas en un mortero con pistilo. El escamol liofilizado y triturado fue inmediatamente almacenado en un desecador, conteniendo desecante Drierite® (sulfato de calcio anhidro y mineral con indicador, $aw \approx 0$) a temperatura ambiente durante un periodo de 4 semanas para un deshidratado y equilibrado completo de las muestras. El contenido de humedad de los escamoles anhidros, fue determinado por triplicado mediante el método de la AOAC (1990) y un valor promedio de 2.2 ± 0.009 % (base húmeda).

3.4 Preparación de escamoles con diferentes contenidos de humedad

Las muestras anhidras y equilibradas con Drierite®, obtenidas en el inciso 3.3, fueron después acondicionadas a diferentes contenidos de humedad entre 2.2 % y 90% (b.h.) para su correspondiente análisis térmico DSC y determinar así el punto de fusión de las muestras con agua congelable, así como las temperaturas de transición vítrea en muestras con agua congelable y no congelable. En este contexto, se utilizaron dos protocolos distintos para el acondicionamiento de humedad en dichas muestras, los cuales se describen a detalle a continuación.

3.4.1. Preparación de muestras con contenidos de humedad de 0 a 50% (b.h.)

Muestras de aproximadamente de 5 a 10 mg, fueron pesadas en celdillas de aluminio Tzero (TA instruments) usando una microbalanza Mettler-Toledo (AG245:RS232, ± 0.1 mg/0.01 mg). Las celdillas DSC abiertas, conteniendo las muestras fueron inmediatamente expuestas a una humedad relativa (H.R.) del 100 % usando agua destilada. Las celdillas fueron retiradas a intervalos regulares de tiempo, selladas y pesadas nuevamente en la microbalanza Mettler-Toledo. El contenido de humedad alcanzado en las muestras fue calculado a partir de la ganancia de masa tomando como referencia el contenido de humedad de 2.2% (b.h.) determinado en los escamoles anhidros (inciso 3.3).

Las celdillas una vez selladas, se dejaron a temperatura ambiente durante un tiempo mínimo de 24 horas para permitir el equilibrio de la humedad en toda la muestra antes de realizar cualquier medición en el calorímetro diferencial de barrido y también para corroborar mediante un nuevo pesado que éstas fueron perfectamente selladas.

3.4.2. Preparación de muestras con contenidos de humedades superiores a 50% (b.h.)

Todas las muestras con un contenido de humedad superiores a 50 % (b.h.) fueron preparadas por adición directa de agua destilada a porciones de muestras liofilizadas y anhidras obtenidas en el inciso 3.3. Para promover un mezclado homogéneo, el proceso de disolución fue realizado con tratamiento ultrasónico (Ultrasonic Cleaner, modelo CD-2800, serial: 201012, volts: AC100, frecuencia: 60HZ Watss.35) obteniendo así una solución de escamol homogénea. Debido al riesgo de una separación de fases, inmediatamente se procedió al pesado de aproximadamente 5-10 mg de la solución de escamol en celdillas de

aluminio Tzero (TA instruments) con la microbalanza Mettler-Toledo (AG245:RS232, ± 0.1 mg/0.01 mg) y posteriormente selladas herméticamente.

Las celdillas selladas se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo, las celdillas fueron nuevamente pesadas y corroborar así que éstas fueron perfectamente selladas. Aquellas celdillas que presentaron diferencia de masa fueron desechadas.

3.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

Un análisis termogravimétrico TGA fue requerido para caracterizar la temperatura de desnaturalización (Td) y la temperatura de degradación térmica (Tdt) del escamol anhidro (2.2% b.h.). Dichas mediciones se llevaron a cabo en un TGA Q500 V20.13 Build 39 (TA instruments), equipado con el software Analisis 2000[©] para el análisis termogravimétrico cuando el escamol anhidro fue calentado desde la temperatura ambiente hasta 600 °C. La sensibilidad y la precisión de la temperatura y el peso fueron ± 0.1 μ g y ± 0.001 °C, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en una atmósfera inerte con nitrógeno (ultra puro, de grado 5,0, 99,999% de pureza) a un flujo de 100 ml / min. Para ello, muestras de alrededor de 10 a 15 mg fueron pesadas en celdas de aluminio Tzero TA Instruments, usando una microbalanza electrónica (Mettler Toledo R-3769: XS205, $\pm 0,01$ mg). Una charola de aluminio conteniendo alrededor de 1 μ g de polvo de aluminio fue utilizada como referencia. Las muestras fueron calentadas a razón de 20 °C/min desde temperatura ambiente hasta una temperatura de 600 °C. De acuerdo con los objetivos establecidos en este trabajo de investigación, las temperaturas de degradación térmica y de desnaturalización, así como la evolución de la reducción de masa del escamol anhidro fueron evaluadas a partir de las curvas TGA.

3.6. Análisis térmico por calorimetría diferencia de barrido (DSC)

Este análisis térmico fue realizado en un calorímetro diferencial de barrido Q2000 (TA Instrument, Lukens Drive, New Castle, Delaware 19720, United States), equipado con un sistema de enfriamiento RCS90 permitiendo el análisis en un rango de temperatura de -90 a 550°C a una sensibilidad de ± 0.1 °C y ± 0.2 μ W. Además, dispone del software Analisis

2000[©] versión 4.4 A para un análisis correcto de los resultados. La línea base, fue calibrada con una celdilla de aluminio Tzero[®] (TA Instruments) y con discos de zafiro. El calorímetro diferencial de barrido fue calibrado tanto para la temperatura como para el flujo de calor siguiendo las instrucciones indicadas en el manual de usuario proporcionado por TA Instruments, usando indio como referencia (temperatura de fusión 156.6 °C, $\Delta H_m=28.6$ J/g). Los experimentos fueron llevados a cabo en una atmosfera inerte, con nitrógeno (ultra puro, grado 5.0 y 99.999% de pureza) con un caudal de 50 ml/min.

Para la determinación de los puntos de congelación (T_m , T_m'), temperaturas de transición vítreas (T_g , T_g') y temperaturas de desnaturalización (T_d) en muestras de escamoles preparados a diferentes contenidos agua, el protocolo calorimétrico propuesto por Rahman (2004) y Zhao *et al.*, (2015) con ligeras modificaciones fue aplicado. Para ello, muestras del orden de 10 mg contenidas en celdillas DSC herméticamente selladas fueron enfriadas a razón de 20 °C/min desde la temperatura ambiente hasta -90 °C, manteniéndose a ésta temperatura durante 2 min, para asegurar una buena vitrificación. Finalmente, las muestras fueron calentadas hasta alcanzar la temperatura de 160 °C a una velocidad de 5 °C/min.

Es importante remarcar que para muestras de escamol preparadas en el intervalo de humedad 10-40% (b.h.), un procedimiento de *annealing* a $T_m' -1$ °C, según lo recomendado por Rahman (2004) y Zhao *et al.* (2015), fue adoptado para maximizar la formación de hielo. El valor aparente de T_m' fue determinado a partir de un primer análisis térmico sin *annealing*. Para lo anterior, una solución de escamol con 40 % de agua (b.h.) fue sometida a diferentes tiempos de *annealing* (30 y 60 min), manteniendo una temperatura de *annealing* ($T_m' -1$ °C) y una velocidad de calentamiento (10°C/min) constantes. Después de varios ensayos, fue observado que un tiempo de *annealing* de 60 min era suficiente para incrementar la formación de hielo en éstas muestras. Por lo tanto, las muestras de escamol con contenidos de humedad de 10-40 % (b.h.) fueron enfriadas a una velocidad de 20 °C/min desde la temperatura ambiente hasta -90 °C y mantenidas durante 2 min a esta temperatura, luego se calentaron a 5°C/min a la temperatura de *annealing*, se mantuvieron durante 60 min, se volvieron a enfriar a -90 °C a 10 °C/min, se mantuvieron durante 2 min, finalmente se recalentaron a 5 °C/min hasta 160 °C.

T_g' , T_m' y T_g , fueron, respectivamente reconocidos como el primero, segundo y tercer cambio continuo característicos de una transición de estado observados en el flujo de calor cuando las muestras fueron calentadas. Entonces, estos parámetros fueron determinados utilizando el método de media altura a partir en los termogramas DSC (Ablett *et al.*, 1992; Orlieen *et al.*, 2003; Goff *et al.*, 2003). No obstante que los valores de Tonset, Tmidpoint and Tendset, fueron determinados en cada uno de estos eventos térmicos, en algunos casos solamente el valor del punto medio (T midpoint) fue reportado en este trabajo. En lo que concierne a las transiciones de fases, tanto el punto de congelación (T_m) así como las temperaturas de desnaturalización (T_d) de las muestras fueron determinados a partir de los picos endotérmicos observados en los termogramas.

3.7. Modelado de las transiciones térmicas

La temperatura de congelación de los escamoles en función del contenido de sólidos fue modelada con la ecuación modificada de Clausius-Clapeyron o ecuación de Chen; adaptada para el análisis de soluciones no diluidas y no ideales como es el caso de la mayoría de los alimentos (Rahman, 2004 y Sablani *et al.*, 2009):

$$T_m = T_w + \left(\frac{\beta}{\lambda_w} \right) \ln \left(\frac{1 - x_s - Bx_s}{1 - x_s - Bx_s + Ex_s} \right) \quad (\text{Ec.3.1})$$

donde T_m y T_w son respectivamente, la temperatura de congelación del alimento ($^{\circ}\text{C}$) y temperatura de congelación del agua pura, β es la constante molar del punto de congelación del agua (1860 kg K/kg mol), λ_w es el peso molecular del agua, x_s es la fracción másica de sólidos (kg de sólidos/kg de muestra), E , es la relación de la masa molecular del agua y los sólidos (λ_w/λ_s) y B , es definido como la relación entre el agua sin congelar (a una temperatura muy baja) y los sólidos totales. En este caso, los parámetros E y B fueron ajustados simultáneamente mediante regresión no lineal con Microsoft Excel 2010. La bondad del ajuste entre los datos experimentales y ajustados fue determinada mediante un coeficiente de correlación (R^2).

Por otro lado, para la evaluación del efecto plastificante del agua sobre la temperatura de transición vítrea, los datos experimentales fueron sometidos también a un análisis de regresión no lineal utilizando la ecuación de Gordon-Taylor (Sablani *et al.*, 2010):

$$T_{gm} = \frac{x_s T_{gs} + k(1 - x_s) T_{gw}}{x_s + k(1 - x_s)} \quad (\text{Ec.3.2})$$

donde T_{gm} , T_{gs} y T_{gw} , representan respectivamente, a la temperatura de transición vítrea del escamol, escamol anhidro y agua amorfa, mientras que x_s y x_w , representan a la fracción másica del sólido y del agua, respectivamente, y k , es un parámetro constante que es proporcional al efecto plastificante del diluyente, en este caso del agua (Sablani *et al.*, 2010). El análisis de regresión no lineal fue hecho también con Microsoft Excel 2010, usando el valor de -135°C como el valor de T_{gw} (Hallbrucker *et al.*, 1989; Sablani *et al.*, 2010).

3.8. Cálculo de la fracción másica de agua no congelable (x_w')

En la literatura han sido propuestos diversos métodos y/o ecuaciones para predecir el contenido de agua no congelable (x_w'). En la mayoría de los casos el valor de x_w' se obtiene por diferencia como $(1-x_s')$, donde x_s' representa la fracción másica en el punto de máxima congelación-concentración (Rahman, 2004 y Sablani *et al.*, 2010). Por lo tanto, en este estudio el valor de x_s' para el escamol fue obtenido a partir del diagrama de estado utilizando tres procedimientos, como se indica a continuación: (i) a partir de la intersección del valor promedio de T_g' con la curva de transición vítrea, (ii) a partir de la intersección del valor promedio de T_m' con la curva T_m y (iii) a partir de la intersección de la curva T_m con la curva T_g , los cuales son etiquetados como x_s' , x_s'' , x_s''' , respectivamente. Sin embargo, ha sido generalmente asumido que el contenido de humedad correspondiente al valor de T_g' y T_m' deben ser iguales puesto que no hay formación de hielo del lado derecho de T_m' . Por lo que es muy probable que el tercer procedimiento, es decir, la determinación de x_s' a partir de la intersección de la curva T_m y curva T_g sea un método inapropiado (Rahman, 2004; Yu y Li, 2012; Zhao *et al.*, 2015).

3.8. Almacenamiento de escamoles a diferentes temperaturas de congelación

Porciones de 100 g de muestra fresca fueron almacenadas durante tres semanas a diferentes temperaturas de congelación (-20, -35 y -80°C) con la finalidad de evaluar cambios estructurales externos en los escamoles después de la descongelación. Las muestras fueron descongeladas a la temperatura de 4 °C durante un periodo de 4 horas con la finalidad de promover una descongelación lenta. La estructura externa de los escamoles enteros se observó usando un microscopio digital USB Dino-Lite, modelo AM4113ZT4 Dino-Lite Premier, resolución de 1.3M pixeles (SXGA) (Dino-Lite, Taiwan), con 10, 20 y 40X de ampliación. La muestra fue colocada en el microscopio y una serie de imágenes fueron obtenidas con una cámara digital interna; un mínimo de 20 escamoles fueron analizados de manera individual.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Composición química del escamol (*Liometopum apiculatum*)

En la Tabla 4.1 se muestra la composición química proximal en base seca del escamol. De acuerdo a lo mostrado en la Tabla 4.1 es evidente que los escamoles presentan un alto contenido de proteínas, así como de carbohidratos y lípidos, principalmente. Estos resultados difieren ligeramente a los resultados concernientes a la composición química de los escamoles publicados por Ramos-Elorduy *et al.*, (2001) y Pino-Moreno (2006). Es posible que dicha diferencia sea debida, ya sea a las condiciones ambientales o al tipo de alimentos a los que tienen acceso las hormigas en donde éstas crecen.

