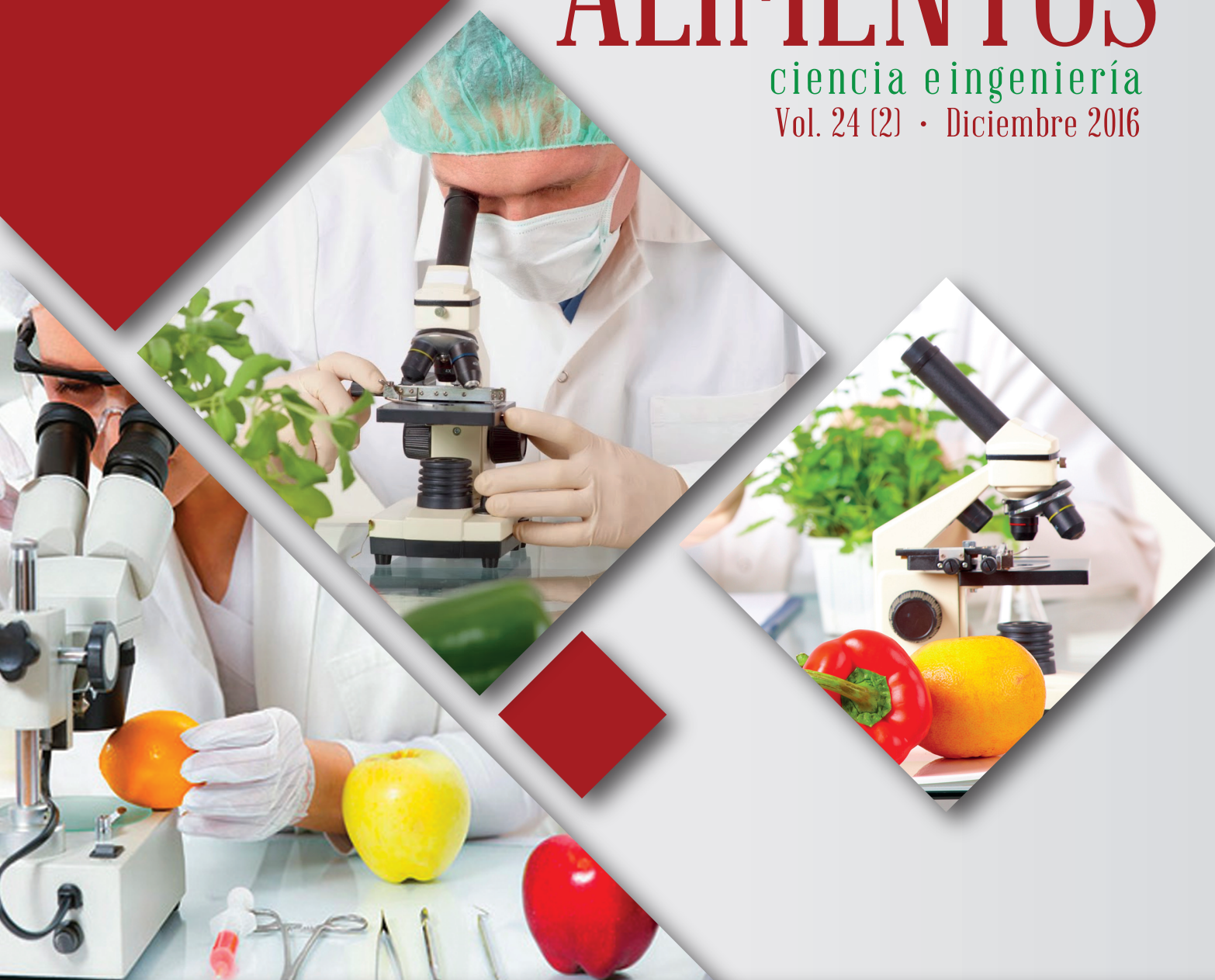




ALIMENTOS

ciencia e ingeniería

Vol. 24 (2) • Diciembre 2016



ISSN 1390-2180

Facultad de Ciencia e ingeniería en Alimentos
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



Diseño, diagramación e impresión:



(03) 2 820060 | 2 821938
megagraf_disenio@hotmail.com



ALIMENTOS

CIENCIA E INGENIERÍA

Revista de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Vol. 24 (2) - 2016





EDITORIAL

Estimados lectores

Una de las responsabilidades de la Universidad es la publicación y difusión de los resultados obtenidos en sus centros de investigación, dándose un sitio importante a la generación de revistas y artículos científicos como medio para universalizar y permitir una absoluta accesibilidad a los conocimientos generados. La priorización de los medios de acción se pone en análisis cuando el ámbito económico ha cambiado, pero indudablemente se debe perseverar en la generación de investigación y su difusión, pues así se esperará un futuro exitoso de la sociedad.

La Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, cumpliendo con su misión en difundir los conocimientos generados en el área de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Bioquímica, Biotecnología y Medio ambiente presenta el volumen ACI-2016-24 (2) de la Revista Alimentos Ciencia e Ingeniería. Esta edición muestra resultados experimentales de estudios de investigación de alto interés para el actual escenario del país, como son nuevas técnicas de conservación, aumento de la estabilidad y espectro de aplicación en sistemas alimenticios mediante la microencapsulación de microorganismos para su adición en recubrimientos e innovaciones en tecnologías de procesamiento que permitan un aprovechamiento de subproductos en Ecuador. Además, se presentan resultados del estudio aerobiológico del relleno sanitario de la Empresa Pública Municipal Gestión Integral de Desechos Sólidos Ambato, y la determinación del contenido de grasa en cereales, lácteos, cárnicos y derivados. Sin duda, esta información contribuirá a la cultura de los consumidores, así como a productores en la implementación de nuevas tecnologías para la transformación y conservación de materia prima, con cuidado hacia el medio ambiente.

Presento mi sincero agradecimiento a los profesionales que han enviado su trabajo investigativo y animo a aquellos que tienen interesantes resultados pero todavía no han dado el paso para compartirlos. Innegablemente, la investigación en nuestro país está en un proceso de mejoramiento continuo, al que todos podemos -y debemos- contribuir.

Cordialmente,

Dra. Mayra Paredes

SUBDECANA FCIAL - UTA



TABLA DE CONTENIDOS

DESCRIPCIÓN

Pag. 03

AUDIENCIA

Pag. 03

INDEXACIÓN

Pag. 03

DIRECTORIO

Pag. 03

COMITÉ EDITORIAL

Pag. 03

ISSN

Pag. 03

TIRAJE

Pag. 03

CONVOCATORIA PRÓXIMO NÚMERO

Pag. 03

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Pag. 06

GUÍA PARA AUTORES

Pag. 54

Tipos de publicaciones

Principios generales

Proceso editorial

Formato

Contenido de los articulos de investigacion

Contenido de los trabajos diferentes a los articulos de investigacion



DESCRIPCIÓN

La revista ALIMENTOS CIENCIA E INGENIERÍA (ACI) es una publicación semestral de artículos técnicos de Tesis de Grado, Trabajos Estructurados de Manera Independiente, Trabajos de Investigación realizados en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (FCIAL) de la Universidad Técnica de Ambato (UTA), así como contribuciones de otras Universidades e Instituciones con las cuales la Facultad mantiene convenios de cooperación mediante el intercambio científico y cultural con el propósito de contribuir en la búsqueda de respuestas adecuadas a las necesidades teórico-prácticas en materia de investigación, creación e innovación tecnológica.

AUDIENCIA

La revista ACI cubre una amplia temática enmarcada en los ámbitos de la Ingeniería de Alimentos y la Biotecnología, especialmente en su aspecto aplicado, orientándose a una audiencia compuesta por científicos del área de la química, bioquímica, microbiología y tecnología alimentaria, así como relacionados con la nutrición.

INDEXACIÓN

Latindex (en Catálogo desde Diciembre 2014)

DIRECTORIO

Dr. Galo Naranjo López, Rector, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dra. Adriana Reinoso Núñez, Vicerrectora Académica, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Ing. Jorge León Mantilla, Vicerrector Administrativo, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dra. Jacqueline Ortiz Escobar, Decana FCIAL, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dra. Mayra Paredes Escobar, Subdecana FCIAL, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dr. Freddy del Pozo, Director DIDE, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

COMITÉ EDITORIAL

Editor

Dr. Ignacio Angós Iturgaiz, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

Revisores internos

Dr. Milton Ramos Moya, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dra. Mirari Arancibia Soria, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dr. Orestes Darío López, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dr. Carlos Rodríguez Meza, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dr. Ismael Carrillo Terán, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Dra. Sandra Horvitz Szoichet, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

Revisores externos

Dra. Pamela Jaramillo, Secretaría Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Ecuador)
Dr. Borja Velásquez, Universidad Politécnica de Valencia (España)
Dr. Juan Sebastián Ramírez, Universidad del Valle (Colombia)
Dr. Khalid Ziani, Ministerio de Industrias y Productividad (Ecuador)
Dr. Iñigo Arozarena Martincorena, Universidad Pública de Navarra (España)
Dr. Gabriel Davidov Pardo, University of Massachusetts-Amherst (EE.UU.)
Dra. Ximena Carrión Granda, Grupo Viscofán S.A. (España)
Dr. Bruno Iñarra, AZTI Tecnalia (España)
Dra. Idoia Fernández Pan, Universidad Pública de Navarra (España)
Dr. Luis Ramos Sánchez, Universidad de Camagüey (Cuba)
Dr. Federico Gómez Galindo, Universidad de Lund (Suecia)
Dr. Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Washington State University (EE.UU.)
Dra. Claudia Ochoa Martínez, Universidad del Valle (Colombia)
Dra. María Fernanda Villacís, Nestlé S.A. (Reino Unido)
Dra. Gloria Bobo García, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Cataluña (IRTA) (España)
Dra. Gloria Serrano Bueno, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla (España)
Dra. Gemma Montalvo García, Universidad de Alcalá (España)
Dr. Mauricio Mendoza García, Universidad Autónoma de Bucaramanga (Colombia)
Dr. Juan Luis Silva, Mississippi State University (EE.UU.)
Dr. Pedro Gustavo Maldonado, Escuela Politécnica Nacional (Ecuador)



ISSN

1390-2180 (Edición impresa)

TIRAJE

350 ejemplares impresos en papel

PERIODICIDAD

Semestral (dos números al año)

AÑO DE INICIO DE PUBLICACIÓN

1992 (34 Volúmenes editados hasta la fecha)

REVISTA ELECTRÓNICA

Accesible a través de:

- Sitio web FCIAL: http://fcial.uta.edu.ec/fcial3/index.htm#xl_xr_page_revistaaci
- Plataforma OJS (en construcción): <http://fcial.uta.edu.ec/erevistas/>

CONVOCATORIA PRÓXIMOS NÚMEROS

Fechas límite (**deadlines**) para entrega de manuscritos:

- Para publicación en JUNIO 2017: Recepción de manuscritos hasta: 15 ABRIL 2017.
- Para publicación en DICIEMBRE 2017: Recepción de manuscritos hasta: 15 SEPTIEMBRE 2017

Dirección postal: Secretaría de la Decanatura de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, Av. Los Chasquis y Río Payamino, casilla 18-01-0334, Ambato (Ecuador).

Dirección electrónica (Editor): revista.fcial@uta.edu.ec

Teléfono: +593 (03) 2400 987 Ext. 103.



INDICE

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Conservación de carne de pollo (*Gallus gallus*) en diferentes dosificaciones de líquidos de cobertura

Conservation of chicken (*Gallus gallus*) in different dosages packing media
A. Mendoza, M. Castro, E. Lavayen, R. Molina, A. Saltos

Pag. 06-17

Conservación de queso fresco mediante recubrimientos adicionados con bacterias lácticas microencapsuladas en alginato sódico

Fresh cheese preservation with lactic acid bacteria incorporated to microencapsulated sodium alginate coatings
Y. García Montes, R. Molina Basurto, M. Castro García, F. Quiroz Bailón

Pag. 18-25

Estudio aerobiológico del relleno sanitario municipal de la ciudad de Ambato

Aerobiological study of Ambato municipal controlled landfill
M. Córdova-Suarez, E. Andache, P. Castillo

Pag. 26-32

Obtención de biodiésel a partir de grasa bovina: condiciones de transesterificación y características del combustible

Biodiesel production from bovine fat: transesterification conditions and fuel characteristics
D. Gómez-Miranda, M. Córdova-Suárez

Pag. 33-40

Validación del método de determinación de Vitamina B2 por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

A validated high efficiency liquid chromatography (HPLC) method for the determination of Vitamin B2
M. Córdova-Suarez, M. Semanate

Pag. 41-47

Determinación de grasa de cereales, lácteos, cárnicos y derivados con el método gravimétrico

Determination of grease of cereals, dairy products, meat and derivatives with the gravimetric method
M. Córdova-Suárez, J. Jácome

Pag. 48-53



Conservación de carne de pollo (*Gallus gallus*) en diferentes dosificaciones de líquidos de cobertura

Conservation of chicken (*Gallus gallus*) in different dosages packing media

A. Mendoza, M. Castro, E. Lavayen, R. Molina, A. Saltos¹

Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Avenida circunvalación, Manta Ecuador., P.O. Box 13-05-2732

Artículo recibido: 03/06/2016

Artículo aceptado: 20/11/2016

RESUMEN

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Procesos Cárnicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Tuvo como objetivo principal la elaboración y conservación de carne de pollo en líquido de cobertura utilizando vinagre, vermut, pollo e ingredientes como material experimental. Se establecieron 9 tratamientos en un diseño completamente al azar determinando el mejor tratamiento mediante separación de medias por medio de la prueba de Duncan al 95 % de significancia. Se emplearon 30 jueces mediante que evaluaron las características organolépticas: color, olor, sabor y textura. Al comparar los tratamientos los jueces determinaron como mejor al T1 (A1B1) (3,5 % de Vinagre y 3,7 % de Vermut). A este tratamiento se le realizaron los análisis químicos: pH, recuentos de Aerobios, Acidez, Nitrógeno básico volátil; Análisis microbiológicos: *Escherichia coli*, *Salmonella*, Coliformes totales, Anaerobios Mesófilos, Anaerobios Termófilos, Aerobios Mesófilos, Aerobios Termófilos, y se determinó que el líquido de gobierno del tratamiento (A1B1) conserva óptimamente la carne de pollo al igual que sus propiedades nutritivas.

Palabras clave: conserva, líquido de gobierno, carne procesada

ABSTRACT

This research was conducted in the laboratory of Meat Processes of the Faculty of Agricultural Sciences at the Eloy Alfaro Lay University of Manabí (Ecuador). Its main objective was the development and conservation of chicken meat in liquid medium using vinegar, vermouth, chicken and ingredients as experimental material. 9 treatments were established by determining completely randomized design using Duncan test at 95 % significance. 30 judges evaluated the best treatment by sensory analysis, evaluating the organoleptic characteristics: colour, odour, flavour and texture. Judges determined T1 (A1B1) (3, 5 % Vinegar and 3, 7 % Vermouth) as the best treatment. The same was analysed for chemical characteristics: pH, Aerobic counts, acidity, volatile basic nitrogen; and microbiological analysis: *Escherichia coli*, *Salmonella*, Total Coliforms, Total Count Plate Aerobic and Anaerobic, Aerobic and Anaerobic Thermophilic, and determined that the liquid of treatment (A1B1) optimally preserved chicken meat as well as their nutritional properties.

Keywords: preserves, covering liquid, processed meat

¹ Autor de correspondencia: Angel Ivar Saltos Moreira. E-Mail: ingangsaltos@outlook.com

1. INTRODUCCIÓN

El pollo por su producción en términos de cantidad de alimento, tiempo de desarrollo y bajo costo es uno de los animales que desde siglos atrás se ha venido explotado a nivel mundial, comparado con otros grupos de animales más consumidos por los seres humanos. Es un alimento popular cuya conservación a través de los siglos se ha ido perfeccionando en cuanto a los métodos empleados para mantener sus propiedades nutricionales como, por ejemplo, la aplicación del calor mediante el cocinado de los alimentos (González Jiménez, 2013).

La carne de pollo constituye una de las fuentes más valiosas de proteínas, ya que es pobre en grasa y es muy digerible. Estas razones han llevado a un continuo aumento en el consumo de la carne de ave, desde el punto de vista nutritivo y para la práctica culinaria (Moreira y Vargas, 2014). Así mismo, dentro del aporte nutricional de la carne de pollo se destaca la presencia de ácido fólico y la vitamina B₃. Adicionalmente, esta carne es fuente de fósforo y potasio, importante en la etapa de crecimiento de niños, adolescentes y en el embarazo, cuando se necesita aumentar la ingesta de proteínas y hierro (Moreira y Vargas, 2014).

Dentro de las características químicas de la carne de pollo están su contenido entre el 18 y 20 % de proteína de alto valor biológico, por contener todos los aminoácidos esenciales que el ser humano necesita. El contenido de grasa suele oscilar entre el 20 y el 25 % siendo menor en animales jóvenes. El porcentaje de hidratos de carbono es mínimo, entre el 0,4 y un 0,6 % solamente, sin embargo el contenido en vitaminas es bastante apreciable. En aves se encuentran vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico y minerales como hierro potasio, magnesio (Anónimo, 2003).

Las aves en general, y el pollo en particular, pueden estar contaminados con microorganismos que se son difíciles de controlar. La seguridad del producto viene dada por las prácticas de higiene empleadas tanto en la manipulación de los productos como en el sacrificio y el manejo en granja y su transporte. En ciertas ocasiones las buenas prácticas no garantizan eliminar del todo los virus, lo que obliga a replantear otras medidas como la irradiación para poder eliminar microorganismos perjudiciales para la salud humana como *Salmonella* o *Campylobacter*. Los alimentos suelen estar contaminados con microorganismos que al igual que el virus de la gripe pueden ser controlados con facilidad (Moreira y Vargas, 2014). Si la carne de pollo se mantiene a una temperatura demasiado elevada, se convierte en un medio donde proliferan

rápidamente las bacterias, potenciando los problemas de higiene ya existentes (Martínez, 2002). La conservación de los alimentos en los diferentes pasos de producción hasta el consumo final del producto son elementos primordiales en cualquier tipo de cocina. A nivel industrial se usan métodos de preservación por el calor y el frío, aunque está demostrado que el segundo método de conservación es más eficaz. Otras alternativas recientes son el envasado al vacío o el envasado con gases protectores. Estos últimos aseguran una mejor y duradera preservación de los alimentos (Torres Magaña, 2010). A la vez los distintos métodos de preservación se agrupan en dos bloques: sistemas que destruyen los gérmenes (bactericidas) y los que impiden el crecimiento de gérmenes (bacteriostáticos) (Torres Magaña, 2010).