Tabla 4.1 Composición química proximal de escamol (*Liometopum apiculatum* M) % en base seca.

Componente	% en base seca
Proteína	41.8 ± 0.37
Carbohidratos	23.7 ± 0.74
Lípidos	24.2 ± 0.66
Ceniza	8.3 ± 0.47
Energía [kcal/100g]	137.6 ± 3.1

Los valores medios ± desviación estándar de la determinación de muestras por triplicado.

Así también puede notarse que el contenido de proteínas en el escamol es superior al de algunos alimentos convencionales como carne de pescado, cuyo contenido de proteínas varía entre (18.2 a 20.0%), carne de bovino (17.4 a 19.4%), leche (3.5 a 4.5%) y huevo (30%). En este contexto, el escamol puede ser considerado como una fuente importante de proteínas sobre todo para aquellas personas que tienen fácil acceso a dicho producto.

Por otro lado, se sabe que los lípidos son sumamente importantes dentro de la alimentación diaria para mantener sano el organismo cuando éstos son consumidos de forma moderada. En este caso, los escamoles están constituidos por alrededor de 24%. De acuerdo a los hallazgos realizados y reportados por García-Muñoz (2016), se sabe que los lípidos de los escamoles están conformados por 67% de ácidos grasos insaturados y alrededor de 31% de ácidos grasos saturados. Actualmente, los ácidos grasos insaturados

son un tema de gran relevancia tanto para los consumidores como para el sector industrial alimentario debido a los efectos benéficos que aportan.

Adicionalmente, el escamol puede ser considerado como un alimento bajo en calorías, ya que una porción de 100 g aporta solamente 137 kcal comparado con una porción similar de huevo fresco cuyo aporte es de 149 kcal. Cabe mencionar que en la dieta mexicana el huevo está clasificado dentro de los alimentos de bajo aporte calórico.

En la Tabla 4.2 se muestra que el escamol fresco presenta un alto contenido de humedad (72% b.h.), categorizándolo como un producto altamente perecedero, susceptible a la invasión microbiana, así como de reacciones bioquímicas de degradación. Esta tabla muestra también que el escamol liofilizado y almacenado en un ambiente de $a_w \approx 0$, por largo tiempo y considerado en este trabajo de investigación como escamol anhidro presentó un contenido de humedad del orden de 2.2% (b.h.). Lo anterior, expone que el concepto anhidro fue difícil de alcanzar, particularmente en el caso de los escamoles. Sin embargo, muestras a partir del escamol liofilizado fueron utilizadas para el análisis termogravimétrico con la finalidad de caracterizar su correspondiente temperatura de desnaturalización y de degradación térmica y cuyos resultados obtenidos se discuten a detalle a continuación.

Tabla 4.2 Porcentaje de humedad del escamol fresco y liofilizado (% b.h.).

Escamol	% en base húmeda
Fresco	72.1 ± 0.09
Liofilizado (anhidro)	2.2 ± 0.009

Los valores medios \pm desviación estándar de la determinación de muestras por triplicado.

4.2 Análisis termogravimétrico

A manera de ejemplo, en la Figura 4.1 (a-b), se muestran las curvas TGA en función de la temperatura cuando dos muestras similares de escamol liofilizado fueron sometidas al mismo análisis termogravimétrico. En ambas muestras, dos picos endotérmicos estrechos así como la evolución de la pérdida de masa conforme fueron calentadas pueden ser observados. Las formas de ambos picos son típicas de transiciones de fase de primer orden.

En este caso, el primer pico observado alrededor de 160 °C fue considerado como la temperatura de desnaturalización de proteínas mientras que el segundo pico observado alrededor de 400 °C fue considerado como la temperatura de degradación térmica de la muestra. Es importante notar en estas figuras que ambas muestras comienzan a perder masa a partir de 160 °C hasta obtener una pérdida del 80 % en masa cuando la temperatura de 400 °C fue alcanzada. Después de esta temperatura (400 °C), la pérdida de masa tiende a ser constante. Slade *et al.*, (1989), han indicado que cuando la proteína alcanza su temperatura de desnaturalización, ésta puede presentar una ligera disminución de su masa, tal y como fue observado en este estudio. De esta manera, la temperatura de 160 °C fue elegida como temperatura máxima de calentamiento en los experimentos de calorimetría diferencial de barrido, cuando los puntos de congelación (T_m , T_m') y temperaturas de transición vítreas (T_g , T_g') en el escamol, fueron evaluados.

4.3 Análisis térmico por DSC

4.3.1 Análisis calorimétrico del escamol fresco

Los termogramas DSC mostrando el flujo de calor en función de la temperatura cuando tres muestras de escamol fresco (72 ± 0.09 % b.h) fueron analizadas se muestran en la Figura 4.2. En todos los casos se observaron tres picos endotérmicos típicos de transiciones de fases, con temperaturas promedios de 1.2 ± 0.5 °C, 62.5 ± 3.9 °C y 126.5 ± 5.3 °C. El primer pico endotérmico a 1.2 °C, fue considerado como el valor del punto de congelación del agua y fase lipídica congelable (T_m), mientras que el segundo y tercer picos visualizados a 62.5 y 126.5 °C fueron respectivamente, asociados a la desnaturalización de enzimas (T_{d1}) y a la desnaturalización de proteínas (T_{d2}) con enlaces disulfuro. Ha sido observado que la máxima actividad proteolítica de las enzimas endógenas de los escamoles ocurre alrededor de 50 °C (Castillo-Andrade *et al.*, 2015).

El tercer pico endotérmico observado a 126.5°C puede estar asociado con la desnaturalización de proteínas y enzimas que presentan enlaces disulfuro en su estructura. Este tipo de enlaces presentan una energía de enlace de 300-380 kJ/mol, (Chan, 2007) lo cual hace que sean más termo-resistentes. El trabajo realizado por García-Muñoz (2016) indicó la presencia de la enzima disulfuro isomerasa que pertenece a la familia disulfuro oxido reductasa y que presenta este tipo de enlaces durante la formación y síntesis de proteínas y en el plegamiento del retículo endoplásmico. Además, también se indicó la

presencia de la proteína proteosoma sub unidad alfa tipo 6, la proteasa reguladora 26S, así como proteínas de choque térmico quienes presentan estos tipos de enlaces y cuya función está relacionada con el plegamiento y degradación de proteínas.

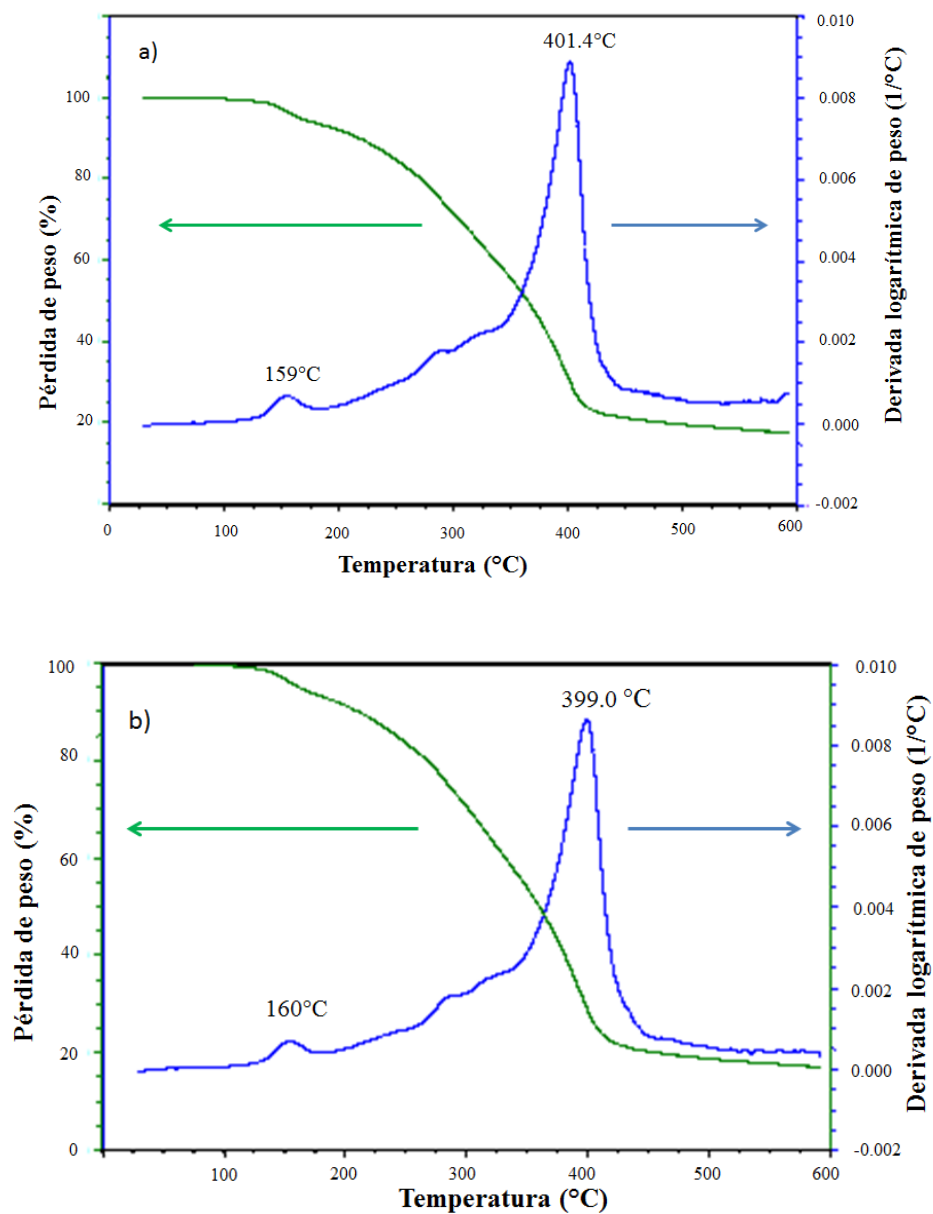


Figura 4.1. Curvas TGA obtenidas para el escamol liofilizado (2.2% b.h.).

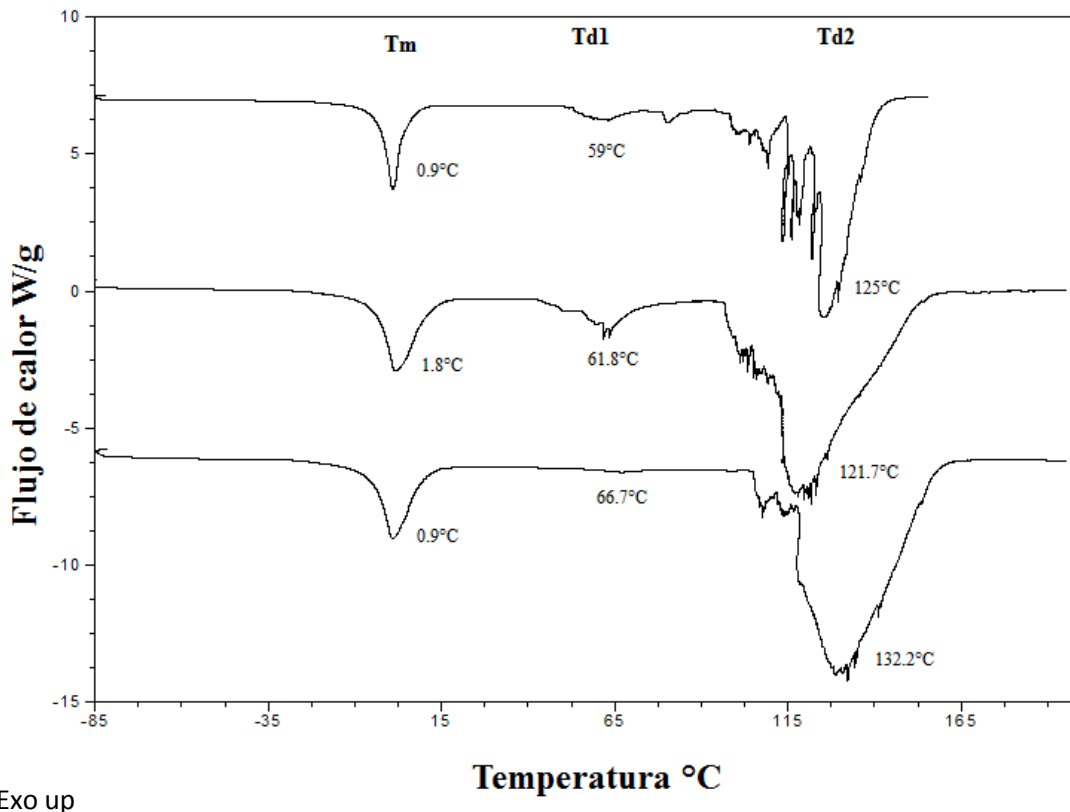


Figura 4.2. Termogramas DSC analizados para la determinación de T_m , T_{d1} y T_{d2} en escamoles frescos (72 ± 0.09 % b.h).

4.3.2 Análisis calorimétrico del escamol liofilizado

La Figura 4.3, muestra los resultados obtenidos cuando cinco muestras de escamoles liofilizadas con contenido de humedad de 2.2% (b.h), fueron escaneadas por DSC. Aun cuando estas muestras se caracterizan por contener agua no congelable, en todos los casos fue observado un pico endotérmico alrededor de -7.2 ± 0.5 °C así como la endoterma correspondiente a la desnaturalización de proteínas (156.4 ± 4 °C) y al evento térmico concerniente a la transición vítrea (61 °C). Como fue mencionado anteriormente, estas muestras liofilizadas no contienen agua congelable por lo que el primer pico fue considerado como el punto de congelación de la fase lipídica. García-Muñoz (2016), encontró que los ácidos grasos de mayor proporción en los escamoles fueron el ácido oleico (C18:1n-9 cis), y el ácido linoleico (C18:2n-6 cis) participando con 56.3%, un 4.2% y

respectivamente. Por otro lado, Knothe y Dunn (2009) han reportado las temperaturas de -7.15 °C y 15.6 °C como valores del punto de fusión para los ácidos linoleico y oleico, respectivamente. Puede notarse, que la temperatura de -7.15°C coincide con el valor de -7.2 °C encontrado en las muestras liofilizadas. En la sección 4.3.3 se profundiza un poco más sobre este aspecto.

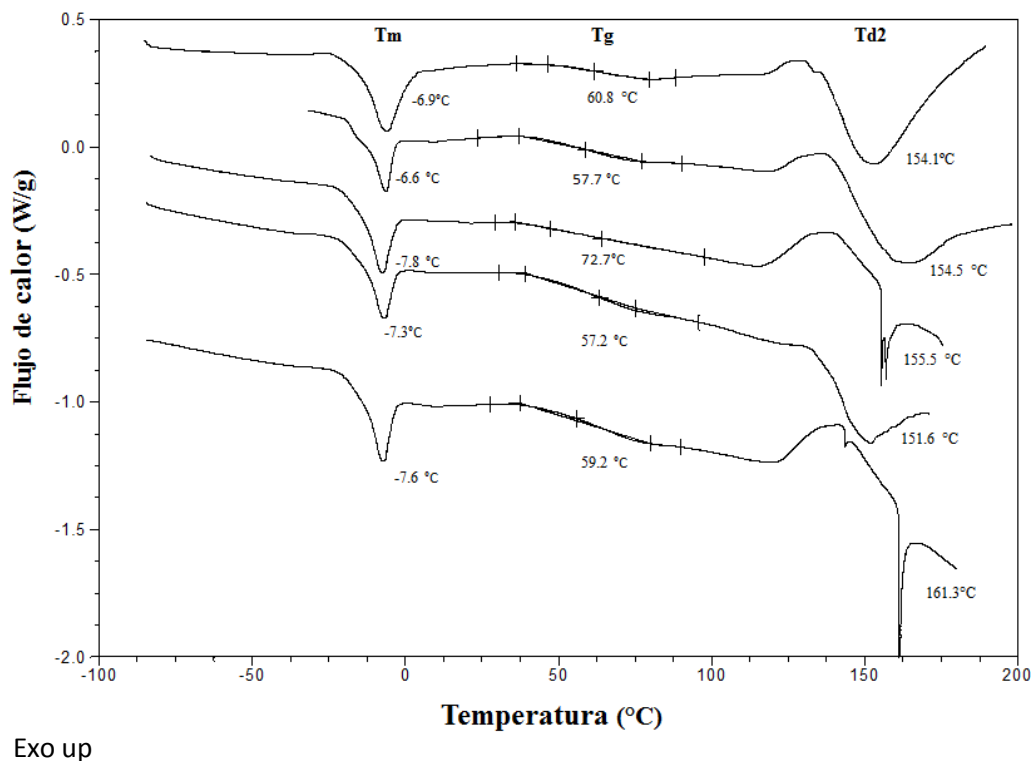


Figura 4.3. Termogramas DSC analizados para la determinación de Tm, Tg y Td en escamoles liofilizados (2.2 ± 0.009 % b.h).

En la Figura 4.3, puede observarse también que la temperatura de desnaturalización de las proteínas con enlaces disulfuro (Td2), aumentó hasta valores entre 151 y 161 °C y que el pico asociado a la desnaturalización de enzimas (Td1) no fue percibido en las muestras liofilizadas. Entonces, puede ser asumido que ambos fenómenos fueron provocados por la disminución drástica del contenido de humedad. Sin embargo, en las muestras liofilizadas fue posible observar un evento térmico con características típicas de una transición de segundo orden a una temperatura promedio de 61.6 ± 6.4 °C. Esta temperatura fue reconocida en este trabajo de investigación como la temperatura de

transición vítrea del escamol liofilizado. El valor de Tg determinado para el escamol liofilizado se encuentra en el orden de magnitud de los valores de Tg reportados para alimentos de origen animal con contenidos de humedad no congelable como el camarón (53.1 °C, Qi-Long *et al.*, 2015); atún (61.9 °C, Rahman *et al.*, 2003); abalone (88 °C, Sablani *et al.*, 2004) pero como un valor muy inferior a las Tg reportados para el músculo de jurel (154.4 °C, Qi-Long, 2009), salmón (156 °C, Diaz *et al.*, 2010), gelatina de bovino (147 °C, Raman *et al.*, 2010).

Por otro lado, se sabe que los sistemas alimentarios de alto peso molecular como las proteínas y los almidones, regularmente presentan valores de Tg superiores a la temperatura de 50 °C (Forssel *et al.*, 1997; Fitzpatrick *et al.*, 2007; Sablani *et al.*, 2010). Cabe mencionarse que el valor de Tg encontrado para los escamoles liofilizados se encuentra dentro del rango de Tg de 50 a 120 °C reportados para proteínas de origen animal con contenidos de humedad no congelable recopilados por Sablani *et al.*, (2010).

4.3.3 Análisis calorimétrico de lípidos extraídos en escamol liofilizado.

Algunas muestras de escamol liofilizado fueron sometidas a diversos lavados con acetona con la finalidad de extraer los lípidos presentes en dichas muestras para su posterior análisis mediante DSC. Un protocolo calorimétrico similar al utilizado en muestras liofilizadas fue requerido. A manera de ejemplo, la Figura. 4.4 muestra alguno de los resultados obtenidos. Se pueden observar claramente un pico exotérmico que corresponde a la cristalización de los ácidos grasos del escamol cuando la muestra fue enfriada desde la temperatura ambiente hasta -90 °C y dos picos endotérmicos, uno bien definido y otro ligeramente definido cuando la muestra fue calentada desde -90 °C hasta la temperatura ambiente. Sin embargo, para los intereses perseguidos en este trabajo, solamente los dos picos observados durante el calentamiento fueron analizados. De esta manera fueron determinadas las temperaturas de fusión de -6.5 °C y 15.1 °C. Puede notarse que el valor de -6.5 °C fue muy cercano al valor de -7.2 ± 0.5 °C determinado a partir del pico endotérmico presentado por las muestras liofilizadas. Lo anterior confirma entonces que el primer pico endotérmico observado en la Figura 4.3 le corresponde al punto de fusión de la fase lipídica conformado principalmente por el ácido el ácido linoleico y la temperatura de 15.1 a la proporción de ácido oleico tal y como fue considerado previamente en la sección 4.3.2.

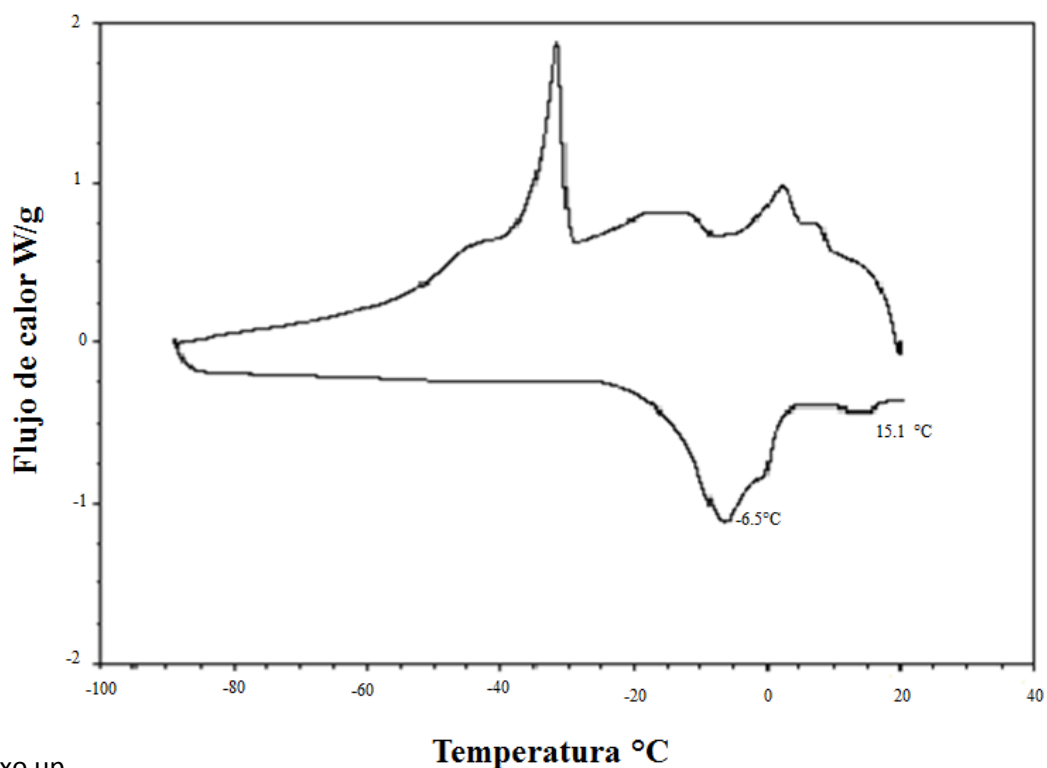


Figura 4.4 Termogramas DSC analizados para la determinación de T_m de la fase lipídica extraída del escamol.

4.3.4 Análisis térmico en muestras de escamol con agua congelable

La temperatura de fusión del hielo (T_m), así como las temperaturas correspondientes al punto de máxima congelación-concentración (T_g' , T_m'), fueron principalmente determinados en muestras de escamol acondicionados con contenidos de humedad en un rango de 25 a 75 % (b.h.), de tal manera que se garantizara la formación de hielo en las muestras cuando éstas fueran enfriadas. Tal y como fue indicado en la sección de materiales y métodos (Sección 3.6), el punto de fusión (T_m), fue considerado como la temperatura del pico endotérmico, mientras que T_g' y T_m' fueron, respectivamente reconocidos como el primer y segundo, cambio continuo característicos de una transición de estado observados en el flujo de calor cuando las muestras fueron calentadas, apoyándose con el software profesional (Análisis universal, TA, versión 4.4.A). Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 4.5.

Cabe indicar que todas las muestras presentaron un pico exotérmico cuando éstas fueron enfriadas a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un pico endotérmico cuando fueron calentadas de $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta temperatura ambiente, aunque por cuestiones prácticas ambos picos están solamente indicadas en las Figuras 4.5a, 4.5b y 4.5c. En la literatura, ha sido establecido que la temperatura de congelación es la temperatura en la cual el primer cristal de hielo aparece, y es un momento en donde ambas fases, líquido (agua) y sólido (cristal de hielo), coexisten en equilibrio (Rahman, 2006; Rahman *et al*, 2005). Por lo tanto, si los procesos de congelación y fusión, son considerados completamente reversibles, desde el punto de vista termodinámico, la temperatura de congelación debería ser igual a la temperatura de fusión del hielo (Rahman, 2006; Rahman *et al*, 2005).

Sin embargo, puede notarse en las Figuras 4.5a, 4.5b y 4.5c, que los valores de temperatura obtenidos de los picos exotérmicos son completamente distintos a los valores obtenidos de los picos endotérmicos. Esta disparidad podría estar influenciada por la diferencia entre la velocidad de enfriamiento ($20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y la velocidad de calentamiento ($5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Sin embargo, el proceso de cristalización involucra un arreglo de las moléculas desordenadas hacia una estructura cristalina completamente ordenada, requiriendo un arreglo inicial de un poco de moléculas para formar un núcleo estable y para el posterior crecimiento de los cristales, por lo que el valor de temperatura obtenido de la exoterma de cristalización siempre será menor que el valor de temperatura obtenido del endoterma de fusión. Debido a lo anterior, en la literatura se recomienda que el punto de congelación y/o fusión del hielo, se determine a partir de un endoterma de fusión como T_m y no a partir de un exoterma de cristalización, tal y como fue considerado en este trabajo.

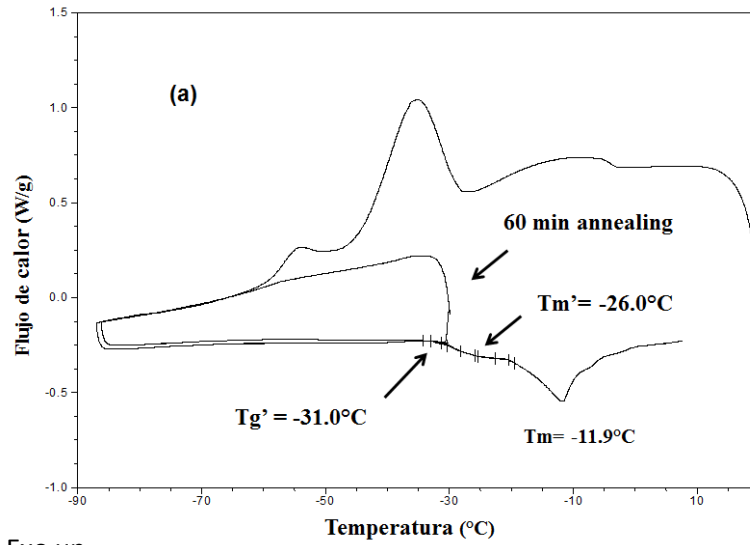
La Figura 4.5 (a-g) muestra que el valor de T_m varió desde $-11.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-1.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando el contenido de agua fue variado desde 25 a 72 % (b.h.), observándose claramente la depresión del punto de congelación por la presencia de solutos. Mientras mayor fue el contenido de sólidos menor fue la temperatura de congelación. La incorporación de solutos en un medio acuoso incrementa la complejidad de la cristalización lo que reduce la presión parcial del agua y por tanto el equilibrio entre las fases (sólido-líquido) puede ser alcanzada solamente con una disminución de la temperatura, causando de esta manera la depresión del punto de congelación (Rahman, 2006; James *et al.*, 2009; Marella y Muthukumarappan, 2013).