El vermut es una bebida de origen italiano elaborada a partir de vino blanco macerado y aromatizado con hierbas, entre las cuales está el ajeno. El vermut se sirve como aperitivo, ya que estimula el apetito, teniendo un aroma agradable y característico (Mora, 2013).

El vinagre es definido como “un líquido ajustado para el consumo humano, producido por materias primas de origen agrícola, que contienen almidón y azúcares, por un proceso de doble fermentación (alcohólica y acética) y conteniendo una cantidad específica de ácido acético (Tsfaye et al., 2002). Tomando en cuenta las consideraciones citadas el objetivo de esta investigación buscó alargar el periodo de conservación de la carne de pollo para consumo utilizando agentes conservantes en el líquido de gobierno, capaces de mantener el producto almacenado a temperatura ambiente durante 28 días.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción del proceso de formulación y elaboración del producto

Las piezas de pollo que se utilizaron en cada uno de los tratamientos fueron de la variedad Broiler, siendo seleccionadas tomando en cuenta características organolépticas físicas de un pollo faenado en buen estado, las mismas que fueron adquiridas en el mercado central del Cantón Manta, provincia de Manabí, Ecuador.

Una vez obtenida la materia prima fué trasladada al laboratorio de procesamiento de alimentos de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, donde se realizó el proceso de limpieza mediante el lavado de la carne de pollo con la finalidad de quitarle la sangre y residuos existentes, retirando la piel y huesos. Se colocó la carne cortada en trozos medianos en un recipiente con agua y se



llevó al fuego hasta llegar a una temperatura de 90 °C por un tiempo de 15 minutos, para que la carne quedase precocinada. Se adicionó sal y pimienta junto con las especias (cebolla, pimienta y ajo) cortadas en el momento de la precocción de la carne cuando el agua alcanzó los 90 °C. Las muestras fueron envasadas en recipientes de vidrio 260 ml, se adicionó el líquido de cobertura o gobierno (vinagre,

Vermut) de acuerdo a la concentración correspondiente descrita (Tabla 1) a una temperatura de 26 °C. Los recipientes fueron sellados y esterilizados a una temperatura de 115 °C durante 15 minutos. El almacenamiento se realizó a temperatura ambiente 25 °C – 28°C durante 28 días.

Tabla 1. Composición del líquido de gobierno de los nueve tratamientos empleados para la conservación de piezas de pollo

Tratamientos	% de vinagre	% de vermut	% de aceite
A1B1	3,5	3,7	3,7
A1B2	3,5	6,1	3,7
A1B3	3,5	8,5	3,7
A2B1	5,9	3,7	3,7
A2B2	5,9	6,1	3,7
A2B3	5,9	8,5	3,7
A3B1	8,3	3,7	3,7
A3B2	8,3	6,1	3,7
A3B3	8,3	8,5	3,7

2.2 Características de las unidades experimentales

El peso de cada unidad experimental fue de 130 g por cada tratamiento los cuales se formularon de acuerdo a lo mostrado en la (Tabla 1). Se obtuvo un total de 27 unidades experimentales, las cuales mantuvieron homogeneidad en el envasado, en envases de vidrio de 260 ml.

2.3 Análisis sensorial para identificar el mejor tratamiento

En el análisis sensorial se realizaron las pruebas organolépticas con los 9 tratamientos y se trabajaron con 30 panelistas o jueces no entrenados, a los que se les entregó su respectiva ficha de evaluación, para que al momento de degustar pudieran identificar las características organolépticas que más les agradasen.

Dentro de las condiciones organolépticas que se tomaron en cuenta se mencionan las siguientes: color, aroma, sabor y textura, empleando una escala hedónica.

2.4. Análisis químico y microbiológico del mejor tratamiento

2.4.1 Análisis de nitrógeno básico volátil (NBV)

Para realizar el análisis de nitrógeno volátil se utilizó el método NTE INEN 182 (1975).

2.4.2 Determinación de pH

Se empleó el método potenciométrico descrito en NTE INEN 181 (1991), tomando porciones de diferentes zonas del producto, y pasándolas a través de una máquina moladora o batidor eléctrico, mezclando bien la masa obtenida hasta su completa homogenización. Se tomó una cantidad de muestra en un vaso de precipitación, se introdujeron los electrodos limpios y se tomó la lectura directa que dio el potenciómetro

2.4.3 Acidez titulable (ácido acético)

Se realizó empleando el método Ca-5a-40 (AOCS 2017) (ácidos grasos libres).

2.4.4 Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos se realizaron los días 0, 7, 14, 21 y 28 del período de almacenamiento utilizando las siguientes metodologías:

Escherichia coli, método oficial 998.09 (AOAC 2009).

Salmonella, método BAM Chapter. 5 (FDA 2016).

Coliformes totales, método oficial 991.14 (AOAC 1994b)

Recuentos de aerobios mesófilos y termófilos, método oficial 990.12 (AOAC 1994a)

Anaerobios mesófilos y termófilos, método BAM Chapter 16 (FDA 2013)

2.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por medio de ANOVA y un test de Duncan, empleando un nivel de significancia de 5 %. Para ello se utilizó el paquete estadístico INFOSTAT, Versión Profesional 2008.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis sensorial

El análisis estadístico aplicado al análisis sensorial de los 30 jueces, respecto a las características organolépticas evaluadas (Color, Aroma, Sabor, Textura), no encontró diferencia significativa en el efecto de los tratamientos en estudio. Sin embargo se determinó numéricamente que el tratamiento más aceptable es el 1 (A1B1) ya que muestra una puntuación mayor en las características organolépticas de mayor interés como son el aroma y sabor.

Los resultados estadísticos en cuanto al color y aroma (Figuras 1 y 2) muestran que no hubo diferencia significativa, ya que el promedio de los tratamientos en estudio se mostró similar pero al observar los resultados del parámetro sabor y textura se puede ver que el análisis estadístico determinó tres rangos de significación diferentes para el sabor y dos rangos de significación para la textura.

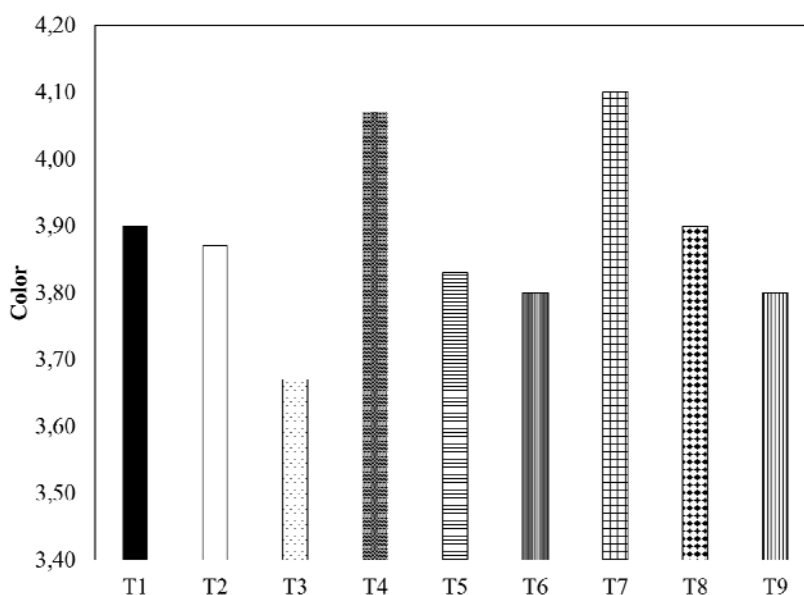


Figura 1. Análisis sensorial de color en muestras de pollo conservadas en diferentes dosificaciones de líquido de gobierno, almacenadas durante 28 días a 25 °C y 90% de humedad relativa

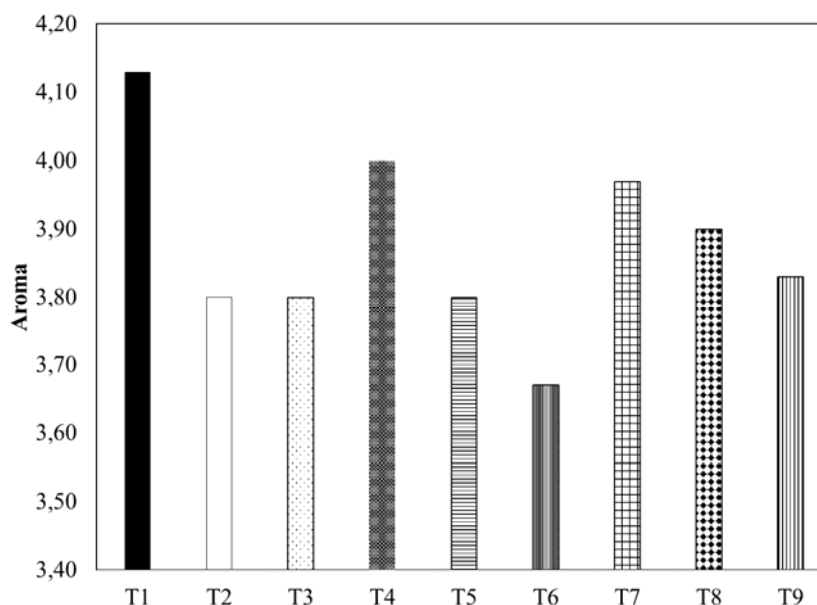


Figura 2. Análisis sensorial de aroma en muestras de pollo conservadas en diferentes dosificaciones de líquido de gobierno, almacenadas durante 28 días a 25 °C y 90 % de humedad relativa

El análisis estadístico determinó para el sabor, que el tratamiento T1 (A1B1) que consta con un medio acuoso de 3,5 % de Vinagre y 3,7 % de vermut, fue diferente del tratamiento cuatro que tiene 5,9 % de Vinagre y 3,7 % de vermut (A2B1), seguido del tratamiento (A3B1) con 8,3 % de vinagre y 3,7 % de vermut (Figura 3). Cabe

destacar que a diferencia de los demás tratamientos en estudio el vermut en la concentración de 3,7 % influye de manera positiva dentro de las características organolépticas de los tratamientos.

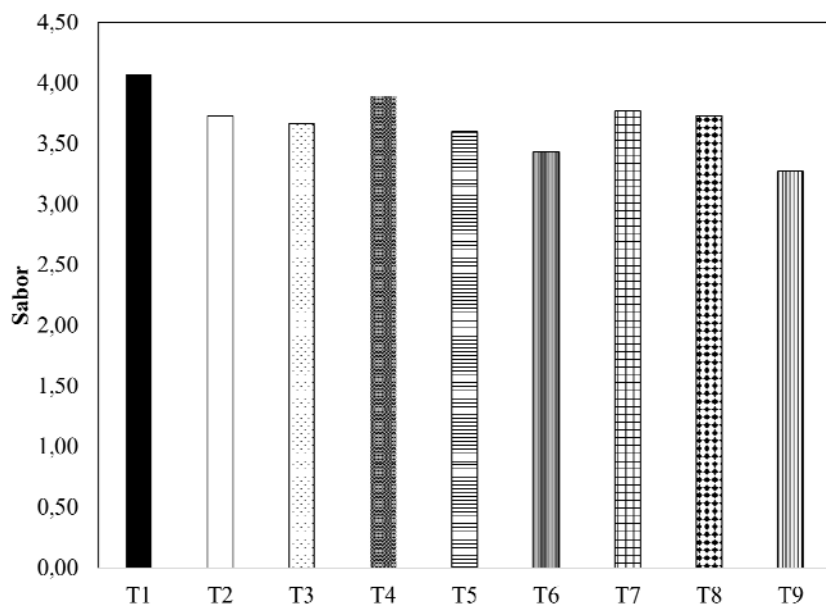


Figura 3. Análisis sensorial del sabor en muestras de pollo conservadas en diferentes dosificaciones de líquido de gobierno, almacenadas durante 28 días a 25 °C y 90 % de humedad relativa

Los resultados estadísticos realizados a la textura, determinaron que los tratamientos que tuvieron las adiciones de 8,3 % de vinagre más 3,7 % de vermut (A3B1), y de 5,9 % de vinagre más 3,7 % de vermut (A2B1), con 3,9 % fueron iguales, pero diferentes al tratamiento (A1B1), que consta de 3,5 % de vinagre y 3,7 % de

vermut, es evidente que el vermut en la concentración de 3,7 %, es aceptable ya que se muestra dentro de los tres tratamientos más aceptado (Figura 4).

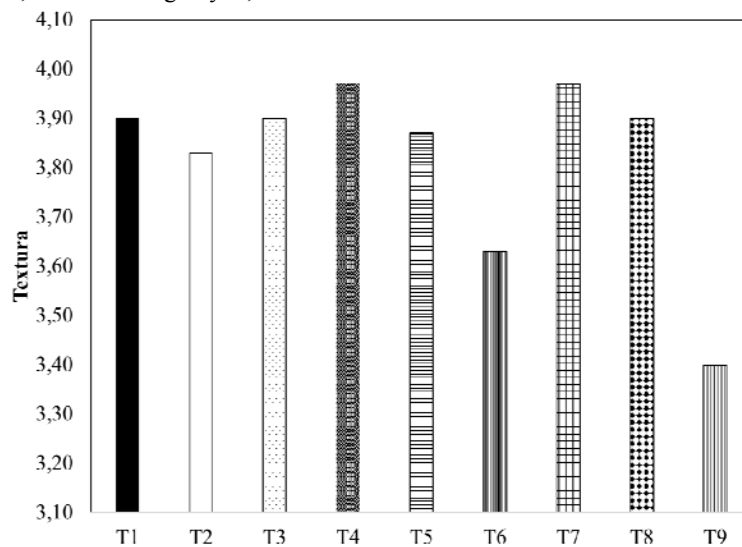


Figura 4. Análisis sensorial de textura en muestras de pollo conservadas en diferentes dosificaciones de líquido de gobierno, almacenadas durante 28 días a 25 °C y 90 % de humedad relativa



3.2 Nitrógeno básico volátil

Los resultados obtenidos en cuanto a nitrógeno básico volátil, expresado en mg/100g representados en la Figura 5 presentaron variaciones a lo largo de los 28 días de estudio

presentando valores entre 22,75 (semana 1), 18,20 (semana 2), 17,10 (semana 3), 18,25 (semana 4).

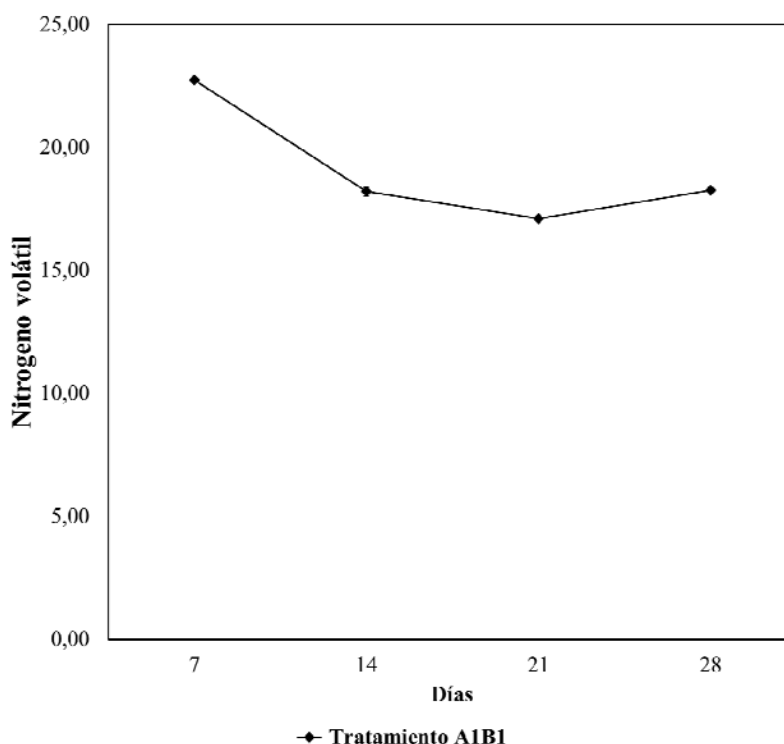


Figura 5. Nitrógeno Volátil en muestras de pollo conservadas en diferentes dosificaciones de líquido de gobierno, almacenados durante 28 días a 25 °C y 90 % de humedad relativa. Tratamiento A1B1.

En los datos obtenidos podemos observar que los límites están dentro de los rangos permitidos en las conservas de atún que tienen como máximo 50 mg/100g de muestra (INEN 1975).

La prueba de nitrógeno volátil es uno de los análisis más usados en la industria de alimentos, debido a su rapidez y su rápido procedimiento al momento de realizarla. Estos compuestos volátiles son evidentes en las últimas etapas del deterioro de los alimentos, por esta razón no se recomiendan ser realizados en las primeras etapas de almacenamiento, debido a que este tipo de análisis es muy eficaz al momento de detectar los índices de deterioro en etapa avanzada.

3.3 pH

De acuerdo con la Figura 6 se observan las medias del pH obtenidas en las muestras del mejor tratamiento A1B1, en el día 7 del periodo de estudio presento un valor de 5,41; llegando a un valor de 5,28 para el día 28 de almacenamiento, tomando como referencia la norma NTE INEN 0181 (1991) este valor está dentro de los rangos permitidos (mínimo 4,5 máximo 6,4), y comparando los resultados según lo expresado por (Peñafiel, 1988) para una elaboración de un guiso de pollo en conserva tipo



Mendoza et al. / Alimentos, Ciencia e Ingeniería, 2016: 24(2) 06-17

ají de gallina, el resultado del pH fue de 5,96, lo que significa que el porcentaje de pH es casi similar a la conserva de pollo con líquido de

cobertura a base de (vinagre y vermut) (Peñafiel, 1998).