T_m' ha sido interpretada como punto final de congelación, y junto con T_g' representan las temperaturas del punto de máxima concentración por congelación y por lo tanto ambos valores deberán ser independientes del contenido de humedad de las muestras. Es decir, que teóricamente, tanto T_m' como T_g' deberán presentar valores constantes en todo el rango de humedad congelable (Orlien *et al.*, 2003; Roos, 2010; Slade y Levine, 1986). Sin embargo, fue observado que solamente el valor de T_m' tendió a ser más o menos constante ya que varió desde $-26\text{ }^\circ\text{C}$ a $-19.8\text{ }^\circ\text{C}$ mientras que T_g' varió desde -42.3 a $-28.9\text{ }^\circ\text{C}$ en el rango de humedad estudiado. Comportamientos similares han sido observados en diferentes alimentos con alto contenido de proteínas (Slade y lavine, 1987; Rahman *et al.*, 2003; Sablani *et al.*, 2007; Akkose y Aktas, 2008).

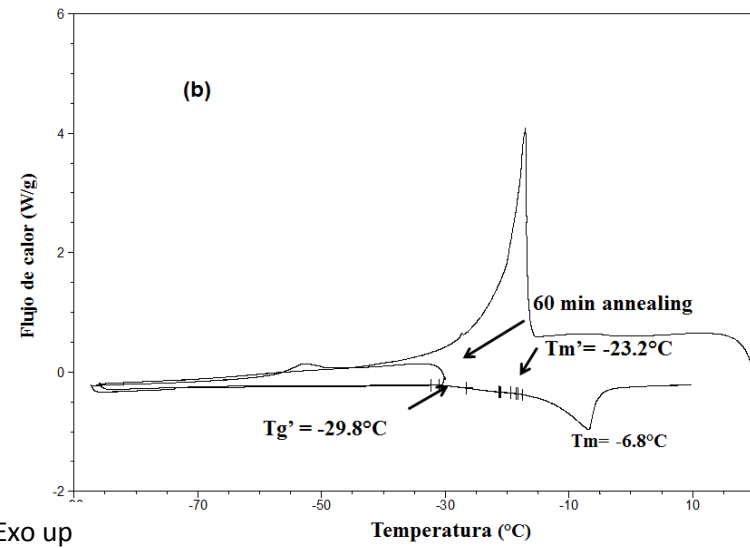
Existen diversas hipótesis para explicar la variabilidad de T_g' o T_m' con el contenido de humedad, en la que se incluye la incompatibilidad de los diferentes solutos en una mezcla, atrapados en torno a un desequilibrio de fase o sin nucleación de cristales de hielo, reduciendo la movilidad de algunos componentes (Rahman ,2004; Goff *et al.*, 2003). En este trabajo fue notado que la determinación de T_g' siempre fue más difícil en matrices complejas como el escamol que en soluciones de azúcares. Sin embargo, la mayoría de los autores han optado por establecer que el primer evento térmico describe una desvitrificación parcial del sistema (T_g') y el segundo evento representa la transición vítrea de máxima congelación concentración y ésta puede ser considerada como la temperatura de inicio de fusión de cristales de hielo (T_m') (Ablett *et al.*, 1992; Goff y Sahagian, 1996; Goff *et al.*, 2003; Orlien *et al.*, 2003).

4.3.5 Análisis térmico en muestras de escamol con agua no congelable

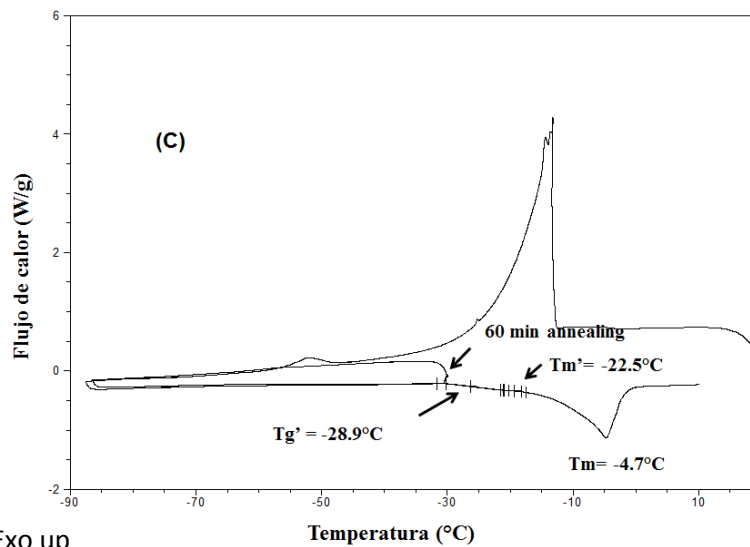
Los termogramas DSC de la Figura 4.6, muestran el proceso de calentamiento desde -30 hasta $160\text{ }^\circ\text{C}$, de tres muestras de escamol con contenidos de humedad no congelable (4, 5.8 y 10 % b.h.). Dos picos endotérmicos, uno alrededor de $-8\text{ }^\circ\text{C}$ y otro alrededor de $135\text{ }^\circ\text{C}$, fueron observados. Es importante señalar que el primer pico no varió con el contenido de humedad, confirmándose de esta manera de que se trata del punto de congelación de la fase lipídica. Mientras que el segundo pico varió desde 129.7 a $136.8\text{ }^\circ\text{C}$ conforme el contenido de humedad en la muestra fue variado. Lo anterior, muestra que la



Exo up



Exo up



Exo up

Figura 4.5. continúa.....

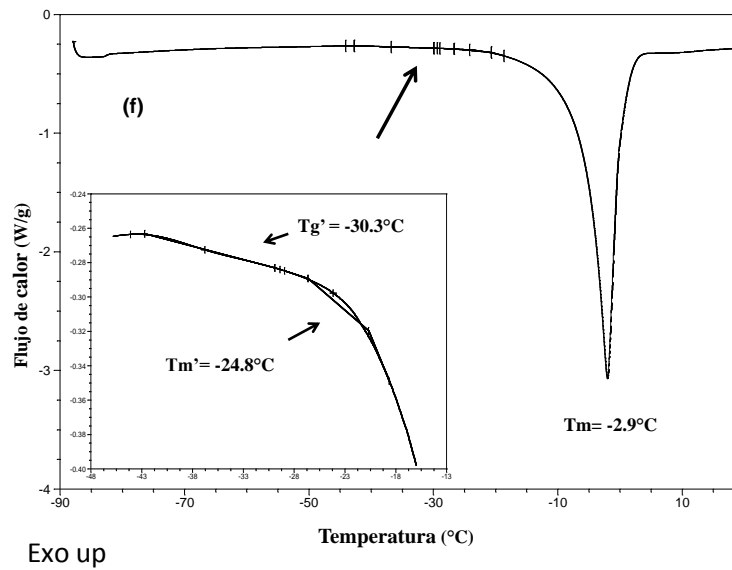
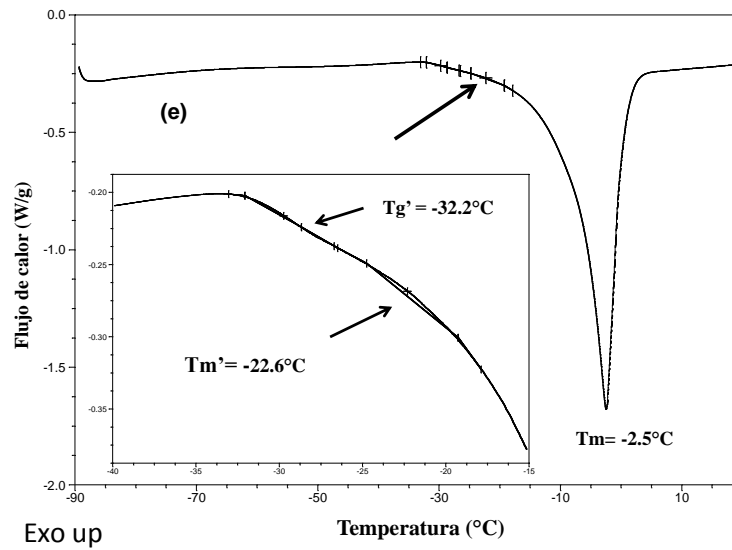
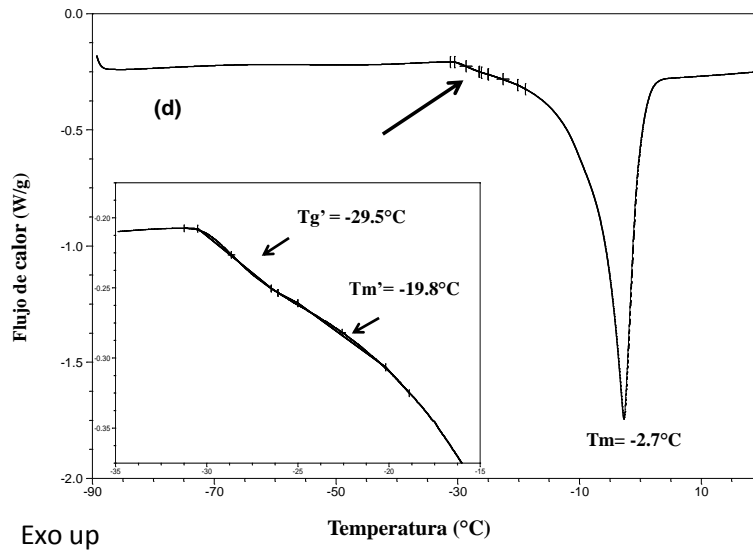


Figura 4.5. continúa.....

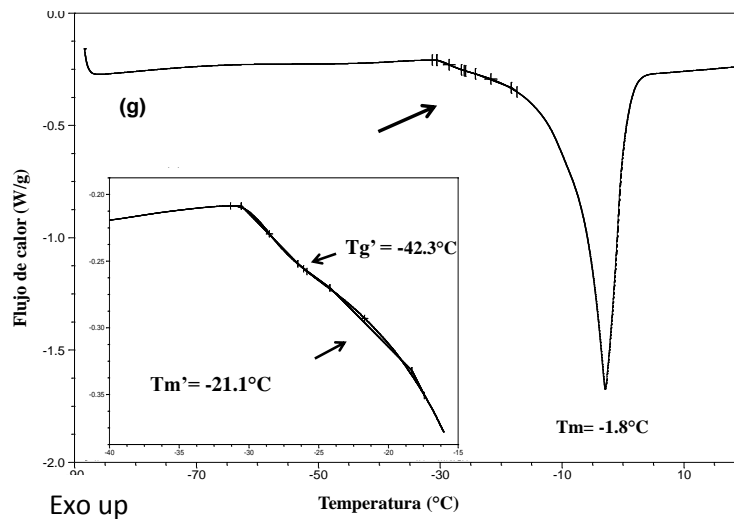


Figura 4.5. Termogramas DSC analizados para la determinación T_g' , T_m' y T_m en escamoles preparados a diferentes contenidos de humedad congelable (% b.h.). (a) 25, (b) 31, (c) 38, (d) 48, (e) 50, (f) 55, (g) 72.

temperatura de desnaturalización de las proteínas (T_d2) se ve ligeramente afectada por la presencia de agua. Sin embargo, en este caso en particular, no pudo observarse una clara tendencia de la manera en que T_d2 fue afectado. Sin embargo, en la literatura se indica que la temperatura de desnaturalización de las proteínas aumenta conforme el contenido de humedad en las muestras es disminuida (Bell y Hageman, 1996; Sanblani *et al.*, 2010).

También se puede observar en la Figura 4.6, que para cualquier nivel de contenido de humedad, las muestras presentaron una transición vítrea bien definida, la cual disminuyó conforme el contenido de humedad fue aumentado, debido al efecto plastificante del agua. Sin embargo, cabe remarcarse que el rango de transición vítrea observado en los escamoles fue mucho más amplio que el rango observado en sistemas ricos en azúcares (Ruiz-Cabrera y Schmidt, 2015; Ruiz-Cabrera *et al.*, 2016). Componentes de bajo peso molecular proporcionan una transición vítrea en un intervalo de temperatura relativamente estrecho (10-20 °C), mientras que los componentes alimenticios de alto peso molecular como las proteínas y almidón exhiben una transición vítrea en un intervalo mucho más amplio (tan amplio como 50 °C) (Sablani *et al.*, 2010). También se ha señalado en la literatura que las transiciones vítreas a menudo se extienden sobre un rango de temperatura debido a una amplia distribución de los tiempos de relajación o a las transiciones no resueltas de los diferentes componentes así como la heterogeneidad del peso molecular de los componentes en la mezcla (Gontard y Ring, 1996; Le Meste *et al.*, 2002).

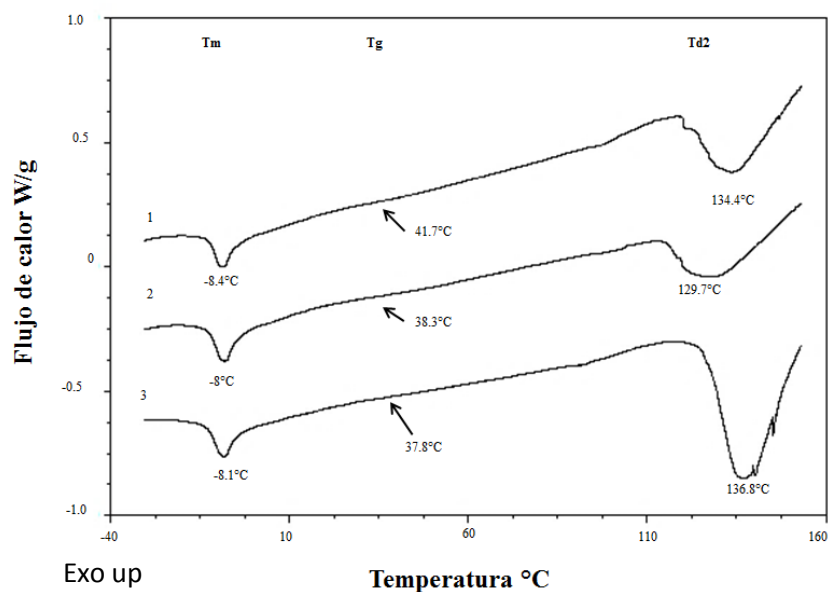


Figura 4.6. Termogramas DSC analizados para la determinación de Tm, Tg y Td2 en escamoles preparados con diferentes contenidos de agua no congelable (% b.h.). (1) 4, (2) 5.8, (3) 10.