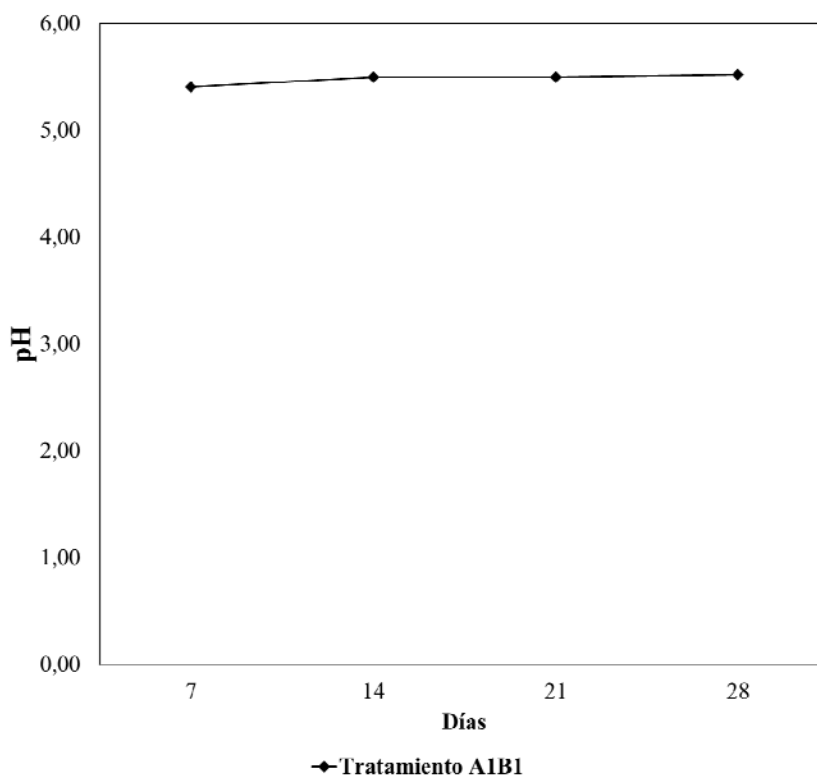


Figura 6. pH en muestras de pollo conservadas en diferentes dosificaciones de líquido de gobierno, almacenados durante 28 días a 25 °C y 90 % de humedad relativa. Tratamiento A1B1.

3.4 Acidez titulable

En la Figura 7 los datos demuestran diferencia significativa ($P \leq 0,05$) en la acidez donde se evidencia un aumento en el día 14 de almacenamiento presentando un valor de 0,68 %

para el día 7 y un valor de 1,26 % para el día 14, disminuyendo su porcentaje en el día 28 del periodo de almacenamiento presentando un valor de 0,60 %.

Conservación de carne de pollo (*Gallus gallus*) en diferentes dosificaciones de líquidos de cobertura
Conservation of chicken (*Gallus gallus*) in different dosages packing media

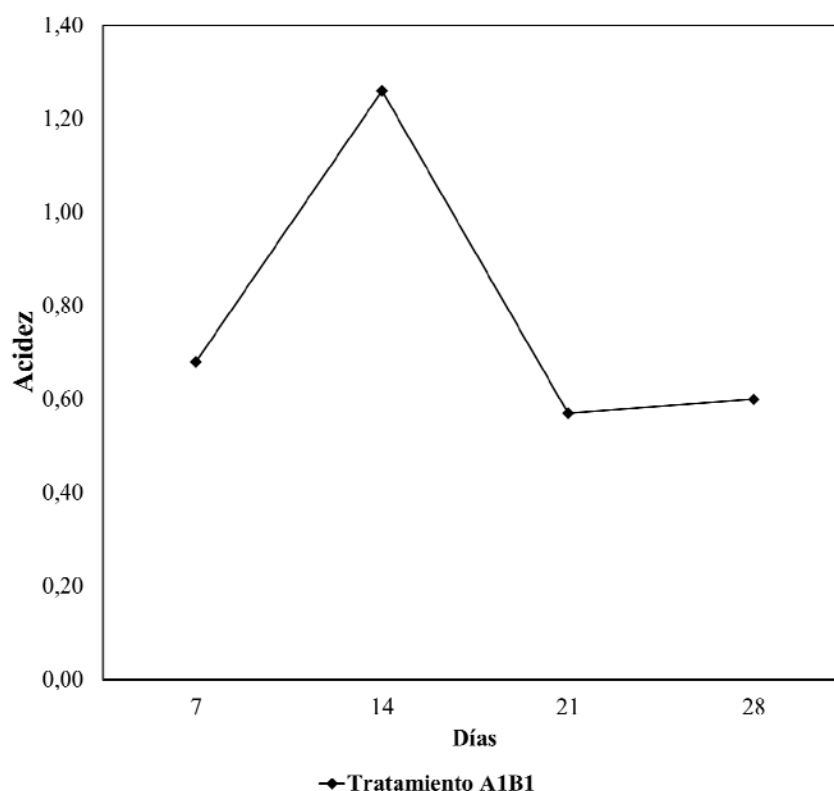


Figura 7. Acidez en muestras de pollo conservadas en diferentes dosificaciones de líquido de gobierno, almacenados durante 28 días a 25 °C y 90% de humedad relativa. Tratamiento A1B1.

De acuerdo a la norma Ca-5a-40 (AOCS 2017), para conserva de carne el porcentaje de ácidos tuvo un valor de 0,68 % en la semana 1, y 0,60 % la semana 4, lo que indica que hubo un descenso en la acidez; según Montoya (2008) en el desarrollo de las técnicas de procesamiento para la elaboración de una conserva enlatada de estofado de carne de res, la acidez presente en un alimento puede aumentar o disminuir la letalidad del calor y que los productos enlatados de baja acidez requieren tratamientos térmicos mayores para eliminar los microorganismos patógenos que se puedan desarrollar. Estando de acuerdo con Montoya (2008) ya que si el producto no se hubiera sometido al proceso térmico de esterilización los microorganismos hubieran proliferado debido a la baja acidez en la conserva de pollo con líquido de cobertura.

3.5 Análisis microbiológicos

Las Tablas 2 y 3 muestran las valoraciones de microorganismos en las muestras de pollo almacenadas 28 días a 25 °C. Los resultados demuestran diferencia significativa ($P \leq 0,05$). En cuanto a la detección de microorganismos aerobios y anaerobios termófilos y mesófilos a dos temperaturas para los aerobios no se determinó crecimiento microbiológico en la conserva de pollo con líquido de cobertura, ya que los análisis aplicados a las dos temperaturas mostraron un recuento igual de $< 1 \cdot \log$ UFC/g. Según lo expresado por Peñafiel (1998) en la detección de escapes de microorganismos de aerobios y anaerobios en la elaboración de un guiso de pollo en conserva tipo aji de gallina, dio un resultado negativo.

Al comparar los valores de los análisis realizados a la conserva de pollo con líquido de cobertura, los microorganismos aerobios y anaerobios termófilos y mesófilos a 37 – 55 °C en la determinación de crecimiento de microorganismo los valores mostrados fueron



iguales en las dos temperatura. Según describe Montoya (2008), en estudio comparativo de tres tipos de enlatados de carne de vacuno, en lo que respecta a la evaluación microbiana de los tres

productos no se detectaron esporas de microorganismos termófilos aerobios estrictos o facultativo, ni esporas de termófilos anaerobios en ninguno de los productos.

Tabla 2. Valoraciones de los microorganismos *anaerobios mesófilos*, *anaerobios termófilos*, *aerobios mesófilos* y *aerobios termófilos* en el mejor tratamiento (A1B1) en placas de carne de pollo, tratada con líquido de gobierno almacenados durante 28 días a 25 °C.

Microorganismos	Unidades	Valoración
Anaerobios mesófilos 37 °C	UFC/g	<1,0x10
Anaerobios termófilos 55 °C	UFC/g	<1,0x10
Aerobios mesófilos 37 °C	UFC/g	<1,0x10
Aerobios termófilos 55 °C	UFC/g	<1,0x10

Tabla 3. Valoraciones de los microorganismos *Escherichia coli*, coliformes totales, salmonella, recuento aerobios en el mejor tratamiento (A1B1) en placas de carne de pollo, tratada con líquido de gobierno almacenados durante 28 días a 25 °C.

Microorganismo	Unidad	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
<i>Escherichia coli</i>	UFC/g	<1,5x10	<1,5x10	<1,5x10	<1,5x10
Coliformes totales	UFC/g	<1,5x10	<1,5x10	<1,5x10	<1,5x10
<i>Salmonella</i>	UFC/g	ND /25 g	ND /25 g	ND /25 g	ND /25 g
Recuento de aerobios	UFC/g	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10

Los valores corresponden a la media de 3 réplicas. CFU= Unidades formadoras de colonias por gramo. ND, no detectado.

Comparando la conserva de guiso de pollo elaborada (Peñañiel, 1998) y los tres tipos de enlatados de carne de vacuno elaborado por Montoya (2008), con, la conserva de pollo con líquido de cobertura, se observa que en la parte microbiológica, coinciden los resultados al no haber crecimiento de aerobios y anaerobios termófilos y mesófilos a pesar de tratarse de dos tipos de carnes diferentes. Los tipos de microorganismos que pueden causar enfermedad en los consumidores se dividen en virus, bacterias, hongos y parásitos, de los cuales las bacterias son responsables de más del 90 % de los casos confirmados de enfermedades de transmisión por alimentos (ETA). Las cinco bacterias asociadas a ETA más frecuentes son *Campylobacter* spp., *Salmonella* (no tifoidea), *Escherichia coli* O157: H7 (enterohemorrágica), *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Eberle y Kiess, 2012).

4. CONCLUSIONES

El criterio de los catadores respecto al color y aroma, no fue diferente, según la prueba de comparación de medias utilizada. En cuanto al aroma y sabor se destaca el tratamiento A1B1 (3,5 % de vinagre y 3,7 % de vermut) que logro la más alta valoración y se diferencia de algunos de los otros tratamientos. Referente al color y textura predominaron en relación los tratamientos A3B1 (8,3 % vinagre y 3,7 % de vermut), A2B1 (5,9 % de vinagre y 3,7 % de vermut), A1B1 (3,5 % de vinagre y 3,7 % de vermut), A1B3 (3,5 % de vinagre y 8,5 % de vermut), A3B2 (8,3 % de vinagre y 6,1 % de vermut), siendo similares de acuerdo a la prueba de comparación de medias, el análisis microbiológico del mejor tratamiento), A1B1 (3,5 % de vinagre y 3,7 % de vermut), dio valoraciones bajas en cuanto a los microorganismos anaerobios y aerobios



mesófilos y termófilos, *Escherichia coli*, coliformes totales, salmonella, recuento aerobios, el análisis microbiológico realizado al mejor tratamiento determinó que el producto no tuvo alteración alguna ya que los microorganismos no proliferaron durante el tiempo de estudio debido a la aplicación de las buenas prácticas de manufactura.

La determinación de estos microorganismos a diferentes temperaturas; temperatura ambiente y a 37 °C y 55 °C demostraron que existe estabilidad microbiológica comercial acelerada equivalente a dos años de vida útil. El análisis físico evidencia parámetros que no variaron en el tiempo y que confirman la estabilidad química comercial. Debido a los análisis microbiológicos y físico realizados al producto se concluyó que el efecto del líquido de gobierno compuesto por vinagre y vermut es muy bueno ya que conserva bien la carne de pollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anónimo. (2003). *Cocina saludable y cómo disfrutarla y el protocolo en la mesa* (3 ed.). Madrid (España): Visión libros
- AOAC (1994a). AOAC Official Method 990.12. Aerobic Plate Count in Foods. Dry Rehydratable Film. (Petrifilm™ Aerobic Count Plate) Method (pp. 1). : AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC (1994b). AOAC Official Method 991.14. Coliform and *Escherichia coli* Counts in Foods. Dry Rehydratable Film. (Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plate™ and Petrifilm™ Coliform Count Plate™) Methods (pp. 2). : AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC (2009). AOAC Official Method 998.09. *Salmonella* in Foods. Colorimetric Polyclonal Enzyme Immunoassay Screening Method with Rappaport-Vassiliadis (R10) Broth and/or Tetrathionate Broth. 3M™ TECRA™ *Salmonella* Visual Immunoassay (VIA). 3M™ TECRA™ *Salmonella* ULTIMA™ Immunoassay (pp. 5). : AOAC INTERNATIONAL.
- AOCS (2017). AOCS Official Method Ca 5a-40. Free Fatty Acids in Crude and Refined Fats and Oils: AOAC INTERNATIONAL.
- Eberle, K. N. y Kiess, A. S. (2012). Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poultry Science*, 91(1), 255-264. doi: 10.3382/ps.2011-01414
- FDA (2013). BAM Chapter 16: *Clostridium perfringens*. In E. J. Rhodehamel y S. M. Harmon (Eds.), *Bacteriological Analytical Manual*: U.S. Food and Drug Administration - Center for Food and Safety and Applied Nutrition (CFSAN).
- FDA (2016). BAM Chapter 5: *Salmonella*. In Wallace H. Andrews, Hua Wang, Andrew Jacobson y Thomas Hammack (Eds.), *Bacteriological Analytical Manual*: U.S. Food and Drug Administration - Center for Food and Safety and Applied Nutrition (CFSAN).
- González Jiménez, E. (2013). *Análisis de la situación actual del consumo de pollo certificado frente al blanco en navarra*. (Tesis Grado), Universidad Pública de Navarra, Pamplona (España).
- INEN (1975). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0182. Conservas envasadas de pescado. Determinación de nitrógeno básico volátil. (pp. 4). Quito (Ecuador): Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN).
- INEN (1991). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0181. Conservas envasadas de pescado. Determinación de cloruros y el índice de pH. (pp. 5). Quito (Ecuador): Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN).
- Martínez, G. (2002). *Iniciación en las Técnicas Culinarias*. Balderas (México): Ed. Limusa
- Montoya, P. V. (2008). *Desarrollo de las técnicas de procesamiento para la elaboración de una conserva enlatada de estofado de carne de res* (Tesis Grado), Universidad de Guayaquil, Guayaquil (Ecuador).
- Mora, Y. (2013). El gran catador. Vermut. Consultado el 23/12/2013, en el sitio web <http://elgrancatador.imujer.com/2007/11/28/el-vermouth>
- Moreira, C. y Vargas, M. (2014). *Estudio comparativo de la carne de bovino (Bos taurus) vs carne de pollo (Gallus gallus) en la elaboración de hamburguesas utilizando tres formulaciones*. (Tesis Grado),



Mendoza et al. / Alimentos, Ciencia e Ingeniería, 2016: 24(2) 06-17

Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil (Ecuador).

Peñañiel, E. C. (1998). *Elaboración de un guiso de pollo (Gallus domesticus) en conserva tipo ají de gallina*. (Tesis Grado), Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). Disponible en <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/123456789/567>

Tesfaye, W., Morales, M., Troncoso, A. y García-Parrilla, M. (2002). Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & technology*, 13, 12-21.

Torres Magaña, A. K. (2010). Conservación de los Alimentos, sistemas actuales de conservación. Disponible en <http://conservacion-de-alimentos.blogspot.com/2010/05/sistemas-actuales-de-conservacion.html>



Conservación de queso fresco mediante recubrimientos adicionados con bacterias lácticas microencapsuladas en alginato sódico

Fresh cheese preservation with lactic acid bacteria incorporated to microencapsulated sodium alginate coatings

Y. García Montes, R. Molina Basurto, M. Castro García, F. Quiroz Bailón¹

Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Vía San Mateo s/n, Manta Ecuador

Artículo recibido: 21/09/2016

Artículo aceptado: 22/12/2016

RESUMEN

Se realizaron pruebas preliminares para microencapsulación de bacterias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) en alginato de sodio y su aplicación en recubrimientos de queso fresco, como sistema de preservación. Para lograr la microencapsulación de bacterias se realizó la combinación de ambas técnicas extrusión y emulsión, utilizándose aceite vegetal, alginato de sodio y CaCl_2 . Los análisis físico-químicos en queso fresco, mostraron diferencia significativa en pérdida de peso entre los distintos tratamientos testados (T1, T2 y control), existió diferencia significativa en el día 30 donde T2 obtuvo (45,10 %) en control menor pérdida (39,94 %). En cuanto a los resultados de textura mostraron diferencia estadística el día 30 en T2 mejor tratamiento (33,26 %) y T1 (16,7 %). En cuanto al análisis de acidez se mostró diferencia en el análisis de varianza en todos los tratamientos T1, T2 y control en el día 30 fue de (0,78 %) para T1 y para el control de (0,18 %). En los análisis microbiológicos, los resultados aerobios mesófilos fueron negativos los días 20 y 30 de los tratamientos T1 y T2 con 0 UFC/g. El control presentó una contaminación mayor ($17,2 \cdot 10^7$ UFC/g) al día 30 de su almacenamiento. Durante el análisis de coliformes totales, el tratamiento que presentó presencia de microorganismos contaminantes fue la muestra control con ($5 \cdot 10$ UFC/g) y T1 ($3 \cdot 10$ UFC/g) al día 30.

Palabras clave: productos lácteos, probióticos, *Lactobacillus acidophilus*, películas comestibles

ABSTRACT

Preliminary tests were performed for microencapsulation of lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) in sodium alginate and its application in coatings of fresh cheese, as a preservation system. To achieve the microencapsulation of bacteria, a combination of two extrusion and emulsion techniques was performed, using vegetable oil, sodium alginate and CaCl_2 . (T1, T2 and control), there was the mathematical difference at day 30 where T2 obtained (45.10 %) in lower control lost 39.94 %). Regarding the texture results, the statistical difference was shown on day 30 in T2 better treatment (33.26 %) and T1 (16.7 %). Acidity analysis shows the difference in the analysis of variance in all treatments T1, T2 and control at day 30 (0.78 %) for T1 and for the control of (0.18 %). Microbiological analyzes, mesophilic aerobic results were negative on days 20 and 30 of treatments T1 and T2 with 0 CFU/g. The control produced a larger contamination ($17.2 \cdot 10^7$ CFU/g) at day 30 of its storage. ($5 \cdot 10$ CFU/g) and T1 ($3 \cdot 10$ CFU/g) at day 30.

Keywords: Dairy products, probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, edible coatings

¹ Autor de correspondencia: Yessenia García Montes. E-Mail: jesanahi1@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias son fundamentales en la industria ya que permiten desarrollar importantes progresos en fisiología celular y en genética. Las bacterias probióticas se adicionan en distintos productos alimenticios, entre ellos el yogurt, bebidas lácteas, quesos, cremas, helados y postres lácteos. Sin duda una de sus ventajas es prevenir enfermedades durante su ingesta, pero el mayor problema se presenta en la viabilidad de microorganismos en el procesamiento y almacenamiento de los alimentos e incluso en los procesos posteriores a su consumo como las agresivas condiciones gastrointestinales del ser humano (Lupo Pasin et al., 2012).

Las bacterias del género *Lactobacillus acidophilus* se encuentran presentes en el intestino, en la boca y en la vagina del ser humano. Absorben la lactosa y la metabolizan formando ácido láctico. Consumen nutrientes de otros microorganismos entrando en competencia con ellos y controlando, por la disminución de nutrientes, el desarrollo desmedido de estos (Andrade Bracero, 2013).