4.4 Variación de la temperatura de desnaturalización (Td2) en función del contenido de humedad en las muestras

Las proteínas son los bloques fundamentales de la vida. Involucran diferentes funciones de los sistemas vivos. Los enlaces por los que están unidos los aminoácidos para formar las proteínas son enlaces covalentes denominados enlaces peptídicos (Frauenfelder, 2010). El comportamiento esperado en las proteínas cuando existe una eliminación de agua por liofilización y/o atomización es la formación de una matriz amorfa, donde la movilidad molecular y cambios conformacionales de las proteínas se ven disminuidas lo cual promueve a la desnaturalización así como el entrecruzamiento por puentes de disulfuro o de agregación vías puentes de hidrogeno (Slade y Levine, 1991).

En la Figura 4.7, se muestra en un termograma DSC la variación de la temperatura de desnaturalización de proteínas (Td2) de muestras de escamol preparados a diferentes contenidos de humedad. Se puede observar que la temperatura de desnaturalización varió entre 115-148 °C en muestras con contenidos de humedad que variaron entre 4 y 38.3 % (b.h.). Tal y como fue comentado en la Figura 4.6, el valor de Td2 se ve afectada ligeramente por la presencia de agua. Sin embargo, el valor de Td2 no presenta una

tendencia clara en función del contenido de humedad según lo reportado por Sablani *et al.*, (2010) y Bell y Hageman, (1996).

Así también Bell y Hageman, (1996) establecen que aunque las proteínas sean termolábiles, éstas pueden ser estabilizadas en presencia de azúcares o polisacáridos cuando éstos son capaces de formar una matriz vítrea con las proteínas. El escamol posee dentro de su constitución y en alto porcentaje a la trealosa. La trealosa ha sido ampliamente utilizada para aumentar la estabilidad de enzimas y diversas proteínas de interés biológico (Colaco *et al.*, 1992). Es probable entonces que este azúcar haya participado como un estabilizante en la desnaturalización de las proteínas presentes en los escamoles.

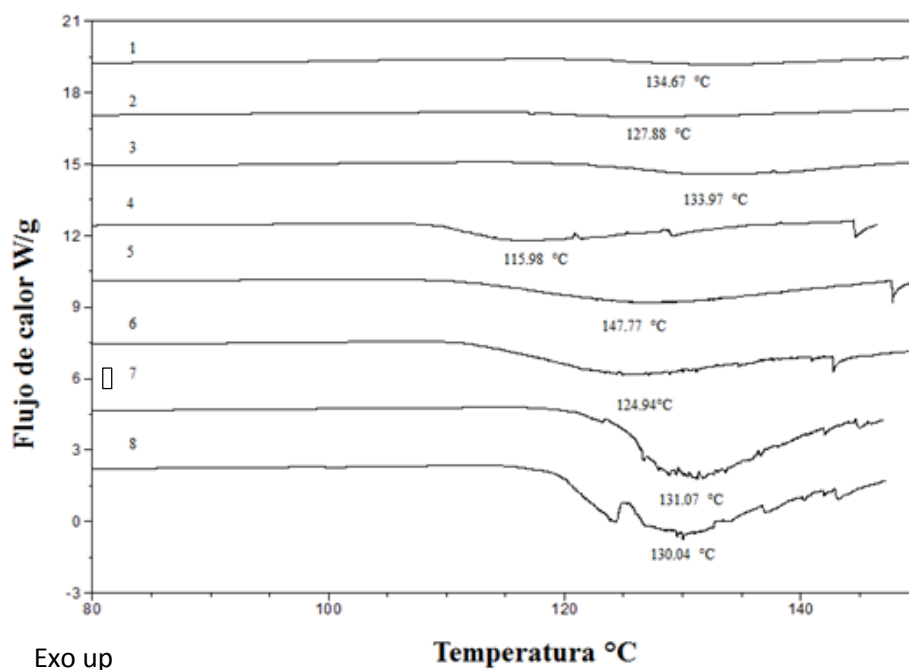


Figura 4.7 Variación de la temperatura de desnaturalización de proteína con el contenido de humedad (%b.h) en muestras de escamoles. (1) 4.04, (2) 5.4, (3) 10.9, (4)15, (5) 20.5, (6) 25, (7) 32.7, (8) 38.33.

Existen diversas teorías tratando sobre el mecanismo de protección de la trealosa a las proteínas o biocomponentes (Kumar y Roy, 2009; Grasmeyer *et al.*, 2013). La más común se denomina “teoría de inmovilización” donde la trealosa es vista como un capullo que atrapa la biomolécula en el interior de una matriz vítrea, como el ámbar atrapa a los insectos. De esta manera, el movimiento de las proteínas está restringido por la matriz de

azúcar. La trealosa tiene la temperatura de transición vítrea más alta de todos los disacáridos su valor se encuentra entre 105 °C -115 °C (Patist y Zoerb, 2004).

En general, la adición de agua a una sustancia amorfa aumenta su movilidad conduciendo a una disminución de Tg. Aunque esta disminución prevista se produce en el caso de la trealosa, el valor Tg es todavía mucho mayor que la sacarosa o maltosa. También en la trealosa amorfa, existen puntos locales de di-hidrato cristalino, con capacidad de atrapar e inmovilizar las moléculas de agua residuales cuando el agua es escasa. Esto, junto con la transición reversible entre el di-hidrato y formas cristalinas anhidras, se propone como un mecanismo por el cual la trealosa atrapa una biomolécula dentro de ella y la protege durante la deshidratación. En el caso de soluciones acuosas, la trealosa interactúa con el agua produciendo enlaces trealosa-agua que son más fuerte que la interacción agua-agua por lo tanto esta unión puede estar relacionada con su capacidad protectora (Jain y Roy, 2008). Esta "desestructuración" de la red de agua por la trealosa y por su ordenamiento las moléculas de agua alrededor de sí mismo no permite la formación de hielo y hace de la trealosa uno de los mejores crioprotectores conocidos. Lo que indica que los disacáridos obstaculizan la cristalización de proteínas por la disminución de la cantidad de agua congelable. La simulación dinámica molecular (MD), ha confirmado que la adición de disacáridos al agua conduce a una reorganización drástica de la red de enlace de hidrógeno del agua y un aumento significativo en la fracción de la formación de la población de enlaces de hidrógeno. En sí, la trealosa no tiene interacción con las biomoléculas que protege, su interacción es con el agua presente ya sea en presencia de agua congelable o no congelable (Jain y Roy, 2008).

4.5 Diagrama de estado

De acuerdo a la literatura un diagrama de estado ayuda en la identificación de la estabilidad de los alimentos durante el almacenamiento, así como la selección de condiciones adecuadas de temperatura y contenido de humedad para su procesamiento (Roos y Karel, 1991; Rahman, 2006). Los diagramas de estado definen los límites de los diferentes estados físicos que un alimento puede presentar en función de la temperatura y concentración de sólidos, igualmente presentan transiciones de estado y de fases asociados. Así mismo estos diagramas contienen información sobre estados de equilibrio o transiciones de primer orden (curva de enfriamiento (T_m vs. x_s) y estados de no equilibrio

o transiciones de segundo orden (curva de transición vítrea (T_g vs. x_s), así como las temperaturas y concentración correspondiente de la solución concentrada en el punto de máxima congelación (T_m' , T_g' y x_s').

En un diagrama de estado la curva T_m representa el equilibrio entre la solución y el hielo formado teniendo un gradiente negativo representando la disminución del punto de congelación con el aumento de la concentración de sólidos. La ecuación de Chen o la ecuación modificada de Clausius-Clapeyron se utilizó para predecir la curva de T_m en función del contenido de sólidos de escamol cuya predicción se presenta en la Figura.4.8. En esta Figura se presentan también a manera de comparación las curvas experimentales y simuladas obtenidas para la fructosa, glucosa y sacarosa.

El valor estimado para E, fue de 0.0322 y el peso molecular efectivo de los sólidos de escamol se estimó como 559.0 se muestran en la Tabla 4.3. Algunos ejemplos de valores reportados para E han sido los siguientes: 0.147 para dátiles (Rahman, 2004); 0.238 para manzanas (Bai *et al.*, 2001); 0.068 para ajo (Rahman *et al.*, 2005); 0.082 para calamar (Slade y Lavine, 1987); 0.071 para atún (Rahman *et al.*, 2003); 0.0275 para pez rey (Sablani *et al.*, 2007) y 0.041 para productos marinos (Akkose y Aktas, 2008), respectivamente. Como puede observarse, los productos a base de azúcar, es decir de bajo peso molecular muestran valores de E más altos, en comparación a los alimentos cuya base son hidratos de carbono no azucarados y/o con alto contenido de proteínas, es decir alto peso molecular (Rahman *et al.*, 2010). Cuanto mayor sea el peso molecular de la matriz menor será el valor de E.

En lo que concierne valor de B, para los escamoles fue encontrado un valor de 0.0174, el cual es relativamente bajo en comparación con otros productos alimenticios como: 0.38 para la carne de atún (Rahman *et al.*, 2003); 0.30 para pez rey (Salami *et al.*, 2007); 0.18 para carne de vacuno (Rahman, 1994).

Las interacciones entre los solutos y el agua, afecta el punto de congelación. Como se ha mencionado anteriormente, el peso molecular de los alimentos influye en la disminución del punto de congelación. El comportamiento producido durante esta disminución es diferente para cada matriz. A manera de ejemplo en la Figura 4.8 se muestra la curva T_m , para diferentes compuestos (glucosa, fructosa y sacarosa) cuyos pesos moleculares son conocidos: 180.16 g/mol, 180.16 g/mol, 342.3 g/mol, respectivamente. En

el caso del escamol, se desconoce su peso molecular pero es de suponerse que es muy superior al de los azúcares previamente mencionado.

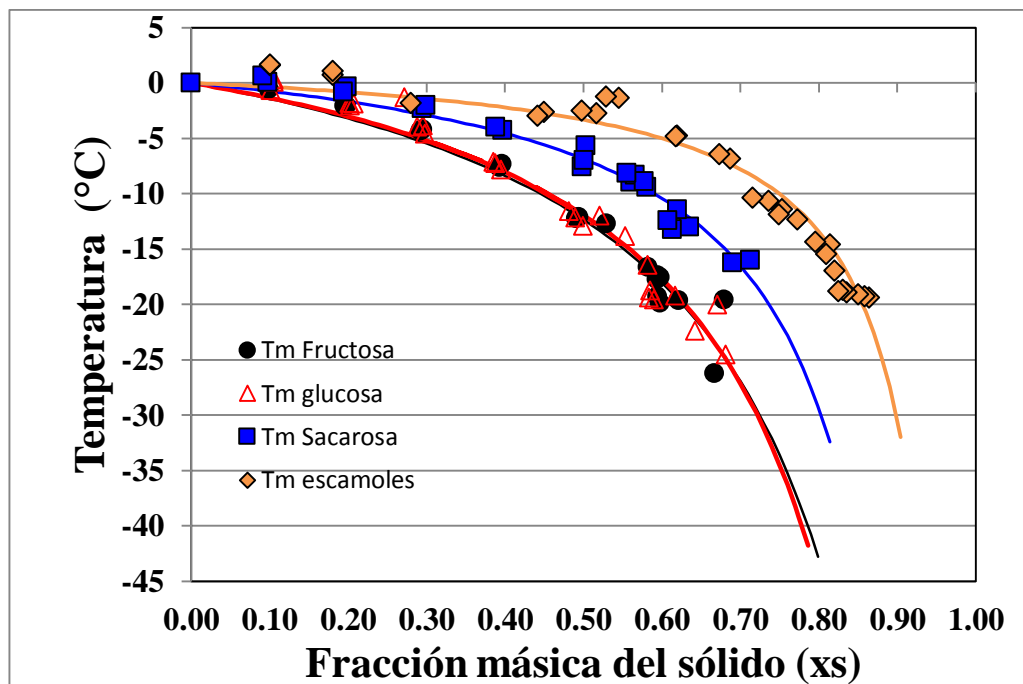


Figura 4.8. Curva Tm en función de la fracción másica para fructosa, glucosa, sacarosa y

El descenso del punto de congelación, es directamente proporcional a la concentración molar de la disolución. Lo cual significa que mientras menor sea el peso molecular del soluto, la disminución del punto de congelación producida será mayor, tal y como se muestra en la Figura 4.8. Se dice que cada mol de partículas de soluto en un kg de agua, produce un descenso del punto de congelación de 1.86 °C (Castellan, 1987). Esta proporcionalidad entre el descenso crioscópico y molalidad permite determinar con precisión la concentración de partículas de soluto midiendo la temperatura a la cual se congela la solución.

El fenómeno de congelación se debe a la agregación de las moléculas, las cuales se van acercando paulatinamente, disminuyendo así el espacio intermolecular que las separa hasta que la distancia es tal que se forme el sólido. Cuanto mayor sea el peso molecular del soluto, la temperatura de congelación será más cercana a cero ya que la distancia entre las

moléculas de agua que las separa es menor debido a que la cantidad de partículas presentes en un mol disuelto es menor (Castellan, 1987). Este acercamiento se debe a que el movimiento molecular se va haciendo menor debido a la disminución de la temperatura lo que provoca que la energía cinética de las moléculas sea menor.