Lactobacillus acidophilus, ha sido ampliamente estudiado por ser uno de los principales microorganismos utilizado en la producción de leches fermentadas. Tienen excelente gran capacidad de adhesión al epitelio intestinal, al cual pueden colonizar, mejora el balance de la población microbiana y previene enfermedades. Se han encontrado cepas capaces de mejorar la respuesta inmune, reducir la diarrea generada por radioterapia y a la vez disminuir el estreñimiento (Olagnero et al., 2007).

En productos alimenticios, la microencapsulación mejora la viabilidad de los probióticos y el tiempo de vida en anaquel, debido a su efecto protector contra factores ambientales elevada acidez, bajo pH, presencia de oxígeno, agentes tóxicos presentados durante el proceso, principalmente tratamiento con calor, enzimas digestivas, bacteriófagos y procesos de secado (Pérez-Leonard et al., 2013).

Los alginatos son hidrocoloides extraídos de algas. Al reaccionar con iones de calcio son capaces de generar la formación de geles estables. Se utilizan para atrapar sabores a temperatura ambiente, teniendo capacidad de reaccionar con los grupos carbonilos, aunque su alto costo limita su uso (Morales, 2006).

Los alginatos se utilizan en las industrias para mejorar las características y aspecto de los productos lácteos y productos enlatados. En microempresas pasteleras el alginato mejora la textura y retiene la humedad y de igual forma ayuda en la preparación de merengues (Hernández-Carmona et al., 2012).

La microencapsulación consiste en empaquetar sustancias líquidas sólidas o gaseosas como aromas, bacterias o aceites esenciales que pueden ser liberadas mediante procesos químicos controlados y en condiciones determinadas. En el sector industrial, comúnmente se usa la encapsulación de la vitamina C por el gran problema que presenta en cuanto a su oxidación de manera rápida.

Una microcápsula está formada de una membrana semi-permeable, esférica, delgada y fuerte, alrededor de un centro sólido/líquido. Los materiales que frecuentemente se utilizan para el encapsulamiento son gelatina, grasas, aceites, goma arábica, alginato de calcio, ceras, almidón de trigo, maíz, arroz, papa, nylon, ciclodextrina, maltodextrina, caseinato de sodio, proteína de lactosuero o proteína de soya (Parra Huertas, 2010).

En la actualidad los procesos de microencapsulación tienen como finalidad proteger y preservar gran parte de ingredientes utilizados en el sector farmacéutico e industrial. La mayoría de autores indican que existen diferentes tipos de técnicas físicas y químicas para llevar a cabo este procedimiento (Lupo Pasin et al., 2012; Parra Huertas, 2010; Pérez-Leonard et al., 2013; Sandoval et al., 2004).

Para realizar la microencapsulación existen varios factores, considerando uno de ellos el tipo de cobertura a emplear. Frecuentemente se usa agar, alginato de sodio, caragenina o goma arábica como cobertura principal para preparar las microcápsulas. Esta técnica consiste en formar gotas de la solución de alginato que contiene el componente a encapsular al hacer pasar dicha solución por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado. Estas gotas caen sobre un baño que contiene la fuente del ión divalente, quien induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa (Lupo Pasin et al., 2012).

La técnica de extrusión implica preparar una solución acuosa de hidrocoloide, la adición de microorganismos se concentraron a ella y extruir la mezcla de células hidrocoloide a través de una boquilla que forma gotas que caen en una solución de endurecimiento.

En el método de microencapsulación por emulsión, una pequeña porción de polímero celular (fase discontinua) es añadida a una gran cantidad de aceite vegetal (fase continua). La mezcla es homogenizada para formar una emulsión que contenga agua-aceite y una vez ésta se forma, se adiciona un agente que insolubiliza el polímero para formar microcápsulas de gel de la fase aceitosa. Las cápsulas son recogidas por filtración (Vargas, 2004).



En el presente trabajo se propuso estudiar el potencial del uso de bacterias ácido-lácticas contenidas en un recubrimiento comestible para aumentar la vida útil de queso fresco.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí en el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Investigación y en el laboratorio de Análisis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, del Cantón Manta.

2.1 Proceso de activación de Bacterias LA5

Se utilizó una cepa de bacterias liofilizadas (CHR HANSE). Para proceder a la activación de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus acidophilus*, se pesó 0,0723 g de bacteria liofilizada y este se agregó en 5 ml de agua destilada + 0,1 g de glucosa. Luego se procedió a realizar la incubación de la cepa LA5 en un tubo de ensayo a 38 °C por 24 horas en una cámara climática.

2.2 Preparación de la solución de recubrimiento

En la preparación del recubrimiento comestible a base de almidón de yuca, se preparó una disolución de CaCl_2 , que fue calentada a 90 °C en una plancha de agitación, posteriormente y homogeneizadas a una temperatura de 50 °C con un Ultraturrax (Polytron, Switzerland), a 11000 rpm durante 4 minutos.

2.3 Proceso de microencapsulación

La microencapsulación de las bacterias activadas se realizó utilizando alginato de sodio empleando una relación de 0,09 g de alginato/5 ml de bacteria activada. En la microencapsulación, se utilizó un equipo que consta de una válvula de compuerta de 2 pulgadas, un tapón roscable de 2 pulgadas y un reductor de 3 a 2 pulgadas. Este equipo facilitó el goteo de la solución de alginato de sodio y bacterias sobre la disolución de CaCl_2 . Después de 24 horas de reposo, las microcápsulas fueron recogidas del fondo del tubo. Se preparó una solución de 100 ml de recubrimiento comestible y se sumergieron en ella 60 g de queso. Seguidamente el queso se colocó en un envase de aluminio para ser llevado a la refrigeradora con una temperatura de 6 °C, donde permaneció almacenado durante 30 días, durante los cuales se realizaron los controles físico-químicos y microbiológicos.

2.4 Protocolo de BAL LA5 sin microencapsular

Para el tratamiento del queso recubierto con bacterias sin microencapsular, se procedió del mismo modo. Tras la activación de las bacterias BAL LA5, se incubaron a 38 °C durante 24 horas, seguidamente se procedió a preparar el recubrimiento comestible a base de almidón de yuca. El procedimiento fue el mismo que se utilizó para el protocolo de BAL LA5 microencapsuladas. Se agregaron las bacterias activadas a la solución de recubrimiento comestible y luego se sumergieron 60 g de queso fresco por unidades experimentales que se llevaron a refrigeración de 6 °C durante 30 días en donde se realizaron los controles físico-químicos y microbiológicos.

2.3. Metodología de Análisis Físico

2.3.1 Pérdida de peso

Para determinar la pérdida de peso se registró el peso inicial y a lo largo del almacenamiento mediante una balanza digital (Sartorius TE6101, Alemania). Los resultados fueron expresados como porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial (Rodríguez Villanueva, 2007).

2.3.2 Textura instrumental

Para la medición de la firmeza se eligieron 3 trozos de queso de control y 3 de cada tratamiento. El análisis de penetración se realizó a temperatura ambiente mediante un texturómetro SHIMADZU (Japón). Los resultados fueron analizados mediante el software Trapezium X. La muestra se colocó en una placa circular de 12 cm de diámetro y el ensayo de penetración se realizó con un punzón de 8 cm de longitud, 2 mm de diámetro a una velocidad 20 mm/s, con una penetración en la masa del queso de 15 mm (Ziani et al., 2015). Los resultados se expresaron como la fuerza máxima (N) necesaria para penetrar en la masa del queso.

2.4. Metodología de Análisis Químicos

2.4.1 Acidez titulable

El análisis de acidez se realizó según el método 16.267 AOAC 2000. En el método se usó como indicador fenolftaleína y NaOH 0,1 N para la titulación, expresada como % de ácido láctico.

2.5 Análisis Microbiológicos

Al queso fresco (control) se le realizó análisis de coliformes totales en los días 0 y 30 de ensayo. Para los quesos frescos con bacterias microencapsuladas y sin encapsular, el análisis de coliformes totales se determinó en el día 30. Para los quesos con bacterias microencapsuladas, sin encapsular y testigo, se realizó los análisis de aerobios mesófilos en periodos establecidos de (0; 10; 20; y 30 días). Los resultados fueron expresados en UFC/g.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Pérdida de peso

El análisis estadístico no determinó diferencia significativa en pérdida de peso de los tratamientos T1, T2, y control siendo estadísticamente todos iguales en el día 0 y 10 de su almacenamiento (Figura 1). Existió diferencia matemática en el día 30, donde todos los tratamientos pierden peso, siendo el control fue el que menor pérdida tuvo (39,94 %) y T2 el que presentó mayor pérdida (45,10 %).

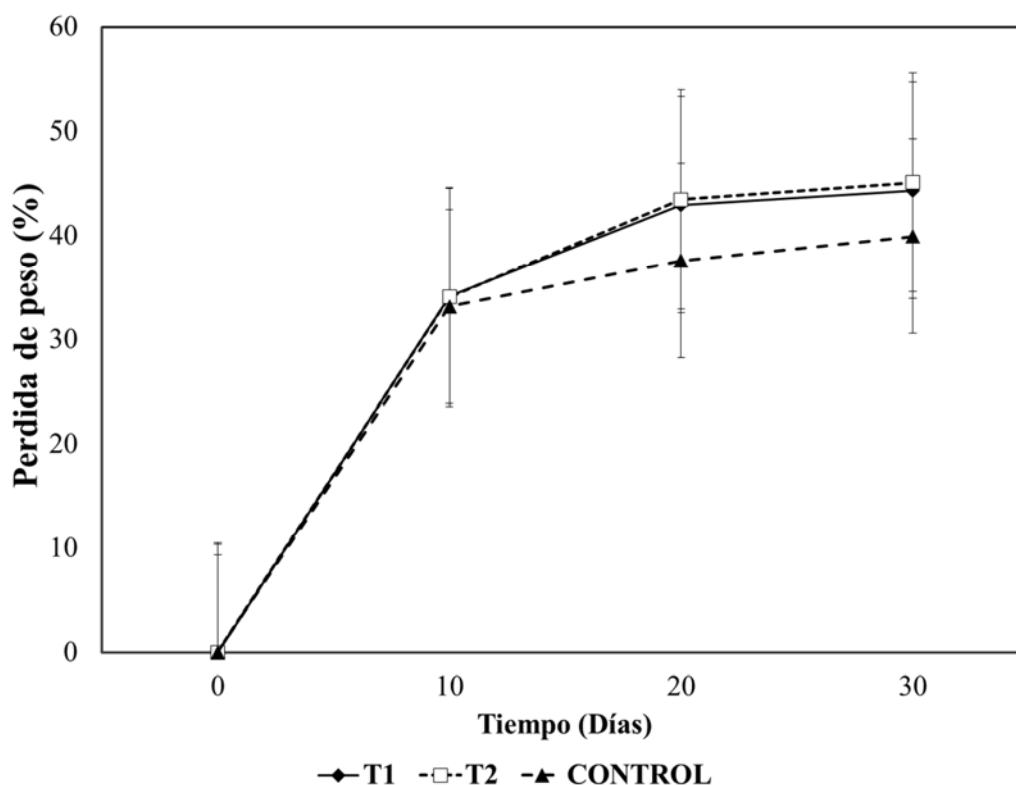


Figura 1. Pérdida de peso en queso fresco recubiertas con almidón de yuca y bacterias lácticas *Lactobacillus acidophilus* encapsuladas y sin encapsular, almacenadas durante 30 días a 4 °C y 90% de humedad relativa. ♦ T1, □ T2, ▲ CONTROL.

En lo que respecta a pérdida de peso, el análisis de varianza no mostró diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2, control durante sus 30 días de almacenamiento. La aplicación del recubrimiento comestible y de BAL LA5 no afectó a ningún tratamiento en lo que se refiere a pérdida de peso, según Álvarez Yanamango y Barrientos (2011) al aplicarle el *Lactobacillus casei* al queso fresco en el análisis de varianza no mostró diferencia estadística durante su almacenamiento.

3.2 Textura

El análisis de varianza no mostró diferencia estadística significativa en los tratamientos T1, T2, y control, en el día 0, evidenciando diferencia significativa ($P > 0,05$) en los días 10; 20 y 30. Respecto a día 30 (Figura 2), siendo T2 (33,26 N) el que presenta una mejor textura a diferencia T1 que mostró una textura de (16,7 N).

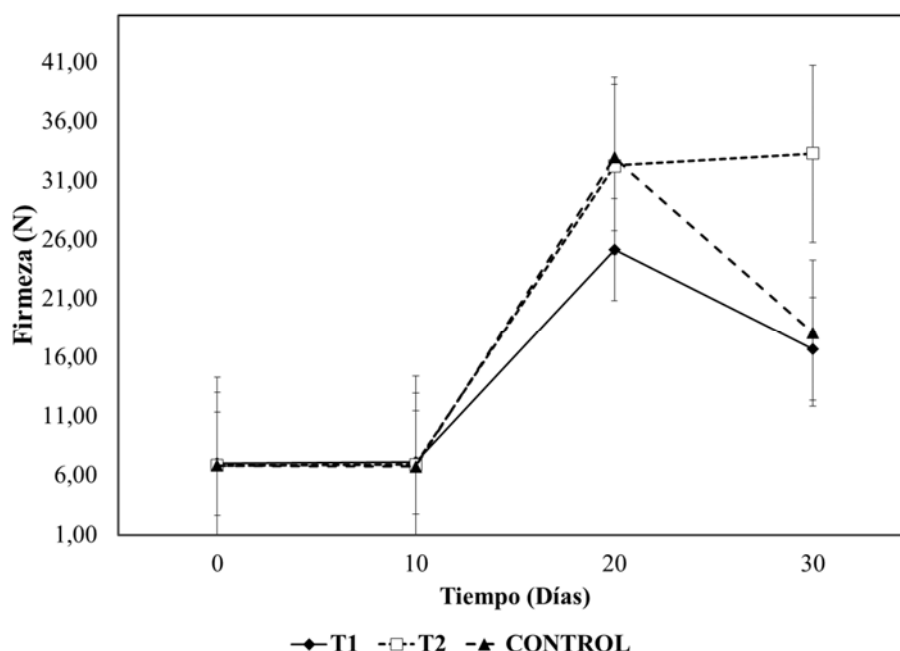


Figura 2. Firmeza en queso fresco recubiertas con almidón de yuca y bacterias lácticas *Lactobacillus acidophilus* encapsuladas y sin encapsular, almacenadas durante 30 días a 4 °C y 90% de humedad relativa. ♦ T1, □ T2, ▲ CONTROL.

En la determinación de textura se observaron diferencias significativas en T2 en el día 30 de su almacenamiento, teniendo mejor textura que las muestras T1 y control. Durante los días 0, 10 y 20 no se encontró diferencia estadística entre el T2 y el control, siendo el tratamiento T1 que evidencio diferencia significativa, el beneficio de las BAL LA5 se logró notar en T2 en el día 30 de su almacenamiento. Aunque Zambrano (2010) en su investigación indica que los probióticos disminuyen la dureza a los 7 días de su almacenamiento.

3.3 Acidez

En cuanto al análisis de acidez existió diferencia estadística, en el día 0 el control con (0,10 %) en

relación al tratamiento T1 que mostro un porcentaje mayor (0,37 %) Figura 3. Durante el día 10 los tratamientos mostraron acidez elevada en T1 (1,03 %), siendo el control el que evidenció el porcentaje más bajo con un valor de 0,25 %. En el día 20 el tratamiento T1 evidenció el mayor porcentaje de acidez con un valor de 0,89 %, siendo mayor al control (0,18 %). Para el día 30 los valores más bajos en cuanto al porcentaje de acidez se evidenciaron en las muestras del control con valores de 0,18 % a diferencia del de T1 que mostró el porcentaje más alto con valores de 0,78 %.

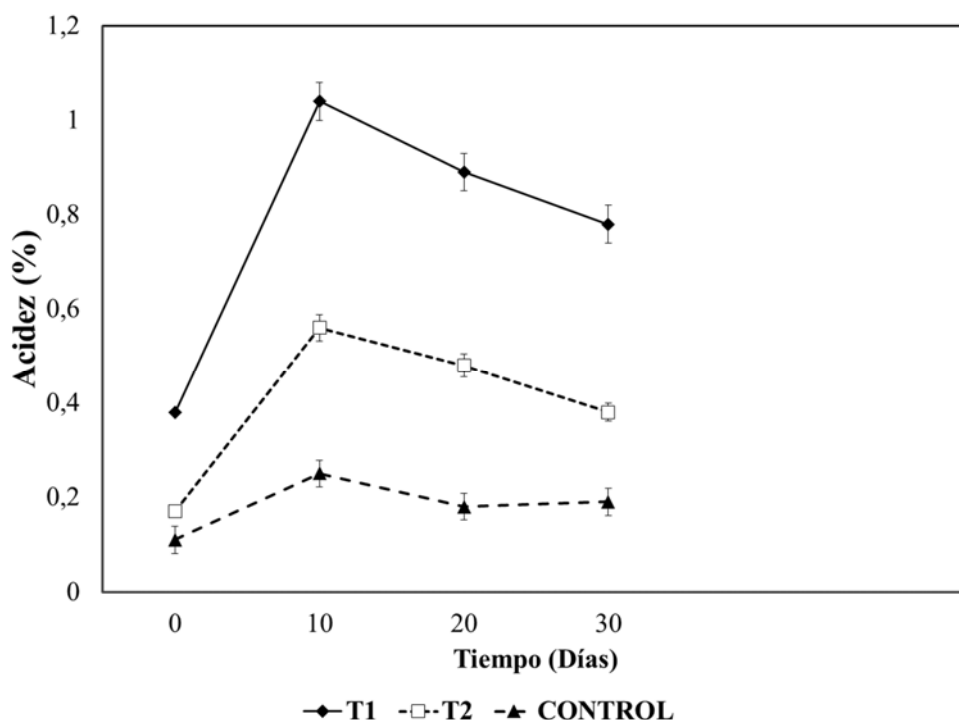


Figura 3. Acidez en queso fresco recubiertas con almidón de yuca y bacterias lácticas *Lactobacillus acidophilus* encapsuladas y sin encapsular, almacenadas durante 30 días a 4 °C y 90% de humedad relativa. ♦ T1, □ T2, ▲ CONTROL.

En cuanto al análisis de acidez, se observó diferencia significativa en todos los tratamientos T1, T2, control, durante un mes de almacenamiento. Durante el día 10 existió mayor porcentaje de acidez en T1, en el día 0 su nivel de acidez es menor al día 10, en los tratamientos T1, T2, control, aquello se debe a la pérdida de viabilidad de BAL LA5 y por lo que disminuye su acidez a partir del día 20 y 30, manteniendo la diferencia estadística en todos los tratamientos. Para Álvarez Yanamango y Barrientos (2011) si existió diferencia en todos los tratamientos, esto

se debe a la población inicial de *Lactobacillus casei* presente en el queso fresco.

3.4 Aerobios Mesófilos

Los datos del análisis microbiológico mostraron que en el día 0 los resultados fueron similares en T1 ($3,0 \cdot 10^7$ UFC/g), T2 ($4,1 \cdot 10^7$ UFC/g) y control ($5,2 \cdot 10^7$ UFC/g) (Tabla 1). Sin tener ningún beneficio aplicando el *Lactobacillus acidophilus*.

Tabla 1. Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g) en muestras de queso, tratadas con almidón de yuca y bacterias lácticas *Lactobacillus acidophilus* encapsulado y sin encapsular durante 30 días a 4 °C.

TRATAMIENTOS	Día 0 CFU/g	Día 10 CFU/g	Día 20 CFU/g	Día 30 CFU/g
T1 Bacterias microencapsuladas	$3,0 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	ND	ND
T2 Bacterias no microencapsuladas	$4,1 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	ND	ND
CONTROL Sin tratamiento	$5,2 \cdot 10^7$	$14,4 \cdot 10^7$	$16 \cdot 10^7$	$17,2 \cdot 10^7$

Los valores corresponden a la media de 3 réplicas. ND = no detectado.



Variando en el día 10, donde se notó mayor contaminación de aerobios mesófilos en el control ($5,2 \cdot 10^7$ UFC/g, a diferencia de T1 y T2 donde el número de colonias fue < 10 UFC/g. En el día 20 los resultados fueron negativos en las muestras T1 y T2 presentando 0 UFC/g, a diferencia del control el cual mostro una presencia de aerobios de $16 \cdot 10^7$ UFC/g. Los análisis realizados en el día 30 los resultados obtenidos de aerobios mesófilos fueron negativos tanto en T1 como en T2 0 UFC/g, mientras que el control mostró ($17,2 \cdot 10^7$ UFC/g).

3.5 Coliformes totales

En cuanto a coliformes totales, Tabla 2 se realizó su análisis en el día 0 a la muestra control, los resultados indica ($< 1,5 \cdot 10$ UFC/g), presente en el queso fresco. En el día 30 de su almacenamiento se realizaron los análisis de coliformes totales a todos los tratamientos T1, T2, y control. Los resultados muestran que existe una ligera contaminación en todos los tratamientos siendo la muestra control con $5 \cdot 10$ UFC/g, T2 con $4 \cdot 10$ UFC/g, T1 con $3 \cdot 10$ UFC/g. Si nos basamos en la norma COVENIN 3821:2003, los resultados están fuera del rango mínimo y máximo permitido en queso fresco.

Tabla 2. Recuento de coliformes totales UFC/g en muestras de queso día 0 tratadas con *Lactobacillus acidophilus* durante 30 días a 4 °C.

TRATAMIENTOS	Estudio+cantidad de BAL LA5	CFU/g
CONTROL	Sin tratamiento	$< 1,5 \cdot 10$

Los valores corresponden a la media de 3 réplicas.

Tabla 3. Recuento de coliformes totales UFC/g en muestras de queso día 30 tratadas con *Lactobacillus acidophilus* durante 30 días a 4 °C.

TRATAMIENTOS	Estudio+cantidad de BAL LA5	CFU/g
T1	Microencapsuladas+0,0723 g	$3 \cdot 10$
T2	Sin microencapsular+0,0723 g	$4 \cdot 10$
CONTROL	Sin tratamiento	$5 \cdot 10$

Los valores corresponden a la media de 3 réplicas.

Con respecto a los análisis de aerobios mesófilos, las BAL LA5 hacen efecto durante los día 20, 30 en los tratamientos T1, T2 con resultados de 0 UFC/g la muestra control fue la que presento mayor contaminación durante los 30 días de almacenamiento alcanzando $17,2 \cdot 10^7$ UFC/g. En los días 0, 10, los tratamientos T1, T2, fueron disminuyendo el número de colonias de aerobios mesófilos hasta llegar al día 30 con 0 número de colonias.

En cuanto al análisis de coliformes totales el control día 0 presento $< 1,5 \cdot 10$ UFC/g, siendo un valor bajo al nivel mínimo permitido por la norma de Venezuela COVENIN 3821:2003 de referencia. Para el día 30 las muestras T1 presento $3 \cdot 10$ UFC/G, T2 $4 \cdot 10$ UFC/g, control $5 \cdot 10$ UFC/g, sin presentar niveles máximos de contaminación manteniéndose por debajo de los niveles mínimos permitidos.

En la investigación de Ramírez et al. (2008) indica que las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* mostraron mayor viabilidad en el conteo de microorganismos 10^7 UFC/g, aportando a la inactivación de bacterias patógenas, al día 15 de almacenamiento disminuyo su viabilidad.

4. CONCLUSIONES

Los tratamientos de conservación de quesos frescos, usando cepas de BAL LA5 encapsuladas o sin encapsular, han resultado eficientes, ya que mejoran las características organolépticas de textura. Los resultados de esta investigación indican que el tratamiento aplicado usando *Lactobacillus* en microcápsulas resulta eficiente en el control microbiológico de aerobios mesófilos y coliformes totales. Estos resultados mejoran las características del queso hasta 30



días de conservación. En contrapartida, los tratamientos con BAL LA5 han aumentado la acidez del queso en el tiempo de ensayo, respecto al control.

En definitiva, se recomienda el uso de cubiertas de almidón de yuca y bacterias BAL LA5 microencapsuladas para la conservación de queso fresco.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez Yanamango, E. G. y Barrientos, A. E. (2011). *Efectos del Lactobacillus casei ATCC 393 TM sobre el Escherichia coli durante la vida comercial del queso fresco*. (Tesis Grado), Universidad Nacional del Callao, Callao (Perú).
- Andrade Bracero, M. J. (2013). *Evaluación de la viabilidad del uso de Lactobacillus acidophilus LA-5 en la elaboración de helados*. (Tesis Grado), Universidad del Azuay, Cuenca (Ecuador).
- Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y. E., Arvizu-Higuera, D. L., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, J. I. y Muñoz-Ochoa, M. (2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(2), 155-168. doi: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432012000200003&nrm=iso
- Lupo Pasin, B., González Azón, C. y Maestro Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151. doi: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/alginatos_en_alimetnos.pdf
- Morales, M. P. (2006). *Factibilidad técnico-económica de elaborar concentrados para la alimentación de salmones en base a ingredientes vegetales*. (Tesis Grado), Universidad Austral de Chile, Valdivia (Chile).
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L. y Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33. doi: http://www.hablemosclaro.org/Repositorio/bibliotecab/303_Alimentos_funcionales_fibra_probioticos_prebioticos_y_simbioticos.pdf
- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63, 5669-5684. doi: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179918602020>
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K. y Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 47(1), 14-25. doi: <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf>
- Ramírez, J. C., Huerta, S., Arias, L., Prado, A. y Shirai, K. (2008). Utilization of fisheries by-catch and processing wastes for lactic acid fermented silage and evaluation of degree of protein hydrolysis and in vitro digestibility. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7(3), 195-204.
- Rodríguez Villanueva, G. L. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá)*. (Tesis Grado), Universidad de la Salle, Bogotá (Colombia).
- Sandoval, A., Rodríguez, E. y Ayala, A. (2004). Encapsulación de aditivos para la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, 5(2), 73-83. doi: http://revistas.univalle.edu.co/index.php/ingenieria_y_competitividad/article/view/2298
- Vargas, E. M. (2004). Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (segunda parte). *Revista de Ingeniería*, 20(2), 23-33. doi: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-49932004000200003
- Zambrano, M. C. (2010). *Elaboración de queso fresco con lautilización de un fermento probiótico (Lactobacillus Acidophilus)*. (Tesis Grado), Escuela Politécnica Nacional, Quito (Ecuador).
- Ziani, K., Santacruz, S. y Castro, M. (2015). Recubrimientos comestibles de quitosano y aloe vera para la conservación de arilos de rambután (Nephelium lappaceum). *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 23(2), 32-43.



Estudio aerobiológico del relleno sanitario municipal de la ciudad de Ambato

Aerobiological study of Ambato municipal controlled landfill

M. Córdova-Suarez¹, E. Andache, P. Castillo

Universidad Técnica de Ambato (UTA), Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
Av. Los Chasquis y Río Payamino, Ambato (Ecuador)

Artículo recibido: 17/10/2016

Artículo aceptado: 22/12/2016

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio aerobiológico en la zona de descarga del relleno sanitario para la Empresa Pública Municipal Gestión Integral de Desechos Sólidos de Ambato (EPM-GIDSA), con el propósito de desarrollar instructivos en los puestos de trabajo de dicho centro. Para ello se relacionaron las principales variables que afectaron el crecimiento microbiano. Para la identificación de las bacterias se utilizaron las pruebas bioquímicas de Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citratos (IMViC), mediante las cuales se alcanzó el nivel de género y especie. Las pruebas realizadas determinaron que en el medio aéreo del relleno sanitario están presentes microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Klebsiella*, cuya detección hace aconsejable el estudio de medidas de seguridad en el entorno del mismo, que eviten posibles problemas de salud pública.

Palabras clave: residuos sólidos comunes, residuos hospitalarios, partículas aerotransportadas, test bioquímicos, microorganismos patógenos

ABSTRACT

In this project an aerobiological study was carried out in the sanitary landfill discharge zone for the Municipal Public Company Solid Waste Management Ambato (EPM-GIDSA). The purpose of this project was to develop instructions for work places in the Company. Thus, the main variables affecting the microbial growth were related. For the identification of the bacteria there were used biochemical tests of Indol, Methyl Red, Voges-Proskauer and Citrates (IMViC) in order to determine the genus as well as the specie level. It was determined that pathogenic organisms such as *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* are present in the aerial environment of the landfill, the detection of which makes it advisable to study safety measures in the environment, avoiding possible public health problems.

Keywords: common solid wastes, hospital wastes, airborne particles, biochemical tests, pathogenic microorganisms.

¹ Autor de correspondencia: Manolo Córdova-Suárez. E-mail: ma.cordova@uta.edu.ec

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo constante de la ciudad, así como el crecimiento paulatino de la población influyen directamente en la generación de residuos sólidos que son manejados por la Empresa Pública Municipal Gestión Integral de Desechos Sólidos de Ambato (EMP-GIDSA). El volumen de estos residuos sólidos urbanos (RSU) es dependiente del nivel de vida de la población, el ingreso económico que esta posea, así como depende del tipo de zona que se trate como rural o urbana.

El estudio aerobiológico del aire generará resultados plausibles sobre la realidad atmosférica de los principales sectores donde los trabajadores realizan sus labores diarias generando una base importante de datos que aportarán al desarrollo de manuales de seguridad para evitar enfermedades en los empleados de GIDSA destinados al relleno sanitario y a la reducción probabilística de epidemias originadas por el transporte en el aire de estos patógenos propios de los desechos sólidos en especial de la fracción orgánica y residuos compostables (Flores et al., 2007).

Se conoce como microorganismos patogénicos o patógenos a aquellos que son capaces de dañar la salud de ser humano debido a la gran interacción existente entre humanos y microorganismos ya que las condiciones de vida de estos seres microscópicos son compartidas con las fuentes alimenticias del ser humano como por ejemplo el agua y las fuentes de carbono (carbohidratos) entre otros que brindan energía principalmente. Dichos organismos microscópicos tienden a enfermar de diferentes maneras al cuerpo humano y muchos de ellos son una de las causas más importantes de una elevada mortalidad, dentro de estos patógenos encontramos a bacterias y protozoarios, a los virus se les incluye dentro de la clasificación de microorganismos a pesar de no tener las mismas características que las bacterias. En el caso de los hongos la mortalidad humana es mínima, aunque si generan afectaciones en la salud principalmente en la piel (Montaño et al., 2010)

Las pruebas bioquímicas conocidas como Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citratos (IMViC) son definidas según el Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN como pruebas utilizadas en el campo de la biología para la identificación de bacterias. IMViC está compuesta

por cuatro pruebas: Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato. El resultado de estas pruebas se los representa con símbolos de positivo o negativo según el resultado de cada prueba (INEN 2015).

Actualmente se llegan a utilizar más pruebas para identificar de mejor manera a los microorganismos patógenos, se incluye principalmente la motilidad y la medición de H_2S . Para este tipo de pruebas se utilizan medios de cultivo sólidos y líquidos específicos para cada prueba, así como en algunas de ellas es necesaria la adición de reactivos que permiten la identificación mediante cambios de coloración en los tubos de ensayo (Reynolds, 2012). Los instructivos de trabajo permiten la normalización y regularización del uso de elementos mitigantes de posibles enfermedades que se generan por la exposición que tienen los empleados a factores biológicos de alto riesgo. Los riesgos laborales deben ser identificado para poder destinar los recursos necesarios para la utilización de los elementos de protección adecuados para cada riesgo identificado, aunque sigue siendo la solución más adecuada el mitigar, reducir o controlar el riesgo desde su origen evitando el uso de elementos de protección específicos para cada trabajador (Abrego et al., 2016).

Con el estudio aerobiológico se identificarán los patógenos presentes en el aire y basados en estos se plantearán instructivos de seguridad e higiene industrial para EPM-GIDSA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de esta investigación se tomó como población de estudio a todas las hectáreas del relleno sanitario manejado por la empresa municipal EPM-GIDSA. Las hectáreas consideradas estaban conformadas por áreas de entrada y salida de vehículos, áreas verdes, áreas selladas donde ya no se deposita basura, áreas abiertas para depósito de basura tanto privada como pública, área destinada a desechos hospitalarios, así como áreas nuevas que estaban siendo adecuadas para la recepción de desechos industriales y desechos hospitalarios.

Del total de celdas se seleccionaron dos zonas específicas, como muestra de estudio. Para la selección de las zonas se tomaron en cuenta la accesibilidad a las mismas, las condiciones ambientales, la probabilidad de encontrar



microorganismos, la recurrencia de empleados y personas privadas en dichos lugares, la utilización de la zona y el proceso de descomposición que se producía en estos lugares.

Como complementación del estudio aerobiológico se procedió a escoger variables que afectaron el desarrollo microbiano en el aire del relleno sanitario. Para dicho aspecto se tomó en cuenta las horas de descarga de los carros recolectores, la hora de trabajo de la maquinaria pesada encargada de distribuir la basura y rellenar las celdas activas, así como los días de trabajo y conocer la presencia de microorganismos potencialmente patógenos en la atmosfera de dicho relleno. Se escogieron dos zonas que fueron consideradas como críticas las mismas en donde se realizaron la toma de muestra y que se identificaron de la siguiente manera:

- Zona 1 (Área de desechos hospitalarios)
- Zona 2 (Área de descarga activa)

El horario de recolección de la muestra se seleccionó debido a las horas de ingreso de los carros recolectores, dos horas de muestreo fueron consideradas como adecuadas (10:00 y 14:00). Se decidió hacer dos semanas de estudio en cuanto a bacterias para obtener 5 días de muestras con dos replicas. En el caso de hongos por cuestión estratégica y presupuestaria se realizó una semana de muestreo, sin embargo, se mantuvo el protocolo, realizando 5 días de muestreo con dos replicas al momento del aislado en medios selectivos para hongos.

Los procesos de muestreo se ejecutaron con trajes de seguridad biológica azules acompañados de botas de caucho, guantes, mascarilla y cofia. El aire fue el objeto de estudio dentro de esta investigación y para esta finalidad se necesitó de jeringas estériles de 20 cc por cada toma de muestra y zona de estudio, realizando 20 aspiraciones en cada zona aproximadamente a 4 o 6 metros de distancia cada una de ellas dependiendo si es zona 1 o zona 2 según el tamaño de las zonas. Las aspiraciones fueron depositadas en matraces de vidrio que contenían medio de cultivo líquido Infusión Cerebro-corazón (BHI). En el caso de hongos se incorporó antes del muestro el antibiótico Ceftriaxona en una cantidad de 100 µl para evitar crecimiento bacteriano.

Los matraces donde se recolectaron las muestras estaban sellados con papel aluminio y eran abiertos únicamente para depositar las aspiraciones, evitando

que la jeringa tope el medio líquido o se sumerja en el mismo. Cada 5 aspiraciones se agitaba el medio para interacción del aire con el medio de cultivo.

Los matraces fueron transportados para ser almacenados e incubados a 37 °C durante 48 horas permitiendo el crecimiento de infinidad de microorganismos, fácilmente observables por el cambio de color del medio, presencia de turbidez del mismo o en algunos casos presencia observable de una capa grasosa en la parte superior del medio líquido dentro de los matraces.

2.1. Aislamiento micótico y bacteriano

Transcurrido el tiempo de incubación de 48 horas se realizaron 4 diluciones (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4) en caldo peptona al 1 %, de la última dilución (10^4) se tomó 100 µl que fueron colocados en placas Petri que contenían medio de cultivo sólido Mac Conkey Agar y Tripteína Soya Agar (TSA) realizando dispersión en placa, e incubándolas durante 48 horas a 37 °C.

Después del tiempo de incubación se evaluaron ambos medios de cultivo, en el caso Mac Conkey la presencia de *E. coli* generó una decoloración del medio, el cual varió su color de rojo a castaño posterior a las 48 horas de incubación, dichas bacterias que presentaron dicho cambio en la coloración fueron aisladas en placas Petri estériles que contenían el mismo medio de cultivo del que procedían usando la técnica de estría simple, dichas placas fueron llevadas a incubación por 48 horas a 37 °C. Luego de este tiempo y comprobado visualmente la ausencia de contaminación bacteriana se procedió a almacenar las muestras para la posterior realización de las pruebas IMViC.

En el caso de TSA no presentó cambio de coloración en el medio, debido, al crecimiento microbiano. El TSA al ser un medio menos selectivo el crecimiento de la colonia fue mayor y para este caso se utilizó placas Petri con el mismo medio para facilitar el crecimiento de las bacterias seleccionadas. Se realizó estría simple en placas tri-Petri que fueron incubadas a 37 °C por 48 horas y luego se almacenaron hasta la realización de las pruebas IMViC. Una vez incubados los matraces que contenían Ceftriaxona se realizaron diluciones en caldo peptona al 1 % hasta 10^3 , de esta última dilución se replicó en medio Sabouraud glucosa al 4 % (SAB) y Extracto Malta Agar (EMA) utilizando la técnica de dispersión en placa. Se replicaron

dichas diluciones en cajas Petri con medio sólido, tomando en cuenta el día, zona y hora de muestreo haciendo dicho aislamiento por duplicado, dichas cajas fueron incubadas por un tiempo de 3 días a temperatura ambiente (25 °C).