En el caso de sistemas de bajo peso molecular como fructosa, glucosa y sacarosa, se requiere superar una distancia más grande entre las moléculas de disolvente para formar el sólido. Se requiere mayor cantidad de energía para ordenar sus moléculas y pasar al estado sólido, por tanto, la temperatura de la disolución debe disminuir por debajo del punto de congelación del disolvente puro para poder ser congelada (MacDonald y Lanier, 1997). Puede notarse en la Figura 4.8, que existe una tendencia de como varía el punto de congelación en función del contenido de humedad y en función del peso molecular de los sistemas. Los valores de T_m en escamoles siempre fueron mayores en todo el rango de humedad seguido por los valores de T_m de la sacarosa.

Los parámetros calculados con el modelo de Gordon-Taylor se muestran también en la Tabla 4.3. Los valores de Gordon-Taylor para T_{gs} y k que se encontraron fueron 111.6°C y 13.1 , respectivamente. Un valor de k de 5.01 fue reportado para músculo de jurel (Qi-Long *et al.*, 2009); 2.89 para atún (Rahman *et al.*, 2003); 5.30 para camarón (Qi-Long *et al.*, 2015) y 6.06 para gelatina de bovino (Rahman *et al.*, 2010).

El parámetro k , es una medida de la interacción entre el agua y los sólidos de los alimentos. Por lo tanto, valores de k más grandes en una mezcla de alimentos indica que los sólidos son más plastificados (Qi-Long *et al.*, 2015). Con respecto al valor de $T_{gs} = 111.6^\circ\text{C}$, este valor se encuentra en el mismo orden de magnitud de T_g reportados para el músculo de jurel (154.4°C , Qi-Long, 2009), salmón (156°C , Diaz *et al.*, 2010), gelatina de bovino (147°C , Raman *et al.*, 2010).

Con los datos obtenidos tanto en la zona de agua congelable y no congelable se construyó el diagrama de estado para escamol, el cual se presenta en la Figura 4.9. El diagrama de estado obtenido presenta un comportamiento similar para sistemas alimenticios de origen animal como el músculo de jurel (Qi-Long, 2009), salmón (Diaz *et al.*, 2010), camarón (Qi-Long *et al.*, 2015) gelatina de bovino (Raman *et al.*, 2010). El punto de máxima congelación-concentración fue calculada por (1) extrapolación en la intersección de la curva T_m hasta la curva de transición vítrea, $x_s'=0.9039$; (2) intersección

entre las curva T_m y el valor medio de T_m' , $x_s'=0.8705$ y por último la (3) intersección línea T_g y el valor medio de T_g' , $x_s'=0.9039$. De los tres métodos gráficos utilizados dos coinciden (1) y (3). De esta manera, un valor de $x_w'=1-0.9039 = 0.0961$ kg agua/kg total puede ser establecido para el escamol. Es importante señalar que dicho valor es muy inferior a los valores de agua no congelable ($x_w'\approx 0.096$) reportado para sistemas ricos en azúcares.

Tabla 4.3 Parámetros de la ecuación de Clausius-Clapeyron, ecuación de Gordon-Taylor y en la máxima concentración-congelación obtenidos para escamol *Liometopum apiculatum*.

		Ecuación Clausius-Clapeyron			Ecuación Gordon-Taylor	
Parámetro	E	B	R ²	T _{gs}	K	R ²
Valor	0.0322	0.0174	0.966	111.6	13.1	0.902

Máxima concentración-congelación						
Parámetro	T _{g'} (°C)	T _{m'} (°C)	x _{s'}	x _{s''}	x _{s'''}	x _{w'}
Valor	-30.9	-22.7	0.9039	0.8705	0.9039	0.096

Los valores de x_s', x_s'', x_s''' se reportaron en (kg sólidos/kg total) y x_w' en (kg agua/kg total)

Entonces como condiciones en el punto de máxima concentración-congelación fueron encontrados un valor de $T_g' = -30.9$ °C, $T_m' = -22.7$ °C y $x_s' = 0.9039$ kg sólidos/kg total. Valores superiores de x_s' puede ser considerado como agua no congelable (Rahman *et al.*, 2005). La congelación del agua o formación de hielo será solo posible cuando la concentración de soluto en la solución sea inferior a x_s' permitiendo establecer las condiciones adecuadas para este alimento tanto en las zonas de agua congelable como en el agua no congelable. A concentraciones de soluto cercanas a x_s' , existe un incremento de la viscosidad, de esta manera viscosidades altas retrasan la formación de hielo y por lo tanto inhiben la máxima congelación-concentración

La determinación de agua no congelable es más aceptable y precisa cuando la intersección de T_m con la línea de T_m' es utilizada en el diagrama de estado, ya que este es

el punto real cuando es posible que el agua se congele y se forme el hielo. La utilización de un *annealing* podrían favorecer la medición de T_m' , es decir, manteniendo la muestra a una temperatura específica para una duración predeterminada (Rahman *et al.*, 2010), como fue el caso de la matriz de escamol

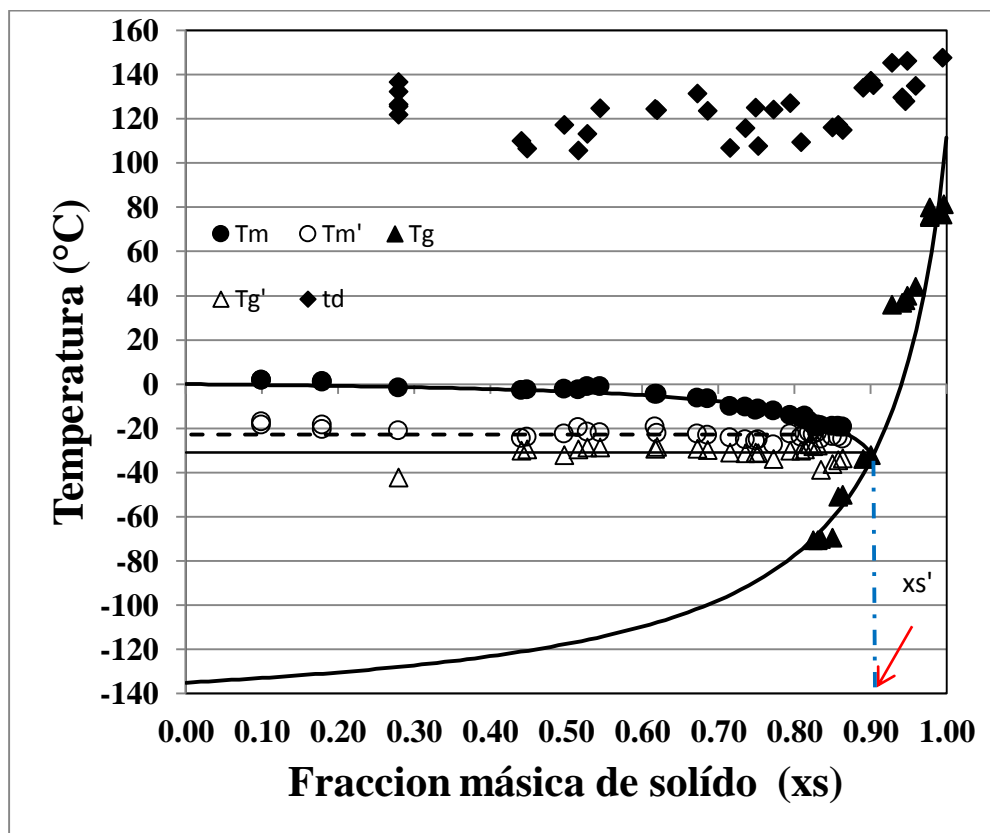


Figura 4.9 Diagrama de estado elaborado para la conservación y procesamiento del escamol.

.. Con base al valor promedio de $T_g' = -30.9$ °C obtenido a partir de la Figura 4.9, se demuestra que la temperatura que se maneja de manera industrial para la conservación de alimentos de -18 °C no asegura la congelación total del agua de este producto y por ende el estado vítreo de la solución crio concentrada no se produce. Si la velocidad de congelación es suficiente para formar cristales pequeños de hielo pero la temperatura final no es la adecuada, el alimento será susceptible a fenómenos de recrystalización de hielo o de crecimientos progresivos de los cristales, así favoreciendo los procesos deteriorativos que son activados en la presencia de agua líquida así como la ruptura o debilitamiento de la

estructura del alimento, este tipo de problema es el que actualmente este producto presenta dado que de acuerdo a lo antes mencionado la temperatura de congelación utilizada no es la correcta. Entonces, para una conservación adecuada del escamol, este debe almacenarse a una temperatura de congelación por debajo de $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$, asegurando así la inmovilización completa del agua no congelada y evitando posibles daños estructurales en el proceso de descongelación.

4.6 Cambios estructurales externos

La estructura externa del escamol descongelado se muestra en la Figura 4.10, después de ser almacenados durante 3 semanas a diferentes temperaturas de congelación (-20 , -35 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Como puede observarse en dicha Figura, la estructura externa de las larvas de hormiga se pierde después de ser congelados a -20°C , debido a que esta temperatura es superior a la T_g' (-31°C) reportada en el diagrama de estado para este producto. Esta temperatura promueve la formación de cristales de hielo de mayor tamaño y al ser descongelados dichos cristales rompen la estructura del escamol liberando el líquido interno del mismo, disminuyendo su calidad. De esta manera la textura del producto se ve reducida durante el proceso de descongelación, produciendo una disminución de su volumen y degradando los pigmentos que le proporcionan un color amarillo apalado característico de este producto. En la literatura ha sido demostrado que el crecimiento del cristal durante la congelación causa daños en las proteínas, lípidos y en la microestructura los cuales son los que promueven los cambios en la apariencia y textura de los alimentos congelados (Kaale *et al.*, 2011). La estructura externa de los escamoles almacenados a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ puede ser observada en la Figura 4.10, a diferencia de lo observado en los escamoles que fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó que la estructura de los escamoles permaneció intacta, es decir con una buena apariencia y sin cambios en la textura de los mismos. Cabe hacer mención que después de la descongelación el producto conservó las características de un escamol fresco.

Lo anterior corrobora lo propuesto en el diagrama de estado (Figura 4.9) y lo reportado en la literatura, donde se indica que la temperatura de congelación de sistemas alimentarios con alto contenido de humedad deber ser por debajo de T_g' , ya que a esta temperatura el material alimenticio se encuentra en los estados físicos de hielo, vidrio y soluto (Nelson y Labuza, 1994; Roos y Karel, 1991). De esta manera se reduce el tamaño

de los cristales de hielo que se forman así como la actividad de agua. La formación máxima de hielo en los sistemas alimentarios durante la congelación se lleva a cabo cuando los sistemas se almacenan entre su T_m' y T_g' , los cuales se encuentran por debajo de su temperatura de transición de transición vítrea. Así mismo la estructura de los escamoles almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ conservaron las características típicas de un escamol fresco después de la descongelación. Por lo tanto, los escamoles pueden ser almacenados en congelación a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ conservando las características de escamol fresco deseadas por el consumidor.

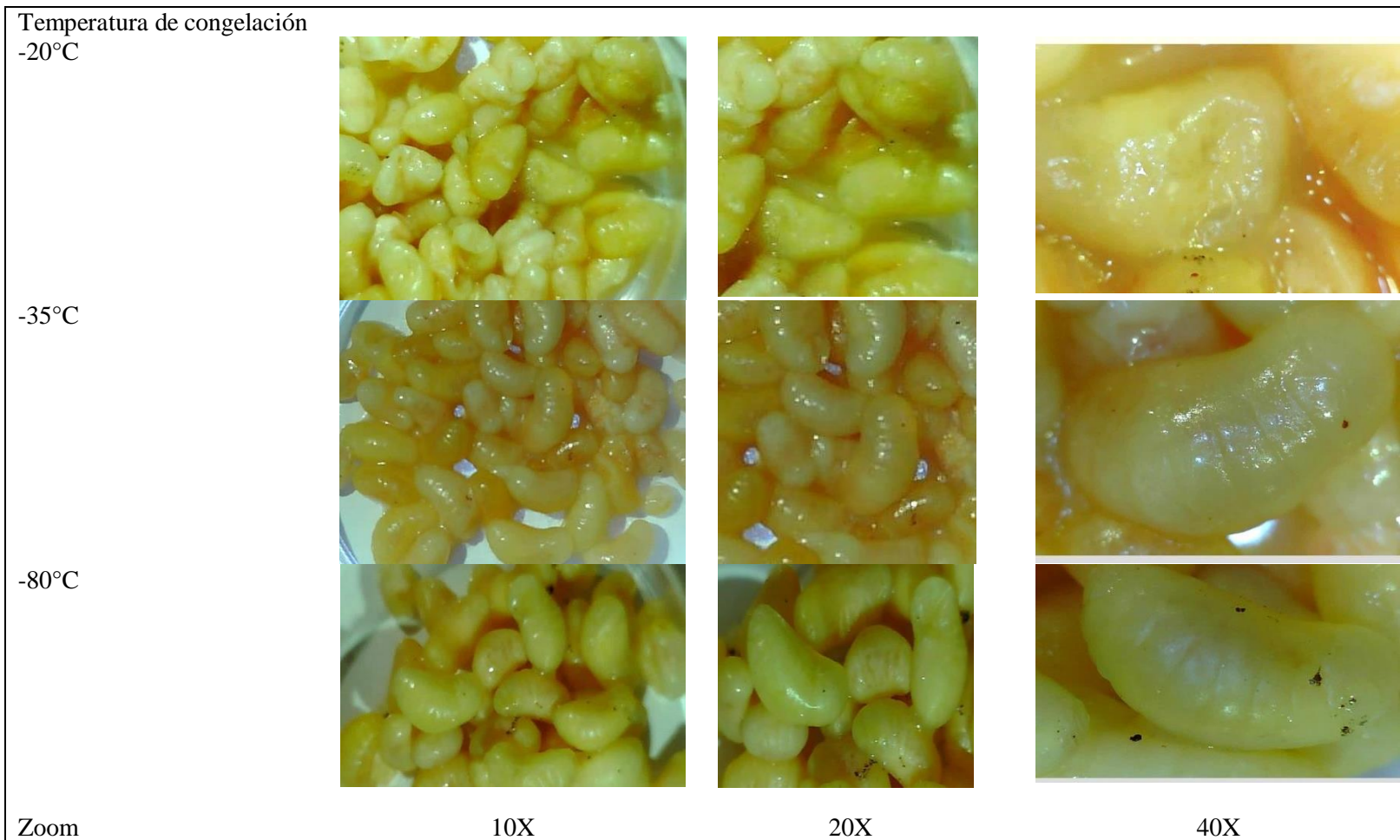


Figura 4.10 Evaluación de los cambios estructurales externos en escamoles después de ser almacenado a -20 °C, -35 °C, y -80 °C y posteriormente descongelados a 4 °C.