Una vez obtenido el crecimiento micótico en las placas Petri se procedió a aislarlos en nuevas placas Petri, según el medio de cultivo del que procedían. Se cortó una porción de agar donde se encontraba el hongo y fue sembrada en las placas vírgenes sin antibiótico y fueron incubadas por tres días a 25 °C para ser posteriormente evaluadas.

2.2. Cantidad microbiana

Para conocer la cantidad microbiana según las zonas de estudio, se procedió a medir la turbiedad de las diluciones que fueron usadas para la dispersión en placa, para lo cual se realizó una curva de calibración que sirvió para la determinación de las unidades formadoras de colonia (UFC) de todos los tubos de dilución 10^4 de bacterias, este proceso no se realizó con hongos. Para esta medición fue necesario preparar estándares para la escala de McFarland (Dalynn Biologicals, 2014).

Una vez obtenida la curva de calibración se midió la muestra contenida en cada tubo de dilución en un espectrofotómetro a 540 nanómetros de longitud de onda y se obtuvieron las absorbancias que sirvieron para la determinación de la concentración de microorganismos en cada dilución.

2.3. Pruebas bioquímicas

Se obtuvieron un total de 75 estrías entre las bacterias aisladas a partir de McConkey y las de TSA, estos microorganismos fueron sometidos a pruebas bioquímicas para determinar su capacidad enzimática y bibliográficamente poder identificarlas como patógenas o no. Se emplearon las 4 pruebas más utilizadas tabuladas y representadas como positivas (+) y negativas (-).

2.4. Prueba del Indol

Se utilizaron tubos de ensayo que albergaban 5 ml de caldo de peptona, cada tubo fue incubado con cada una de las estrías obtenidas, incubadas por 48 horas a 37 °C, una vez terminada la incubación se le añadió a cada tubo 3 gotas del reactivo de Kovacs (Rao, 2006).

2.5. Rojo de metilo

Para esta prueba se utilizó la misma cantidad de tubos que la prueba del Indol, se esterilizó en dichos tubos de ensayo el medio de cultivo líquido rojo de metilo y Voges Proskauer (RM-VP), al cual posteriormente se le inoculó con cada bacteria a identificar, dejándola incubar durante 48 horas a 37 °C, cuando el tiempo de incubación culminó, se le agregó 3 gotas de solución de rojo de metilo al 0,2 %.

2.6. Voges-Proskauer

Se utilizaron tubos de ensayo con medio de cultivo RM-VP inoculados con las estrías de cada bacteria seleccionada e incubados a 37 °C durante un tiempo de 48 horas, una vez concluido el tiempo de incubación se procedió a agregar 2 gotas de solución de hidróxido de potasio al 40 % y 3 gotas de α -naftol al 6 % se agitaron y dejaron reposar durante 5 minutos.

2.7. Citrato de Simmons

Para la prueba de utilización de citrato se empleó tubos microbiológicos de tapa rosca en los cuales se esterilizó medio de cultivo sólido Simmons Citrate, se dejaron enfriar en posición inclinada. Una vez obtenido el agar inclinado se realizaron estrías de todas las bacterias que se encontraban en las placas tri-Petri, estos tubos permanecieron durante 48 horas a 37 °C en incubación. Una vez transcurrido dicho tiempo se evaluó el cambio de coloración del azul de bromotimol del medio.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La siembra en el medio de cultivo TSA presentó excelentes resultados, debido a que, en su totalidad existió crecimiento. Se utilizó un factor de dilución alto, sin embargo, existió abundante crecimiento en la placa, a pesar, del excesivo crecimiento se logró tener colonias aisladas y de esa manera poder realizar un aislamiento de dichas colonias.

La siembra en McConkey Agar presentó resultados diferentes ya que este fue un medio de cultivo más específico y por tal razón no se dio el crecimiento en todas las placas, en ciertas placas existió un crecimiento total donde se cubrió la caja Petri por completo y se tornó de color rosado, mientras que en



otras placas el crecimiento se presentó acompañado con una decoloración del medio.

Para la siembra de hongos se realizó con una dilución baja debido a que la presencia de hongos no es igual a la de bacterias por las mismas condiciones del relleno sanitario. En los dos medios de cultivo existió un crecimiento prácticamente nulo, esta ausencia de crecimiento se atribuyó a las condiciones del día, ya que el tipo de basura que puede ingresar al relleno sanitario no siempre provino de las mismas fuentes y eso generó variaciones, por lo expuesto y el bajo crecimiento de hongos en las placas solo se procedió al aislamiento para ver el tipo de crecimiento.

3.1. Aislamiento de bacterias

La selección de las bacterias se realizó de los diferentes tratamientos, tomando en cuenta colonias separadas y de la diferencia entre sí, para no tener un crecimiento repetitivo de una misma bacteria. Para la identificación se enumeró las estrías de acuerdo al tratamiento de donde fueron seleccionadas, en lo que corresponde al medio de cultivo TSA y para las bacterias aisladas del medio de cultivo McConkey Agar, el aislamiento realizado por estría simple presentó un crecimiento adecuado y sin contaminación.

3.2. Aislamiento de hongos

Para el aislamiento de hongos se replicó el tratamiento que presentó crecimiento, con el propósito de evidenciar el tipo de morfología que el hongo presentó. El hongo identificado fue *Trichoderma*, este tipo de hongo no es infeccioso para el ser humano, de igual manera cabe mencionar que, debido a que, solo existió crecimiento en un solo tratamiento no justificó la realización de microcultivo.

3.3. Pruebas IMViC

Se realizó todas las pruebas IMViC a las 75 bacterias que se obtuvieron en el aislamiento entre los dos medios de cultivo anteriormente mencionados, los resultados se registraron como positivo o negativo, ya que estas pruebas son cualitativas, los datos se tabularon en base al número de estría y al medio de cultivo.

Con la revisión bibliográfica se pudo obtener los resultados del tipo de microorganismos encontrados en el relleno sanitario, donde los resultados de IMViC y del tipo de bacterias se indican en la Tabla 1, sin embargo, existieron bacterias no identificadas para lo cual se debería realizar pruebas bioquímicas específicas, de acuerdo a los resultados obtenidos se evidenciaron presencia de *Shigella flexne*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que presentaron un riesgo para los trabajadores del relleno sanitario.

Tabla 1. Cuantificación de INViC

Microorganismo	Cantidad en muestras
<i>Staphylococcus aureus</i>	6
<i>Klebsiella/Enterobacter</i>	7
<i>Shigella flexneri</i>	11
<i>Escherichae coli</i>	12
<i>Salmonella</i>	9
<i>C. Koseri</i>	4
No determinadas	26

Los microorganismos anteriormente mencionados se encontraron en las dos zonas de descarga de residuos, tanto en la zona de desechos hospitalarios como en la zona de desechos comunes, en horas o días diferentes.

3.4. Recuento de microorganismos viables

El método turbidimétrico se basó en la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm y la

utilización de la escala de McFarland. Se midieron las absorbancias para la elaboración de la curva de calibración Como se observa en la Tabla 2, la curva de calibración permitió obtener la ecuación de la recta para poder determinar las concentraciones basadas en las absorbancias experimentales de los tratamientos con dos réplicas.

Tabla 2. Escala de McFarland

Tubo	Vol. ml H ₂ SO ₄ 1 %	Vol. ml BaCl ₂ 1 %	UFC/ml (X)	Ln X
1	9,9	0,1	3,00E+08	19,52
2	9,8	0,2	6,00E+08	20,21
3	9,7	0,3	9,00E+08	20,62
4	9,6	0,4	1,20E+09	20,91
5	9,5	0,5	1,50E+09	21,13
6	9,4	0,6	1,80E+09	21,31
7	9,3	0,7	2,10E+09	21,47
8	9,2	0,8	2,40E+09	21,60
9	9,1	0,9	2,70E+09	21,72
10	9	1	3,00E+09	21,82

Ln X correspondió al logaritmo natural de UFC/ml. Los tratamientos tomados en cuenta para la semana 1 de muestreo se clasificaron según la zona de desechos como a1 (hospitalarios) y a2 (comunes), según la hora en la que se tomó que fueron b1 (10:00) y b2 (14:00), finalmente los días muestreados fueron

c1 (lunes), c2 (martes), c3 (miércoles), c4 (jueves), c5 (viernes).

Para los cálculos estadísticos se aplicó un diseño factorial AxBxC, procesando los datos en el programa estadístico Infostat (Figura 1).

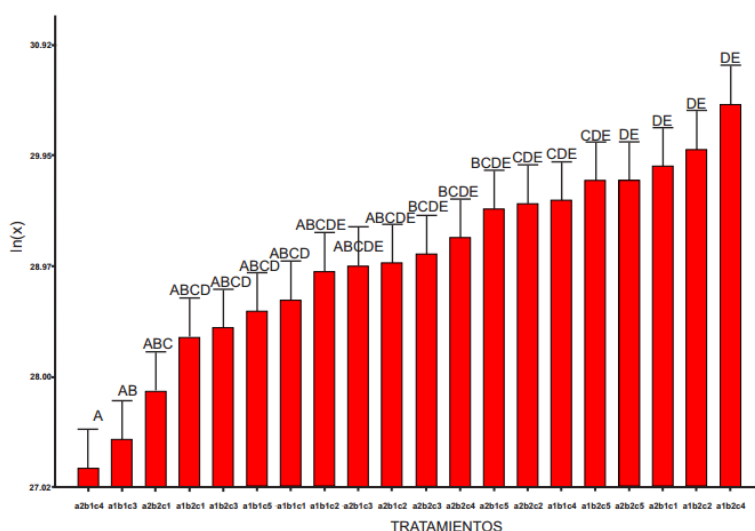


Figura 1. Concentración de microorganismos mesófilos aerobios totales dependientes del tipo de desecho analizado.

El análisis estadístico con la prueba de Tukey al 5 % demostró que las interacciones ABC más relevantes en la contaminación bacteriana existentes en el relleno sanitario de Ambato fueron los días viernes a las 14:00 en la zona de desechos comunes (tratamiento a2b2c5) y los días jueves a las 14:00 en la zona de desechos hospitalarios (tratamiento a1b2c4), por lo tanto, se convirtieron en la mayor contaminación y riesgo para los trabajadores del relleno sanitario de Ambato.

4. CONCLUSIONES

Con la utilización de medios de cultivo selectivos se aislaron bacterias potencialmente patógenas presentes en el aire del relleno sanitario y con los resultados de las pruebas IMViC se identificó la especie y género a las que pertenecieron dichos microorganismos. Los microorganismos identificados pueden generar enfermedades peligrosas y con niveles considerables de mortandad a nivel mundial si no se les da el correcto tratamiento. Además, dichas bacterias son oportunistas y pueden atacar a los trabajadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrego, M., Molinos, S. y Ruiz, P. (2016). Equipos de protección personal (pp. 32).

Santiago de Chile (Chile): ACHS - Asociación Chilena de Seguridad.

Dalynn Biologicals. (2014). McFarland Standard - Catalogue N°. TM50-TM60 http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf.

Flores, F. J., Pardavé, L. M. y Valenzuela, I. C. (2007). Estudio Aerobiológico de la Zona Aledaña al Relleno Sanitario "San Nicolás", Municipio de Aguascalientes. *Investigación y Ciencia*, 37(Enero-Abril), 13-18. doi: <http://www.redalyc.org/html/674/67403703/>

INEN (2015). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-8. Control microbiológico de los alimentos. Detección y recuento de *Escherichia coli* presuntiva por la técnica del número más probable. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S. y Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: Pequeños gigantes. *Elementos*, 77, 15-23.

Rao, S. (2006). IMViC Reactions. *Microrao. Ready Notes* Consultado, en <https://www.microrao.com/>

Reynolds, J. (2012). IMViC: Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate+and H₂S. *BIOL 2421 lab procedures manual* Consultado, en http://delrio.dcccd.edu/jreynolds/microbiology/2421/lab_manual/TOC.html



Obtención de biodiésel a partir de grasa bovina: condiciones de transesterificación y características del combustible

Biodiesel production from bovine fat: transesterification conditions and fuel characteristics

D. Gómez-Miranda, M. Córdova-Suárez¹

Universidad Técnica de Ambato (UTA), Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos¹.
Av. Los Chasquis y Río Payamino, Ambato (Ecuador)

Artículo recibido: 18/10/2016

Artículo aceptado: 22/12/2016

RESUMEN

La investigación aprovechó la grasa de los riñones bovinos del Camal Frigorífico Municipal Ambato para la obtención de biodiésel como combustible de origen animal. Mediante el método de fusión en seco y un proceso de refinamiento se extrajo grasa con características fisicoquímicas adecuadas para la producción de biocombustible. La obtención de biodiésel se realizó mediante una reacción de transesterificación en la que se controlaron los siguientes factores; relación molar de metanol/grasa, tiempo de reacción y tipo y concentración de catalizador. Dichos factores fueron analizados mediante un diseño experimental factorial 2ⁿ. La generación de biodiésel mediante una relación molar 9:1, durante 60 minutos, y empleando una concentración de 0,40 % de KOH como catalizador, permitió alcanzar el mayor rendimiento del proceso de transesterificación (67,75 %) y un beneficio de 0,05 USD por litro producido. El biodiésel elaborado mediante dicha combinación de factores, permitió obtener un biodiésel limpio y brillante con un punto de inflamación de 132,4 °C, asegurando su desempeño como combustible según la norma ASTM D 93 vigente en Ecuador.

Palabras clave: Biodiésel, grasa bovina, fusión en seco, transesterificación, camal.

ABSTRACT

In this investigation, fat from the bovine kidneys of “Camal Frigorífico Municipal Ambato” was used to obtain biodiesel as an animal fuel. Using the dry melt method and a refinement process, fat was extracted with physicochemical characteristics suitable for the production of biofuel. The biodiesel was obtained by a transesterification reaction in which the following factors were controlled; Methanol / fat molar ratio, reaction time and type and catalyst concentration. These factors were analysed using a 2ⁿ experimental factorial design. The generation of biodiesel by means of a 9: 1 molar ratio for 60 minutes and using a concentration of 0.40 % KOH as catalyst allowed the highest transesterification efficiency (67.75 %) to be achieved and a benefit of 0.05 USD per litre produced. The biodiesel produced by this combination of factors allowed obtaining a clean and bright biodiesel with a flash point of 132.4 °C, ensuring its performance as fuel according to the ASTM D 93 norm in force in Ecuador.

Keywords: Biodiesel, bovine fat, dry melting, transesterification, slaughterhouse

¹ Autor de correspondencia: Manolo Córdova-Suárez. E-mail: ma.cordova@uta.edu.ec



1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios recientes, han explorado la posibilidad de utilizar como materia prima los residuos grasos vegetales para la producción de biodiésel mediante una reacción de transesterificación (Bulla Pereira, 2014). Sin embargo, existen menos estudios de utilización de los residuos grasos de los riñones vacunos en comparación con la utilización de grasas vegetales, a pesar de que tienen mayor contenido de ácidos grasos saturados y proporcionan mayor estabilidad al producto final, esto se ha dado porque en la composición de la grasa animal existe una gran cantidad de ácidos grasos de cadena larga (más de 8 átomos de carbono), como el ácido esteárico que tiene una temperatura de fusión mayor a 40 °C (Vivas, 2010). Por otro lado, independientemente del catalizador empleado, los residuos grasos animales pueden aumentar la temperatura de fusión del biodiésel, lo que puede ser una desventaja en climas fríos (Sandoval et al., 2009). La reacción de transesterificación de una grasa se da cuando los triglicéridos reaccionan con metanol, bajo la acción de NaOH o KOH (catalizadores básicos que aceleran la reacción de transesterificación), para producir una mezcla de metilésteres de ácidos grasos y glicerina, además, para obtener un mayor rendimiento en la producción de biodiésel se utiliza un tiempo de reacción de 60 minutos y en el caso de la grasa bovina se tiende a utilizar concentraciones mínimas de catalizador de 0,35 y 0,4 % (Angarita y Herrera, 2008; Arévalo et al., 2008). Esta reacción consta de tres etapas donde el triglicérido es convertido consecutivamente en diglicérido, monoglicérido y glicerina (Dinis, 2012).

La ASTM (American Society for Testing Materials) International está fomentando el uso de una fuente de energía alternativa con la publicación de octubre de 2008 de especificaciones nuevas y revisadas para el biodiésel (Fajardo, 2015). Las nuevas normas le dan a la industria una herramienta valiosa reconocida y aceptada del mismo modo por compradores y vendedores que garantiza la calidad y el comportamiento del producto porque establece parámetros claramente definidos (Kessel, 2009). Por este motivo el objetivo de este trabajo de investigación es determinar las características de biodiésel obtenido de grasa de los riñones bovinos.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materia prima y extracción por método de fusión en seco

La grasa bovina proveniente del CFMA, fue recolectada de la sala de oreo antes que se mezcle con los efluentes líquidos en el sistema de alcantarillado. Tras la recolección, la grasa se lavó con agua y se eliminaron los restos de carne. A continuación, se cortó hasta formar trozos de un centímetro y se almacenó en recipientes cerrados en refrigeración.

Para la extracción se pesaron 200 g de grasa triturada, a continuación, se colocó la grasa en una olla y se cocinó a una temperatura superior a 80 °C, evitando que ésta se queme. Finalmente, la grasa líquida fue filtrada dos veces a través de un cedazo metálico y un lienzo de tela separando la grasa de la materia residual (chicharrones) (Marcilla, 1998).

2.2. Refinamiento y parámetros fisicoquímicos de la grasa

Este proceso se realizó en cuatro etapas:

-Desgomado: a la grasa líquida se agregaron 25 ml de agua destilada y la mezcla se calentó a 80-90 °C por 10 minutos, con agitación constante.

-Separación de lecitina: a la solución caliente de grasa y agua destilada se agregaron 2 g de ácido cítrico. Luego se calentó a 80-90 °C por 10 minutos, con agitación constante. Finalmente se dejó enfriar la grasa por 1 hora y se separó la fase sólida de la líquida (lecitina) por decantación.

-Blanqueado: se colocó grasa sólida en una jarra con una solución de 500 ml de agua destilada y 10 % de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes y se dejó en reposo por 7 días a temperatura ambiente.

-Secado: la grasa sólida se calentó a 120 °C por 30 minutos con agitación, evitando que la grasa se queme (Angarita y Herrera, 2008; Yaulema Yulan, 2014).

Para la evaluación de los parámetros fisicoquímicos se realizó:

-Determinación de la densidad: Se llevó a cabo según la norma (INEN, 1973) a una temperatura de 65 °C.

-Determinación de la viscosidad cinemática: Se llevó a cabo según la norma (INEN, 1987) a una temperatura de 65 °C.