5. CONCLUSIONES

El método calorimétrico utilizado de enfriamiento a -90°C y posterior calentamiento hasta 160°C fue adecuado para la determinación de los puntos de congelación (T_m , T_m'), temperaturas de transición vítreas (T_g , T_g') y temperaturas de desnaturalización (T_d) en muestras de escamoles preparados a diferentes contenidos agua.

Un proceso de *annealing* a $T_m'-1^{\circ}\text{C}$ y 60 min fue requerido para el análisis térmico de muestras con contenidos de humedad iguales o inferiores a 40% (b.h.).

Tres transiciones térmicas de primer orden correspondientes al punto de congelación del agua ($T_m=1.2^{\circ}\text{C}\pm 0.5$), a la desnaturalización de enzimas ($T_{d1}=62.5^{\circ}\text{C}\pm 3.9$) y desnaturalización de proteínas con enlaces disulfuro ($T_{d2}=126.5^{\circ}\text{C}\pm 5.3$) fueron observados en escamoles frescos.

Las muestras deshidratados a un contenido de humedad del 2.2% (b.h.), el pico asociado a la desnaturalización de enzimas (T_{d1}) no fue percibido pero permitió caracterizar a la temperatura de transición vítrea $T_g = 61.6\pm 6.4^{\circ}\text{C}$.

La temperatura de desnaturalización de la proteína (T_{d2}) varió muy poco y con una tendencia no clara cuando el contenido de humedad fue variado en las muestras de escamoles.

El modelo modificado de Clausius-Clapeyron y el modelo de Gordon-Taylor describieron de manera adecuada ($R^2>0.90$), la variación del punto de congelación y la variación de la temperatura de transición vítrea en función del contenido de sólidos.

El diagrama de estado elaborado para el escamol mostró que la fracción másica de agua no congelable fue de 0.0961 kg agua/kg total con valores de $T_g' = -30.9^{\circ}\text{C}$, $T_m' = -22.7^{\circ}\text{C}$. Por lo tanto, se recomienda una temperatura de congelación del orden de los -35°C para garantizar una cristalización completa del agua congelable y evitar así daños estructurales durante la descongelación en escamoles.

El diagrama de estado propuesto en esta investigación, puede ser utilizado de forma adicional para predecir los procesos de deshidratación así como para el almacenamiento de escamol deshidratado.

6. BIBLIOGRAFIA

- Akkose A, Aktas N. Determination of glass transition temperature of beef and effects of various cryoprotective agents on some chemical changes. *Meat Science*. 2008;80:875–878.
- Ablett S, Izzard MJ, Lillford PJ. Differential scanning study of frozen sucrose and glycerol solutions. *Journal of the Chemical Society*. 1992;88(69):789-794.
- Alzamora S. Alimentos conservados por factores combinados. *Temas en tecnología de alimentos*. Editorial Alfaomega. 2002;1:45-88.
- Angell CA. Perspective on the glass transition. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 1988;49:863-871.
- Archer M, Edmonds M, George M. *Seafood Thawing, Seafish*, 2008. 2-11p.
- Bai Y, Rahman MS, Perera CO, Smith B, Melton LD. *Food Research International*. 2001;34:89–95.
- Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G. The regulation of trehalose in insects. *Experientia*. 1996;52(5):433-439
- Bell LN, Bell HM, Glass TE. Water mobility in glassy and rubbery solids as determined by oxygen-17 nuclear-magnetic resonance: impact on chemical stability. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 2002;35(2):108–113
- Bell LN, Hageman MJ. Glass transition explanation for the effect of polyhydroxy compounds on protein denaturation in dehydrated solids. *Journal of Food Science*. 1996;61(2):372-375.
- Bengoechea C, Arrachid A, Guerrero A, Hill SE, Mitchell JR. Relationship between the glass transition temperature and the melt flow behavior for gluten, casein and soya. *Journal of Cereal Science*. 2007;45:275–284
- Berk Z. *Food Process Engineering and Technology*. A volume in *Food Science and Technology*. 2º Edición . 2013. P. 439–460.
- Bhandari BR, Howes T. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*. 1999;40:71–79
- Biliaderis CG, Swan RS, Arvanitoyannis I. Physicochemical properties of commercial starch hydrolyzates in the frozen state. *Food Chemistry*. 199;64(4):537–546

- Blond G, Simatos D, Catte M, Dussap CG, Gros JB. Modeling of the water-sucrose state diagram below 0 degrees C. *Carbohydrates Research*. 1997;298:139–145.
- Buera MP, Chirife J, Karel M. A study of acid-catalyzed sucrose hydrolysis in an amorphous polymeric matrix at reduced moisture contents. *Food Research International*. 1995;28(4):359–365
- Castellan GW. *Fisicoquímica*. Pearson Educación. 2° edición. 1987. Pp. 3003-306.
- Castillo-Andrade A, Garcia-Barrientos R, Ruiz-Cabrera MA, Rivera-Bautista C, Pérez- Martinez JD, González-García R, Fuentes-Ahumada C, Grajales-Lagunes A. Structural and physicochemical changes due to proteolytic deterioration of escamoles (*Liometopum apiculatum* M) a traditional Mexican food. *Journal of Insect as Food and Feed*. In press. 2015.
- Castillo-Lara P, Aguirre-Rivera JR. Platos gourmet del altiplano: Escamoles. *Revista " El Cenzontle" SEDARH, Gobierno del estado de San Luis Potosi*. 2008;3(2):8.
- Chang R. *Química*. Mc Graw Hill Interamericana. 9° edición. 2007. P.186.
- Chen CR, Ramaswamy HS. Visual basics computer simulation package for thermal process calculations. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2007;46:603–613.
- Colaço CALS, Roser B. Trehalose — a multifunctional additive for food preservation. In: Mathlouthi, M. (Ed.). *Food Packaging and Preservation*. Blackie Professional. London. 1995. pp. 123–140.
- Collares FP, Kieckbusch TG, Finzer JRD. Review: glass transition in food products. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2002;5:117-130.
- Cordella C, Antinelli JF, Aurieres C, Faucon JP, Cabrol-Bass D, Sbirrazzuoli N. Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50:203–208.
- Costa-Neto EM. Insectos como fuente de proteína para el hombre:valorización de recursos repugnantes. *Interciencia*. 2003;28(3):136-140.

- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Wistrom CA, Spargo BJ, Anchordoguy TJ, Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1988;947:367–384.
- Cupane A, Bellavia G, Giuffrida S, Cottone G, Cordone L. A calorimetric study of ternary protein-trehalose-water systems: matrix glass transition and protein thermal denaturation. In *Dynamic Crossover Phenomena in Water and other Glass-forming Liquids*. IT. 2010.
- Cyprian O, Lauzon H, Johannsson R, Sveinsdottir K, Arason S, Martinsdottir E. Shelf life of air and modified atmosphere-packaged fresh tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets stored under chilled and superchilled conditions. *Food Science Nutrition*. 2012. Pp.130–140.
- Diaz P, Lòpez D, Matiacevich S, Osorio F, Enrione J. State diagram of salmon (*Salmo salar*) gelatin films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011;91:2558-2565.
- Donnamaria MC, Howard EI, Grigera JR, Interaction of water with α,α -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions*. 1994;90:2731–2735.
- Duun SA, Rustad T. Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. 2007;105(3):1067-1075.
- Farkas J, Mohacsi-Farkas C. Application of differential scanning calorimetry in food research and food quality assurance. *Journal Thermal Analysis* 1996;47:1787–1803.
- Farkas J. *Metodos fisicos de conservacion de alimentos en: Microbiología de Alimentos*. Editorial Acribia. España. 2001. Pp. 526.
- Fitzpatrick JJ, Hodnett M, Twomey M, Cerqueira PSM, O’Flynn J, Roos YH. Glass transition and the flowability and caking of powders containing amorphous lactose. *Powder Technology*. 2007;178:119–128
- Forssell PM, Mikkila JM, Moates GK, Parker R. Phase and glass transition behavior of concentrated barley starchglycerol- water mixtures, a model for thermoplastic starch. *Carbohydrates Polymer*. 1997;34:275–282

- Foster KD, Bronlund JE, Paterson AHJ. Glass transition related cohesion of amorphous sugars powders. *Journal of Food Engineering*. 2006;77:997-1006.
- Franks F. Unfrozen water yes unfreezable water hardly bound water certainly not. *Cryoletters*. 1986;7(4):207–211
- Frauenfelder H. Myoglobin as an example of protein complexity. *Chemical Physics* 201;375(2-3):612-615.
- Gallart-Jornet L, Rustad J, Barat JM, FitoP, Escriche I. Effect of superchilled storage on the freshness and salting behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Food Chemistry*. 2007;103(4):1268-1281.
- García-Muñoz MS. Identificación y cuantificación de Biomoléculas en Escamoles. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Bioprocesos. 2016.
- García-Pérez YV, Barrera-García D. Análisis químico y nutricional de tres insectos comestibles de interés comercial en la zona arqueológica del municipio de San Juan Teotihuacán y en Otumba, en el Estado de México. *Interciencia*. 2012;37(12): 914-920.
- Goff HD, Caldwell KB, Stanley DW, Maurice TP. The influence of polysaccharides on the glass-transition in frozen sucrose solutions and ice-cream. *Journal of Dairy Science*. 1993;76:1268–1277.
- Goff HD, Sahagian ME. Glass transitions in aqueous carbohydrate solutions and their relevance to frozen food stability. *Thermochimica Acta*. 1996;280/281:449–464
- Goff HD, Verrespej E, Jermann D. Glass transition in frozen sucrose solution and influenced by solute inclusions within ice crystals. *Thermochimica Acta*. 2003;399:43-55.
- Gontard N, Ring s. Edible wheat gluten film: Influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996;44:3474–3478.
- Gordo-Villoslaba S. Use of calix arenes to recover the self-assembly ability of mutated tetramerization domains, Barcelona. 2008. 57p.

- Goswami TK, Gupta SK. Detection of dilution of milk with the help of glass transition temperature by differential scanning calorimetry (DSC). *African Journal of Food Science*. 2008;2:7–10.
- Gould GW. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of food Microbiology*. 1996;33:51-64.
- Hallbrucker A, Mayer E, Johari CP. The heat capacity and glass transition of hiperquenched glassy water. *Philosophical Magazine B*. 1989;60(2):179-187.
- Hartel RW, Shi Y, Smith CM. Compositional effects on milk fat crystallization. *Journal Dairy Science*. 2001;84:2392-2401.
- Hsu CL, Heldman DR, Taylor TA, Kramer HL. Influence of cooling rate on glass transition temperature of sucrose solutions and rice starch gel. *Journal of Food Science*. 2003;68:1970-1975.
- Icoz DZ, Kokini JL. State diagrams of food materials. In: Aguilera JM, Lillford PJ, editors. *In food materials, principles and practice*. New York: Springer; 2008:95-121.
- INEGI. Censo de Población y Vivienda 2010
- INEGI. Estadísticas Sociodemográficas. Población total según sexo 1950 a 2005.
- James C, Seignemartin V, James SJ. The freezing and supercooling of garlic(*Allium sativum* L.). *International Journal of Refrigeration*. 2009;32:253-260.
- Jeremiah L, Gibson L. The influence of storage temperature and storage time on colour stability, retail properties and case-life of retail-ready beef. *Food Research International*. 2001. Pp.815–826.
- Jones KT, Madsen DB. Further experiments in native food procurement. *Utah Archaeology*, 1991;81: 68-77.
- Juárez-Ortega AJ, Ramos-Elorduy J, Pino-Moreno JM. Insectos comestibles en algunas localidades en la región centro del Estado de México: técnicas de recolección, venta y preparación. *Dugesiana* 2012;19(2): 123-133.
- Kaañe LD, Eikevik TM, Rustad T, Kolsaker K. Superchilling of food: A review. *Journal of Food Engineering*. 2011;107:141-146.
- Kaletunc G, Breslauer KJ. Construction of a wheat–flour state diagram: application to extrusion processing. *Journal of Thermal Analysis*. 1996;47(5):1267–1288.