-Determinación del índice de refracción: Se llevó a cabo según la norma NTE INEN ISO 6320 (INEN, 2013b) a una temperatura de 40 °C.

-Determinación del porcentaje de ácidos grasos libres: Se llevó a cabo según la norma NTE INEN ISO 660 (INEN, 2013a).



-Determinación del índice de peróxidos: Se llevó a cabo según la norma NTE INEN ISO 27107 (INEN, 2013c).

2.3. Proceso de obtención de biodiésel y propiedades fisicoquímicas

En la transesterificación con calor se utilizó grasa extraída por el método de fusión en seco. Se

realizaron ensayos con 100 ml de grasa donde varió la relación molar, el tiempo de reacción y el tipo y concentración de catalizador (Dinis, 2012).

Los factores y niveles que se utilizaron en este proceso se indican en la Tabla 1.

Tabla1.- Factores y niveles de estudio para la obtención de biodiésel

Factores	Niveles
A. Relación molar metanol:grasa	A1: 6:1 A2: 9:1
B. Tiempo de reacción	C1: 30 minutos C2: 60 minutos
C. Concentración de catalizador	B1: 0,35 % B2: 0,40 %
D. Tipo de catalizador	D1: Hidróxido de Sodio D2: Hidróxido de Potasio

Para la purificación del biodiésel se realizó el siguiente proceso:

-En un matraz Erlenmeyer se agregó biodiésel sin purificar y una solución de agua acidulada (pH 3,5) con ácido cítrico en proporción 5:1 (p/p) (agua-ácido).

-Se agitó la mezcla por un minuto y se separó por decantación el biodiésel a las dos horas de reposo. Se repitió tres veces este proceso, obteniendo de esta forma un líquido residual (agua y catalizador) de color blanquecino en el primer lavado. En el último lavado el líquido fue más claro con pH casi neutro (pH 7,04).

-Finalmente se realizó el secado del biodiésel en estufa a 100 °C por 4 horas para eliminar el exceso de agua y metanol (Césare et al., 2009).

Una vez determinado el tratamiento de máximo rendimiento de generación de biodiésel, se elaboró 1 L de combustible mediante dicho tratamiento. De esta muestra se realizaron análisis de densidad relativa, viscosidad cinemática y determinación del punto de inflamación. Estos análisis se realizaron en el Departamento de Petróleos, Energías y Contaminación de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Central del Ecuador, siguiendo los métodos recogidos en la norma (INEN, 2009).

El biodiésel generado a partir de cada una de las combinaciones experimentales del proceso de

transesterificación se analizó teniendo en cuenta las siguientes variables:

-Densidad. La densidad se determinó a una temperatura de 15 °C según la norma NTE INEN 0035 (INEN, 1973).

-Viscosidad cinemática. La viscosidad se determinó a una temperatura de 40 °C según la norma NTE INEN 0810 (INEN, 1987).

-Rendimiento de biodiésel. Para calcular el porcentaje de biodiésel se midió el volumen obtenido a partir de 100 mL de grasa para cada tratamiento.

Por último, se cuantificó la glicerina total, libre y ligada presente en la fase glicérica según la norma Ca 14-56 (AOAC, 1990).

2.4 Diseño experimental

Se aplicó un diseño factorial 2ⁿ de cuatro factores con dos niveles y dos réplicas para cada tratamiento experimental. En la Tabla 1 se detallan los factores y niveles para la obtención de biodiésel.

2.5. Análisis estadístico

Las características fisicoquímicas de la grasa se analizaron por triplicado, mientras que las propiedades fisicoquímicas del biodiésel, se analizaron por duplicado. Para todos los parámetros se calculó la media y la desviación



típica. A partir de dichos estadísticos, se calculó el coeficiente de variación de Pearson como medio de comparación de la dispersión de los datos de cada variable. La comparación entre tratamientos (separación de medias) se llevó a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA), empleando el test de Tukey con un nivel de confianza del 95 %. Los cálculos estadísticos fueron efectuados mediante el software Statgraphics Centurion XV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis del método de extracción y refinamiento de la grasa.

En el proceso de extracción de la grasa por fusión en seco los tejidos grasos se descomponen, la grasa sube a la superficie del recipiente mientras que en el fondo quedan los residuos formados por los restos del tejido del que se ha extraído la grasa.

Con este método se obtuvieron rendimientos de 90,3 % de grasa y 9,7 % de materia residual (chicharrones).

En la primera etapa del refinamiento de la grasa (desgomado con agua destilada) se eliminaron los fosfolípidos hidratables perjudiciales para la elaboración del biodiésel y como producto residual de este proceso se obtuvo lecitina de color blanquecino, que desde el punto de vista químico es un éster fosfórico enlazado con diglicéridos esteáricos, palmíticos u oleicos que se encuentra en cualquier grasa de origen vegetal o animal (Yaulema Yulan, 2014).

En la segunda etapa, al añadir pequeñas cantidades de ácido cítrico en la grasa desgomada, los fosfolípidos no hidratables (fosfolípidos que forman sales con metales como calcio o magnesio, insolubles en agua) se convirtieron en fosfolípidos hidratables (Angarita y Herrera, 2008; Yaulema Yulan, 2014).

En la tercera etapa, se eliminaron los pigmentos carotenoides que estructuralmente están constituidos por cadenas unidas de hidrocarburos altamente insaturados, y se disminuyó el mal olor producido por el oxígeno del aire y las bacterias presentes (Angarita y Herrera, 2008; Bailey, 1984).

En la cuarta etapa, el secado de la grasa, se eliminó un 2,3 % de agua residual de las etapas anteriores. La eliminación de agua en la grasa es importante, debido a que su presencia durante la elaboración de biodiésel origina la formación de subproductos de bajo valor añadido (jabones) y disminuye el rendimiento de producción de biodiésel.

Al final del proceso de refinamiento se obtuvo un 97,7 % de grasa libre de agua, fosfátidos, metales, pigmentos o sustancias que producían mal olor, siendo adecuada para la producción de biodiésel.

3.2. Parámetros de la grasa extraída mediante fusión en seco

La Tabla 2 presenta los parámetros fisicoquímicos de la grasa extraída por el método de fusión en seco.

Tabla 2. Resultados de los parámetros fisicoquímicos de la grasa extraída por el método de fusión en seco

Parámetro	Unidades	Promedio	Desviación típica
Densidad a 65 °C	g·mL ⁻¹	0,852	0,002
Viscosidad cinemática a 65 °C	cSt	9,730	0,035
Índice refracción a 40 °C	-	1,942	0,001
Ácidos grasos libres* ²	%	0,892	0,003
Índice de peróxidos* ²	mEq O ₂ ·kg ⁻¹	4,388	0,018



*Los valores de los parámetros fisicoquímicos corresponden a un promedio de tres repeticiones por determinación ($n=3$). *Para determinar el porcentaje de ácidos grasos libres y el índice de peróxidos, se utilizó una temperatura de 40 a 50 °C.

Estos parámetros fueron determinados a 65 °C, para evitar que la cantidad elevada de ácidos grasos saturados que contenía la grasa animal, se solidificara a temperatura ambiente (Bailey, 1984; Darensbourg et al., 1992).

El índice de refracción (1,942) se encontró próximo a la investigación realizada por Vivas (2010) la cual reporta un valor de 1,956 indicando la alta calidad de la grasa obtenida.

Considerando que el porcentaje de ácidos grasos libres fue menor a 3% no afecta a la eficiencia de conversión de metilésteres y determinó que el proceso de esterificación no fue necesario (Faber Archila y Cantero Vergara, 2010; Vivas, 2010). Según Codony et al. (2010), los aceites y grasas recicladas presentan un valor de 7,6 mEq $O_2 \cdot kg^{-1}$, y al ser una grasa recién preparada este valor fue bajo (4,378 mEq $O_2 \cdot kg^{-1}$).

3.3. Evaluación de las condiciones de transesterificación

Durante la transesterificación el solvente que se utilizó fue el metanol, debido a su rápida acción con los triglicéridos a bajas temperaturas, disuelve fácilmente los catalizadores alcalinos y es económico. En el análisis de la relación molar alcohol/grasa, la relación estequiometría mínima metanol/grasa para la formación de metilésteres ha de ser 3:1 (Vivas, 2010). Sin embargo, al ser una reacción de equilibrio y con el fin de favorecer la formación de metilésteres se optó por trabajar con una relación molar metanol/grasa de 6:1 y de 9:1.

3.4. Determinación de la temperatura y tiempo de reacción

Se observó que la temperatura en el proceso de transesterificación aumentaba la solubilidad de la grasa en el metanol originando una mayor velocidad de reacción. La reacción de transesterificación era lenta al inicio y el rendimiento aumentaba con el tiempo. Teniendo en consideración esto, se utilizaron tiempos de 30 y 60 minutos de reacción.

3.5. Elección del tipo de catalizador

Los catalizadores que se utilizaron fueron NaOH y KOH. Dichos catalizadores son los más comunes en la obtención de biodiésel, debido a que proporcionan una buena calidad y alto rendimiento de producción a bajo costo. Por otro

lado, dichos catalizadores presentaron algunos inconvenientes:

- Fueron difíciles de separar al momento de realizar la purificación del biodiésel.

- Provocaron la formación de jabón.

- Resultaron muy sensibles a la humedad (higroscópicos), de forma que la presencia de agua provocó un aumento del consumo de catalizador.

3.6. Determinación de la concentración óptima de catalizador

Para determinar la concentración de catalizador se realizaron ensayos con concentraciones de 0,5 y 1,0 % de catalizador y con una relación molar de metanol/grasa 9:1. Los resultados que se obtuvieron no fueron favorables ya que la solución se saponificaba por el exceso de catalizador. A continuación, se realizaron ensayos con porcentajes de 0,4, 0,35, 0,3, 0,25 y 0,2 % de catalizador y se determinó que los porcentajes de 0,4 y 0,35 %, después de 24 horas de terminar la reacción de transesterificación, permitían obtener biodiésel con mayor rendimiento siendo estos los más adecuados. El resto de las concentraciones no permitió obtener biodiésel con un rendimiento adecuado, por lo que estos ensayos fueron descartados.

3.7. Determinación del proceso de purificación del biodiésel

La purificación del biodiésel se desarrolló mediante dos pasos. El primer paso fue el lavado del biodiésel; en este paso se observó la formación de una capa blanca al fondo del recipiente que contenía trazas de jabón y glicerol que no se eliminaron en el proceso de transesterificación. Se realizaron tres lavados y se comprobó que este proceso fue eficiente, ya que el líquido residual del último lavado fue transparente y de pH 7,02.

El segundo paso fue el secado del biodiésel, que se realizó para eliminar el agua remanente. De esta forma, se pudo obtener un biodiésel brillante y traslúcido, de olor agradable y color amarillo.

3.8. Análisis estadístico del rendimiento de biodiésel

En la Tabla 3 se indican los valores promedio de rendimiento, desviación típica del biodiésel y el coeficiente de variación de Pearson.



Tabla 3. Datos de rendimientos de obtención de biodiésel a partir de la grasa

Tratamiento	Rendimiento Biodiésel (%)	
	R1	R2
T1	50,2	49,5
T2	51,3	52,1
T3	52,8	51,3
T4	52,9	53,2
T5	52,8	54,9
T6	54,5	55,1
T7	56,4	54,8
T8	58,3	57,9
T9	59,4	60,7
T10	62,9	63,2
T11	60,3	61,7
T12	62,1	61,8
T13	63,1	64,3
T14	66,8	65,9
T15	64,8	66,4
T16	67,1	68,4
Media	58,65	
Desviación típica	5,72	
CV Pearson	9,75	

Estos resultados señalan la posible existencia de diferencias significativas entre los tratamientos experimentales, que se analizaron con detalle mediante un análisis de varianza multifactorial, para determinar la importancia relativa de cada uno de los factores implicados en el proceso de transesterificación.

3.9. Propiedades fisicoquímicas del biodiésel

La densidad relativa del biodiésel fue determinada según la norma ASTM D 1298 (rango permitido: 0,85–0,90 g/mL), obteniéndose una densidad de 0,899 g/mL. Dato que estuvo dentro del rango permitido por la norma, pero muy cerca del límite superior, por lo que si el biodiésel estuviera a temperaturas inferiores a 15 °C podría llegar a gelificarse (Vivas, 2010)

La viscosidad cinemática del biodiésel fue determinada a una temperatura de 40 °C según la norma ASTM D 445 (rango permitido: 3,5-5). Se obtuvo una viscosidad cinemática de 6,23 cSt, valor que fue superior al rango establecido por la norma. Este resultado probablemente se obtuvo debido a que en la composición de la grasa bovina existe un alto porcentaje de ácido esteárico que tiene una temperatura de fusión de 40 °C (Bailey, 1984).

El punto de inflamación se determinó según la norma ASTM D 93 (valor mínimo: 120 °C), obteniéndose un punto de inflamación de 132,4 °C que está dentro del rango permitido por la norma.

En la fase glicérica se obtuvieron porcentajes de 40,5 % de glicerina total, 32 % de glicerina ligada y un 8,5 % de glicerina libre. Tras la transesterificación, se observó que la fase glicérica contenía una alta cantidad de glicerina ligada debido a la existencia de un alto porcentaje de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos no transformados durante el proceso.

Después de la transesterificación se observó que el biodiésel impuro tenía un fuerte olor a metanol y un color 2,5 según la norma ASTM D 1500. Luego de la purificación se obtuvo un biodiésel de olor agradable, ya que el metanol se evaporó en el proceso de secado. También paso a tener un color 1,5 siendo este un indicativo de buena calidad, debido a que si se obtenía un producto de color oscuro esto quería decir que el biodiésel todavía contenía glicerolos y trazas de jabón (ASTM, 2003; Avellaneda Vargas, 2010). En definitiva, se obtuvo un combustible limpio y brillante.

3.10. Características del biodiésel como combustible

Según Vivas (2010), en el proceso de obtención de biodiésel a partir de grasa bovina hay formación de palmitato de metilo (40,83 %), de estearato de metilo (34,81 %) y de metilésteres de cadena más corta (24,36 %). Siendo el estearato de metilo uno de los componentes con mayor porcentaje en el biodiésel bovino, y un metiléster de cadena larga que tiene una temperatura de fusión de 40 °C (Bailey, 1984) podría explicar la densidad muy cercana al límite y la viscosidad fuera del rango establecida por la norma para biodiésel. Para mejorar las características por la norma para biodiésel bovino se podría mezclar con diésel fósil, pueden ser reguladas a través de la mezcla. Otra opción es utilizar el biodiésel bovino en climas cálidos (Cerón Sánchez, 2010; Dinis, 2012) para evitar problemas mecánicos que afecten al flujo de combustible en las tuberías y el inyector del motor.

El punto de inflamación indicó que a una temperatura de 132,4 °C los vapores que se desprendían del biodiésel empezaban a arder y mantener una llama sin necesidad de calor. Con esto se comprobó el desempeño del biodiésel bovino como combustible.

3.11. Estimación del costo de producción de biodiésel a partir de grasa bovina

Para el análisis costo-beneficio se determinó que, además de aprovechar la grasa bovina del Camal para obtener biodiésel, también se obtuvo como producto residual glicerina impura. En el mercado libre, el precio promedio mínimo de la glicerina pura es de 10 USD por litro, mientras que la glicerina pura grado analítico comercializada por empresas que distribuyen reactivos (LABOMERSA y NOVACHEM) tiene un costo de 139 USD + IVA por litro. La glicerina que se obtuvo en el proceso de transesterificación fue impura, por lo que para realizar los cálculos de costo-beneficio se consideró un precio referencial de 3,50 USD por litro, la glicerina puede ser utilizada como materia prima en la industria cosmética.

Teniendo en consideración las entradas y salidas del proceso de obtención de biodiésel, se determinó que el tratamiento 1 fue el proceso que mayor beneficio generó en la elaboración de biodiésel (0,69 USD·L⁻¹), que presentó las siguientes características:

- Relación molar de metanol-grasa de 6:1
- Tiempo de reacción de transesterificación: 30 minutos.

- Tipo y concentración de catalizador: NaOH al 0,35 %.

En cuanto al tratamiento 16 produjo menor beneficio (0,05 USD·L⁻¹). En todo caso, habrá que tener siempre presente que los resultados presentados dependerán, en cada momento, de la coyuntura de precios del mercado.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se comprobó que la grasa bovina del CFMA puede ser aprovechada para obtener biodiésel como combustible.

Con los procesos de extracción de grasa por el método de fusión en seco y refinamiento, se determinó que se puede obtener una grasa con características fisicoquímicas adecuadas para la producción de biodiésel. El porcentaje de ácidos grasos libres resultó ser la característica más importante porque, a partir de dicho parámetro, se determinó que el proceso de esterificación no era necesario pudiéndose economizar de esta manera materiales y reactivos.

En cada una de las diferentes combinaciones de factores y niveles implicados en el proceso de transesterificación, se obtuvieron muestras de biodiésel de alto rendimiento, con densidades que estuvieron dentro del rango establecido por la norma ASTM D 1298, pero con viscosidades cinemáticas que no cumplieron con la norma ASTM D 445.

Mediante análisis estadístico se pudo determinar que el mejor tratamiento para la obtención de biodiésel tenía la siguiente combinación de factores y niveles: relación molar de metanol/grasa de 9:1, tiempo de reacción de 60 minutos, utilizando KOH como catalizador a una concentración de 0,40 %.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato por los recursos otorgados para la ejecución de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angarita, D. y Herrera, H. (2008). *Evaluación de un proceso de transformación de grasas de pollo en materia prima óptima para la incorporación en procesos industriales*. Tesis grado, Universidad de Pamplona, Pamplona (Colombia).