- Karel M, Anglea S, Buera P, Karmas R, Levi G, Roos YH. Stability related transitions of amorphous foods. *Thermochimica Acta*. 1994;246:249–269
- Kasapis S. Definition and applications of the network glass transition temperature. *Food Hydrocolloid*. 2006;20:218-228.
- Katekawa EK, Silva MA. On the influence of glass transition on shrinkage in convective drying of fruits: a case study of banana drying. *Drying Technology*. 2007;25:1659-1666.
- Khalloufi S, El-Maslouhi Y, Ratti C. Mathematical model for prediction of glass transition temperature of fruit powders. *Journal of Food Science*. 2000;65:842-848.
- Knothe G, Dunn RO. A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2009;86:843–856.
- Kokini JL, Cocero AM, Madeka H, De Graaf E. The development of state diagrams for cereal proteins. *Trends in Food Science and Technology*. 1994;5:281-288.
- Krokida MK, Karathanos VT, Maroulis ZB. Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products. *Journal of Food Engineering*. 1998;35:369–380
- Labuza TP, Hyman CR. Moisture migration and control in multi-domain foods. *Trends in Food Science and Technology*. 1998;9:47-55.
- Ladron de Guevara O, Padilla P, Garcia L, Pino JM, Ramos-Elorduy J. Aminoacid determination in some edible Mexican Insects. *Amino Acids*. 1995;9:161-173.
- Lara-Juarez P, Aguirre-Rivera JR, Castillo-Lara P, Reyes Agüero JA. Biología y aprovechamiento de la hormiga de escamoles, *Liometopum apiculatum* Mayr (hymenoptera: formicidae). *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*. 2013;31(2): 251-264
- Le Meste M, Huang V. Thermomechanical properties of frozen sucrose solutions. *Journal of Food Science* 1992;57(5):1230–1233
- Lebail A, Boillereaux L, Davenel A, Hayert M, Lucas T, Monteau JY. Phase transition in foods: effect of pressure and methods to assess or control phase transition. *Innovative Food Science and Emerging*. 2003;4:15-24.
- Lee JW, Thomas LC, Schmidt SJ. Investigation of the heating rate dependency associated with the loss of crystalline structure in sucrose, glucose and fructose

- using thermal analysis approach (part I). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:684-701.
- Leinser L. Food preservation by combined methods. *Food Research international*. 1992;25:151-158.
 - Liu Y, Bhandari B, Zhou W. Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54:5701-5717.
 - Liu Y, Bhandari B, Zhou W. Study of glass transition and enthalpy relaxation of mixtures of amorphous sucrose and amorphous tapioca starch syrup solid by differential scanning calorimetry (DSC). *Journal of Food Engineering*. 2007;81:599-610.
 - Lubbers S, Guichard E. The effect of sugars and pectin on flavor release from a fruit pastille model system. *Food Chemistry*. 2003;81:269-273.
 - MacDonald GA, Lanier TC. Cryoprotectants for improving frozen-food quality, en *Quality in frozen food*, M. Erickson y Y.C. Hung, Editores. Chapman & Hall: New York. 1997. p. 197-232.
 - Maltini E, Torreggiani D, Venir E, Bertolo G. Water activity and the preservation of plant foods. *Food Chemistry*. 2003;82:79–86
 - Marella C, Muthukumarappan K. *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering*. 2° edición. 2013. P. 355–378.
 - Martins R, Lopes V. Modelling supercooling in Frozen Strawberries: experimental Analysis, Cellular Automation and Inverse problem Methodology. *Journal of Food Engineering*, 2007;80(1):126-141.
 - Melo-Ruiz V, Sánchez-Herrera K, Sandoval-Trujillo H, Quirino-Barreda T, Calvo-Carrillo C. Lipids Data Composition of Edible Ant Eggs *Liometopum apiculatum* M. Escamoles. *Journal of Life Sciences*. 2013;7(5) 547-552.
 - Miquel ME, Hall LD. Measurement by MRI of storage changes in commercial chocolate confectionary products. *Food Research International*. 2002;35:993-998.
 - Mitchell JR. *Water and food macromolecules. Functional properties of food macromolecules*. Gaithersburg: Aspen Publishers. 1998.

- Nelson KA, Labuza TP. Water activity and food polymer science: implications of state on arrhenius and WLF models in predicting shelf-life. *Journal of Food Engineering* 1994;22(1–4):271–289
- Orlien V, Risbo J, Andersen ML. The question of high- or low-temperature glass transition in frozen fish. Construction of the supplemented state diagram for tuna muscle by differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51:211-217.
- Osborne DR, Voogt P. Ministry of Agriculture Fisheries and Food Standard Commite, Gran Bretaña. 1985.
- Patist A, Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems, *Colloids and Surfaces Biointerfaces*. 2004;40 :107–113.
- Pearson TR, Dutson AJ, Balley, (Eds.). *Advances in Meat Research: Collagen as a Food*. AVI. New York. 1987. 251–266.
- qi-Long S, Lin W, Zhao Y, Zhang P. Thermal characteristics and state diagram of *Penaeus vanamei* meat with and without maltodextrin addition. *Thermochimica Acta*. 2015;616:92-99.
- Qi-Long S, Ya Z, Hai-Hua C, Zhao-Jie L, Chang-Hu X. Glass transition and state diagram for freeze-dried horse mackerel muscle. *Thermochimica Acta*. 2009;493:55–60
- Rahman MS, Guizani N, Al-Khaseibi M, Al-Hinai SA, Al- Maskri SS, Al-Hamhami K. Analysis of cooling curve to determine the end point of freezing. *Food Hydrocolloids*. 2002;16:653–659.
- Rahman MS, Kasapis S, Guizani N and Al-Amri OS, State diagram of tuna meat: freezing curve and glass transition. *Journal Food Engineering*. 2003;57:321–326.
- Rahman MS, Kasapis S, Guizani N, Al-Amri OS. State diagram of tuna meat: freezing curve and glass transition. *Journal of Food Engineering*. 2003;57:321–326
- Rahman MS, Labuza TP. Water activity and food preservation. *Handbook of Food Preservation*. Second ed. CRC Press. Boca Raton, FL. 2007.
- Rahman MS, Sablani SS, Al-Habsi N, Al-Maskri S, Al-Belushi S. *Journal . Food Science*. 2005;70:E135–E141

- Rahman MS, The accuracy of prediction of the freezing point of meat from general models. *Journal Food Engineering*. 1994;21:127–136.
- Rahman MS. Glass transition and other structural changes in foods. In M. S. Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation*. New York: Marcell Dekker. 1999.
- Rahman MS. In: *Food Properties Handbook*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 1995.
- Rahman MS. *International Journal of Food Properties*. 2004;7:407–428.
- Rahman MS. Stat+A12e diagram of foods: its potential use in food processing and product stability. *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17:129–141.
- Rahman NS, Al-Saidi S, Guizani G, Abdullah A. Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. *Thermochimica Acta*. 2010;509:111–119.
- Ramirez-Garcia GL. *Uso del Metodo de Barreras en la Conservaciòn de Escamoles (Liometopum apiculatum) frescos*. Tesis para obtener el grado de Maestrìa en Ciencias en Bioprocesos. 2012.
- Ramos - Elorduy J, Pino MJM. *Los insectos comestibles en el México antiguo*. México: A. G. T. Editor. 1989.
- Ramos-Elorduy J. Threatened edible insects in hidalgo, mexico and some measures to preserve them. *Journal Ethnobiology*. 2006;2:1-10.
- Ramos-Elorduy J, Pino JM, Cuevas S. Insectos comestibles del estado del Estado de Mexico y determinacion de su valor nutritivo. *Anales de Instituto de Biologia de la UNAM Serie Zoologia*. 1998;69(1):65-104.
- Ramos-Elorduy J, Pino MJM, Conconi M. Ausencia de una reglamentación y normalización de la explotación y comercialización de insectos comestibles en México. *Folia Entomológica Mexicana*. 2006;45: 291-318.
- Ramos-Elorduy J, Pino MJM. Contenido de vitaminas de algunos insectos comestibles de México. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2001;45: 66-76.
- Ramos-Elorduy J, Viejo JL. Los insectos como alimento humano. Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México. *Real Sociedad Española de Historia Ntural Seccion Biología..* 2007;102: 61-84.

- Reid DS, Fennema O. Water and ice. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema O (eds) Fennema's food chemistry, 4th edn. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York. 2007.
- Reid DS, Neel S. Thawing and Tempering, WFLO Commodity Storage Manual. 2008. 1-5p,
- Rhaman MS. Food stability determination by macro-micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature. *Journal of Food Engineering*. 2010;99:402-416.
- Ribeiro C, Zimeri JE, Yildiz E, Kokini JL. Estimation of effective diffusivities and glass transition temperature of polydextrose as a function of moisture content. *Carbohydrate Polymers*. 2003;51:273-280.
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studie. *Food and Chemical Toxicology*. 2002;40:871–898.
- Roos YH, Karel M. Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. *International Journal of Food Science & Technology*. 1991;26:553– 566.
- Roos YH. Characterization of food polymers using state diagrams. *Journal of Food Engineering*; 1995b;24:339-360.
- Roos YH. Frozen state transitions in relation to freeze drying. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 1997;48(3):535–544
- Roos YH. Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Food Science and Technology Research*. 2010;1:469-496.
- Roos YH. Glass transition-related physicochemical changes in foods. *Food Technology*. 1995;49(10):97–102
- Roos YH. Phase transition in foods. San Diego CA, USA: Academic Press. *Food Science and Technology*. 1995a.
- Ruiz-Cabrera MA, De Anda-Salazar A, González-García R, Abud-Archila M, Grajales-Lagunes A. Experimental and simulated thermal properties and process time for canned escamoles (*Liometopum apiculatum*) under sterilization conditions. *CyTA – Journal of Food*. 2015;13(2):188–195.

<http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2014.936512>

- Ruiz-Cabrera MA, Rivera-Bautista C, Grajales-Lagunes A, González-García R, Schmidt SJ. State diagram for mixtures of low molecular weight carbohydrates. *Journal of Food Engineering*. 2016;171:185-193.
- Ruiz-Cabrera MA, Schmidt SJ. Determination of glass transition temperatures during cooling and heating of low-moisture amorphous sugar mixtures. *Journal of Food Engineering*. 2015;146:36-43.
- Rumpold BA, Schlüter OK. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2013;57:802-823.
- Sablani SS, Rahman MS, Al-Busaidi S, Guizani N, Al-Habsi N, Al-Belushi R, Soussi B. Thermal transitions of king fish whole muscle, fat and fat-free muscle by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*. 2007;46:256–63.
- Sablani SS, Rahman MS. Pore formation in selected foods as a function of shelf temperature during freeze drying. *Dry Technology*, 2002;20(7):1379–1391
- Sablani SS, Syamaladevi RM, Swanson BG. A Review of Methods, Data and Applications of State Diagrams of Food Systems. *Food Engineering Review*. 2010;2:168–203.
- Santivarangkna C, Aschenbrenner M, Kulozik U, Foerst P. Role of glassy state on stabilities of freeze-dried probiotics. *Journal of Food Science*. 2011;76:152-156.
- Schenz T. Relevance of the glass transitions on product functionality. Oxford: IRL Press. 1993.
- Schenz TW. Glass transition and product stability: an overview. *Food Hydrocolloid*. 1995;9:307-315.
- Schmidt SJ. Water and solids mobility in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2004;48:1–101.
- Shi Q, Wang X, Zhao Y, Fang Z. Glass transition and state diagram for freeze-dried *Agaricus bisporus*. *Journal of Food Engineering*. 2012;111:667–674.
- Silva MA, Sobral PJA, Kieckbusch TG. State diagrams of freeze-dried camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) pulp with and without maltodextrin addition. *Journal of Food Engineering*. 2006;77:426-432.

- Simatos D, Blond G, Le Meste M. Relation between glass-transition and stability of a frozen product. *Cryo-Letters*. 1989;10:77–84.
- Slade L, Levine H, Polymer-chemical properties of gelatin in foods, in: A.M.1987
- Slade L, Levine H. A polymer physicochemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products (SHPS). *Carbohydrate Polymers*. 1986;6:213-244.
- Slade L, Levine H. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1991;30:115–360
- Slade L, Levine H. Non-equilibrium behavior of small carbohydrate-water systems. *Pure and Applied Chemistry*. 1988;60:1841-1864.
- Slade L, Levine H. Polymer physicochemical characterization of oligosaccharides. *Papers American Chemical Society*. 1989;198:70-CARB
- Stonehouse GG., Evans JA. The use of supercooling for fresh foods: A review. *Journal of Food Engineering*. 2015;148: 74–79.
- Surinach S, Baro MD, Bordas S, Clavaquera N, Clavaguera-Mora MT. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 31: 1 1992.
- Sutton MQ. Insects as food: aboriginal entomophagy in the Great Basin. *Ballena Press Anthropological Papers*. 1988;33: 115.
- Syamaladevi RM, Roopesh M, Manahiloh KN, Muhunthan B. Understanding the Influence of State/Phase Transitions on Ice Recrystallization in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) During Frozen Storage. *Food Biophys*. 2012;7:57-71.
- Syamaladevi RM, Sablani SS, Tang J, Powers J, Swanson BG. State diagram and water adsorption isotherm of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Food Engineering*. 2009;91:460-467.
- Tolstorebrov L, Eikevik TM, Bantle M. A DSC study of phase transition in muscle and oil of the main commercial fish species from the North-Atlantic *Food Research International* 2014;55:303–310
- Vanin FM, Sobral PJA, Menegalli FC, Carvalho RA, Habitate AMQ. *Food Hydrocolloids*. 2005;19:899–907

- Viesca-González FC, Romero-Contreras AT. La Entomofagia en México. Algunos aspectos culturales. El Periplo Sustentable de la Universidad Autónoma del Estado de México. 2009; 16: 57-83.
- Wang H, Zhang S, Chen G. Glass transition and state diagram for fresh and freeze-dried Chinese gooseberry. *Journal of Food Engineering*. 2008;84:307-312.
- WHO/FAO/ONU La contribución de los insectos a la seguridad alimentaria, los medios de vida y el medio ambiente. Viale delle Terme di Caracalla 00153 Roma, Italia 2013. www.fao.org/forestry/edibleinsects
- Wolfe J, Bryant G, Koster KL. What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there?. *Cryo- Letters*. 2002;23:157–166.
- Yin L, Chen M, Tzeng S, Chiou T, Jiang S. Properties of extracellular ice nucleating substances from *Pseudomonas fluorescens* Mack-4 and its effect on the freezing of some food materials. *Fisheries Science*. 2005. Pp..941–947.
- Yu H, Li Y. State diagrams of freeze dried colostrum whey powders: Effects of additives on the stability of colostrum whey powders. *Journal of Food Engineering*. 2012;110:117-126.
- Zachariassen K, Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in Nature. *Cryobiology*, 2000;41(4):257-279.
- Zhao JH, Lui F, Wen X, Xiao HW, Ni YY. State diagram for freeze dried mango: freezing curve, glass transition line and maximal-freeze-concentration condition. *Journal of Food Engineering*.2015;157:49-56.