- AOAC. (1990). AOAC: Official Methods of Analysis (Vol. 1): AOAC.
- Arévalo, P., Ulloa, J. y Astudillo, S. (2008). Obtención de biodiesel a partir de grasa bovina. *La Granja*, 8(2), 9-16.
- ASTM. (2003). ASTM D 1500: ASTM Color of Petroleum Products (ASTM Color Scale) (Vol. 1500): ASTM.
- Avellaneda Vargas, F. A. (2010). *Producción y caracterización de biodiesel de palma y de aceite reciclado mediante un proceso batch y un proceso continuo con un reactor helicoidal*. UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI, Tarragona.
- Bailey, A. E. (1984). *Aceites y grasas industriales* (2 ed.). Barcelona: Reverte S.A.
- Bulla Pereira, E. A. (2014). *Diseño del proceso de producción del biodiesel a partir de aceites de fritura*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Cerón Sánchez, A. A. (2010). *Evaluación experimental de la producción de biodiesel por destilación reactiva*. Universidad Nacional Sede Manizales, Manizales.
- Césaire, M., Castillo, L., Beteta, V., Calle, J. L. y León, J. J. (2009). Evaluación de la purificación de biodiésel en la etapa final de producción. *Sociedad Química de Perú*.
- Codony, R., Guardiola, F., Bou, R. y Tres, A. (2010). Valoración analítica y nutricional de las grasas. Madrid: FEDNA.
- Darensbourg, D., Darensbourg, M., Dickerson, R. y Gray, H. (1992). *Principios de Química* (3 ed.). Barcelona: Reverte S.A.
- Dinis, A. (2012). *Obtención de biodiesel por transesterificación de aceites vegetales: nuevos métodos de síntesis*. Universidad de Extremadura, Badajoz.
- Faber Archila, J. y Cantero Vergara, K. (2010). Simulación de un proceso de producción de Biodiesel por Lotes a través de medios químicos. *Prospectiva*, 8(Enero-Junio), 35-42. doi: <http://hdl.handle.net/11619/1315>
- Fajardo, F. (2015). *Técnicas de Caracterización para el Biodiésel basadas en la Normatividad Internacional ASTM*. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
- INEN. (1973). NTE INEN 0035: Grasas y aceites comestibles. Determinación de la densidad relativa (Vol. 0035). Quito: INEN.
- INEN. (1987). NTE INEN 0810: Productos de petróleo. Determinación de la viscosidad cinemática y dinámica en líquidos transparentes y opacos. (Vol. 0810). Quito: INEN.
- INEN. (2009). NTE INEN 2482: Biodiesel. Requisitos (Vol. 2482). Quito: INEN.
- INEN. (2013a). NTE INEN-ISO 660: Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de acidez y de la acidez. (IDT) (Vol. 660). Ecuador: INEN.
- INEN. (2013b). NTE INEN-ISO 6320: Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de refracción. (IDT) (Vol. 6320). Quito: INEN.
- INEN. (2013c). NTE INEN-ISO 27107: Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Determinación del índice de peróxido. Determinación potenciométrica del punto final. (IDT) (Vol. 27107). Quito: INEN.
- Kessel, N. (2009). Magazines & Newsletters / ASTM Standardization News. *Magazines & Newsletters / ASTM Standardization News*. Retrieved from http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPJF09/nelson_spjf09.html
- Marcilla, A. (1998). Introducción a las operaciones de separación cálculo por etapas de equilibrio. *Universidad de Alicante*.
- Sandoval, G., Rivera, I. y Villanueva, G. (2009). Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática *Grasas y Aceites* (Vol. 60, pp. 470-476).
- Vivas, A. (2010). *Estudio y obtención de biodiesel a partir de residuos grasos de origen bovino*. Tesis Grado, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira (Colombia).
- Yaulema Yulan, D. H. (2014). *Regeneración de aceites comestibles*. Tesis Grado, Universidad de Guayaquil, Guayaquil (Ecuador).



Validación del método de determinación de Vitamina B₂ por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

A validated high efficiency liquid chromatography (HPLC) method for the determination of Vitamin B₂

M. Córdova-Suarez¹, M. Semanate

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos,
Av. Los Chasquis y Payamino, Ambato – Ecuador

Artículo recibido: 03/06/2016

Artículo aceptado: 20/11/2016

RESUMEN

La validación de métodos analíticos es un proceso indispensable para garantizar que los resultados obtenidos sean fiables y reproducibles en el laboratorio que se desee implementar el método. Para la validación, se empleó la metodología descrita en el Método AOAC 970.65 modificado y la norma ISO/IEC 17025. Los resultados obtenidos mostraron un coeficiente de correlación lineal superior a $r = 0,999$ para todas las curvas de calibración, el LD fue igual a $0,002 \mu\text{g/mL}$ y el LC fue de $0,08 \mu\text{g/mL}$. El rango de trabajo comprendió una concentración de riboflavina desde $0,008$ hasta $1,003 \mu\text{g/mL}$, un coeficiente de variación por repetibilidad menor al 3 % y reproducibilidad menor al 5 %. El valor del Z_{score} se encontró dentro de los límites establecidos para cada MRC. La Incertidumbre Combinada y Expandida para los tres primeros niveles establecidos de $\pm 0,04$ y $\pm 0,08$ mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra. Para el último nivel, se estableció un valor de Incertidumbre Combinada de $\pm 0,05$ e Incertidumbre Expandida igual a $\pm 0,09$ expresado en unidades de mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra.

Palabras claves: Validación, riboflavina, repetibilidad, reproducibilidad, incertidumbre.

ABSTRACT

The validation of analytical methods is an essential process to ensure that the obtained results are reliable and reproducible in the laboratory where the method will be applied. For the validation it was used the methodology described in the modified AOAC 970.65 method and the standard ISO / IEC 17025. The results obtained showed a linear correlation coefficient higher than $r = 0.999$ for all the calibration curves, the LD was equal to $0.002 \mu\text{g} / \text{ml}$ and LC was $0.08 \mu\text{g} / \text{ml}$. The working range was between 0.008 and $1.003 \mu\text{g} / \text{mL}$, the coefficient of variation per repetition less than 3 % and reproducibility less than 5 %. The value of the Z-score was found within the limits established for each MRC. Combined and Expanded Uncertainty for the first set levels of ± 0.04 and ± 0.08 mg of vitamin B₂ per 100 g of sample. For the last level, a Combined Uncertainty value of ± 0.05 and Expanded Uncertainty equal to ± 0.09 expressed in units of mg of vitamin B₂ per 100 g of sample was established.

Keywords: Validation, riboflavin, uncertainty.

¹ Autor de correspondencia: Manolo Cordova Suárez. E-Mail: ma.cordova@uta.edu.ec



1. INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos es un proceso mediante el cual se establece que un método cumple con las características de desempeño y los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. El resultado de la validación es probar la aptitud de los métodos, documentar su validez y cumplir con los estándares de calidad (Eurolab España 2012, 2016; Pappa, 2013). El principio del método para la extracción y cuantificación de la vitamina B₂ consiste en un tratamiento enzimático de la muestra, seguido por una hidrólisis ácida, para luego ser leído por HPLC. Finalmente el principio activo es detectado por el espectrofluorómetro (AOAC, 1990). La cromatografía permite la separación de componentes de una mezcla para poder ser detectados posteriormente (Swadesh, 2000).

La técnica de análisis de elección y más reportada bibliográficamente para la determinación de vitaminas es la técnica cromatográfica, gaseosa y de líquidos donde se utiliza por lo general en fase normal columnas de sílice y en fase reversa columnas tradicionales C18 (Sierra et al., 2007).

La cromatografía líquida (HPLC) presenta ventajas sobre los métodos citados debido a la gran sensibilidad y especificidad que ha demostrado en el análisis de vitaminas (Bueno-Solano et al., 2009). El presente trabajo tiene la finalidad de validar una metodología analítica para la determinación de Riboflavina (Vitamina B₂) en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la realización del trabajo se utilizaron materiales certificados por el National Institute of Standards & Technology (NIST), (Standard Reference Material ® 1849a (MRC-78) y ® 3233 (MRC-77), USA)

Se utilizó una columna para HPLC C18 (4,6 x 250) mm, 5µm (Agilent ZORBAX, USA). Además, se requirió de un termómetro (Thermo Scientific, USA), se necesitaron pipetas automáticas (Oxford, USA), se utilizaron balones de aforo viales (Agilent ZORBAX, USA) para HPLC y un micro filtro poro 0,45 µm×13 mm (Amp®, USA), agua desmineralizada tipo 1, ácido clorhídrico fumante 37 % (Merck, Alemania), acetato de sodio anhidro AR/ACS CH₃COONa (LOBA Chemia, India), NN-Dimetilformamida grado HPLC (Merck, Alemania), fosfato di-básico de potasio K₂HPO₄ (LOBA Chemia, India), ácido acético glacial concentrado (Merck,

Alemania). alfa-amilasa (Amp®, USA), papaína (Amp®, USA), estándar de Vitamina B₂ (Riboflavina), (CHEM SERVICE INC, USA).

Los equipos utilizados fueron un HPLC (Perkin Helmer series 2000, USA), software de análisis certificado versión N200 (Chromatography Data System, SURWIT TECHNOLOGY INC, Hangzhou-China), detección por fluorometría (Espectrofluorómetro Perkin Helmer series 2000, USA), equipo de sistema de purificación de agua MILLI Q-SYSTHESES Millipore SAS67120 MOISHEI (Merck, USA), balanza analítica (Mettler Toledo modelo AX 05, México), baño de agua (Thermo Scientific modelo 2865, USA), ultrasonido (Spectrum, USA) y pH-metro (Mettler Toledo, México)

2.2 Metodología

La metodología que se empleó fue la expuesta en el Método Oficial AOAC 970.65 modificado (AOAC, 1990).

2.2.1 Preparación de la fase móvil (K₂HPO₄ 10 mM : N, N-Dimetilformamida proporción 70:30)

Se pesaron 1,70 g de fosfato di-básico de potasio y se disolvió con 500 mL de agua desmineralizada, se aforó a un volumen final de 1 L con agua desmineralizada y se ajustó el pH a 7,2 con HCl 1 N. La fase móvil se preparó tomando 700 mL de K₂HPO₄ 10 mM junto con 300 mL del reactivo N, N-Dimetilformamida.

2.2.2 Preparación de la curva de calibración

En una balanza analítica se pesaron 25,2 mg de estándar de riboflavina en un vaso de precipitados. Se trasvasaron cuantitativamente a un balón volumétrico de 500 mL. Para la preparación de los estándares se tomaron 5 mL de la solución estándar de riboflavina y se transfirieron a un balón de 50 mL para ser aforado con agua desmineraliza. A partir de esta dilución, se tomaron alícuotas de 1,00, 2,50, 5,00, 7,50 y 10,00 mL y se aforó cada una de ellas a 50 mL con agua desmineralizada.

2.2.3 Preparación de la muestra

2.2.3.1 Hidrólisis enzimática

Se pesó 1,00 g de todos los materiales de referencia a excepción del MR-64 para el cual se pesaron 0,50 g de muestra en un Erlenmeyer. Sseguido, se adicionaron 0,20 g de alfa-amilasa junto con 0,25 g de papaína. A esto se añadieron 20 mL de agua destilada a temperatura entre 45-50 °C.



Finalmente se cubrieron los Erlenmeyer con papel aluminio y se llevaron a un baño termorregulador a 50 °C por 30 minutos.

2.2.3.2 Hidrólisis ácida

Se retiraron las muestras del baño termorregulador y se añadió a cada 15,00 mL de agua desmineralizada junto con 2,50 mL de HCl 1 N. Se colocaron en un baño maría hirviente por 30 minutos, posterior a su enfriamiento a temperatura ambiente se agregaron 2,50 mL de acetato de sodio anhidro 2,5 M. Se transfirió cuantitativamente a un balón de 50,00 mL (volumen final) y se aforó con agua desmineralizada. Finalmente se realizó un filtrado de las diferentes muestras para luego microfiltrar aproximadamente 1,00 mL en los viales.

2.2.4 Condiciones cromatográficas

Se colocó la columna dentro del termostato del HPLC estableciendo las siguientes condiciones: temperatura de 40 °C, flujo de 0,70 mL/min. Cada muestra fue detectada por el espectrofluorímetro a longitudes de onda de excitación de 450 nm y 528 nm de emisión. Finalmente se colocaron los viales en el automuestreador y se programó el volumen de inyección de 10 µL para todas muestras.

2.2.5 Validación del método

Para el desarrollo del proceso se estableció un diseño de un solo factor completamente aleatorizado (DCA) con cuatro niveles de concentración (MR) y el blanco. La respuesta experimental es la concentración de vitamina B₂ expresada en mg de riboflavina/100 g muestra.

2.2.6 Linealidad

Se realizaron cinco curvas de calibración y se realizó la estimación de la ecuación de la recta, bajo condiciones de reproducibilidad y se determinó el valor del coeficiente de correlación lineal que considera un criterio de aceptabilidad igual o superior a $r \geq 0,999$. La ecuación que se utilizó para determinar la linealidad del método fue la siguiente:

$$y = mx + b \quad (\text{Ec.1})$$

Donde:

y = Área que representa cada estándar (u^2)

x= Concentración del estándar de riboflavina (µg/mL)

m= Pendiente de la recta

b= Ordenada al origen

Se prepararon cinco estándares de vitamina B₂ y se leyeron por HPLC, como función respuesta se obtuvieron las áreas de cada curva estándar. Además se aplicó el método de mínimos cuadrados que aseguró estadísticamente la confiabilidad y exactitud de las curvas realizadas (Miller, 2008).

2.2.7 Límite de detección (LD)

Según la Guía de Validación EURACHEM (Eurolab España 2012) el LD es igual a 3 veces la desviación estándar:

$$LD = 3 * (s) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

LD = Límite de detección

s= desviación estándar (promedio del ruido generado)

Cálculo del LD:

$$LD = \frac{\mu\text{g de Riboflavina}}{\text{mL de solución}} \quad (\text{Ec. 3})$$

2.2.8 Límite de cuantificación (LC)

Según la Guía de Validación (Eurolab España 2012) el LC es igual a 10 veces la desviación estándar:

$$LC = 10 * (s) \quad (\text{Ec.4})$$

Donde:

LC = Límite de cuantificación

s = desviación estándar (promedio del ruido generado)

Cálculo del LC:

$$LC = \frac{\mu\text{g de Riboflavina}}{\text{mL de solución}} \quad (\text{Ec. 5})$$

2.2.9 Rango de trabajo

Se estableció el rango de trabajo tomando el valor del LC como límite inferior y el valor de la última concentración del estándar en la curva de calibración como límite superior.

2.2.10 Precisión

La precisión del método bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó con un análisis de varianza (ANOVA) en los cuatro niveles de concentración establecidos, para este análisis se utilizaron los resultados obtenidos

2.2.11 Repetibilidad



Se realizaron 6 repeticiones por técnico de cada material de referencia. Para asegurar la validez de los datos se calculó el límite de repetibilidad (Lr) (Ec.8), la desviación estándar por repetibilidad (Rao, 2006) (Ec.6) y el coeficiente de variación (% CVr) (Ec.7) menor o igual al 3 %.

$$S_r = \sqrt{CME} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\%CVr = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

CME= Cuadrados medios dentro de los grupos

$\bar{X}$ = Promedio de los datos

En base a la Guía EURACHEM (Eurolab España 2012) Lr se da por la Ec.8.

$$Lr = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times S_r \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

t_{∞} = t-Student (el valor de t en dos sentidos a un nivel de confianza del 95 % es 1,96)

S_r = Desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad.

2.2.12 Reproducibilidad

Se obtuvieron 5 datos de cada técnico por nivel y se determinó el límite de reproducibilidad (LR) [Ec.11], la desviación estándar por reproducibilidad (Rao, 2006) (Ec.9) y el coeficiente de variación (%CVR) (Ec.10) menor o igual al 5 %.

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + \frac{CMT_r - CME}{n}} \quad (\text{Ec. 9})$$

$$\%CVR = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde:

CME= cuadrados medios dentro de los grupos (error)

CMT_r= cuadrados medios entre grupos (tratamientos)

n = número de repeticiones

$\bar{X}$ = Promedio

En base a la Guía Eurachem (Eurolab España 2012), LR se da por la Ec. 11:

$$R = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times S_R \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

t_{∞} = t-Student (el valor de t en dos sentidos a un nivel de confianza del 95 % es 1,96)

S_R = Desviación estándar medida bajo condiciones de reproducibilidad

2.2.13 Tratamiento estadístico

Se utilizó la hoja de cálculo Excel, el paquete estadístico Infostat y se aplicó la Prueba F-Fisher. Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico conocido como análisis de varianza (ANOVA).

2.2.14 Exactitud

Se determinaron tres concentraciones por MRC en tres días consecutivos en unidades de mg de riboflavina/Kg de muestra. La media se comparó con los resultados reportados en el certificado otorgado por el National Institute of Standards and Technology (NIST). Adicionalmente se calculó el Z_{score} [Ec.12].

$$Z_{score} = \frac{\bar{X} - X_i}{U} \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde:

X_i = Valor reportado en el certificado

$\bar{X}$ = Media de los valores obtenidos

U = Incertidumbre del MRC

2.2.15 Incertidumbre

Para el cálculo de la Incertidumbre, se tomó como referencia la Guía para la Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas (Eurolab España 2012).

Incertidumbre estándar por repetibilidad:

$$\mu_r = \frac{S_r}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 13})$$

Incertidumbre estándar por reproducibilidad:

$$\mu_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde:

S_r = desviación estándar de repetibilidad

S_R = desviación estándar de reproducibilidad

n = número de datos

Incertidumbre estándar a partir de certificados de calibración:

$$\mu = \frac{U}{k} \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde:

U = incertidumbre expandida

k =factor de cobertura

Incertidumbre estándar a partir de tolerancia del material volumétrico (considerando una distribución triangular)

$$\mu_{MV} = \frac{U_{\max}}{\sqrt{6}} \quad (\text{Ec.16})$$

Donde:

$U_{m\acute{a}x}$ = incertidumbre máxima del material

Para estimar la Incertidumbre Estándar Combinada (u) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\mu_c(y) = \sqrt{\sum \mu_y^2} \quad (\text{Ec.17})$$

Donde:

$\mu_c(y)$ = Incertidumbre Estándar Combinada

μ_y = Incertidumbre estándar de cada variable involucrada

Incertidumbre combinada de concentración

$$\mu_{conc}(y) = y \sqrt{\sum \left(\frac{\mu_p}{p}\right)^2} \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde:

$\mu_c(y)$ = Incertidumbre Estándar Combinada

μ_p/p = Incertidumbres de cada variable, expresadas como desviaciones estándar relativa de cada variable involucrada

y = Concentración de la variable

Además, se estimó la incertidumbre expandida (U) que es igual a la incertidumbre estándar combinada multiplicada por el factor de cobertura (k) (Ec.19).

$$U = \mu_c(y) \times k \quad (\text{Ec.19})$$

Donde:

$\mu_c(y)$ = incertidumbre combinada

k = factor de cobertura

Calcular el factor de cobertura (k)

$$v_{eff} = \frac{\mu_y^4}{\sum_{i=0}^n \frac{\mu_i(y)^4}{v_i}} \quad (\text{Ec. 20})$$

Donde:

μ_y = incertidumbre combinada del método

(y) = incertidumbre estándar de cada componente

v_i = grados de libertad de cada componente

Para obtener el valor de los grados de libertad para cada componente (v_i) se debe tomar en cuenta lo siguiente:

Para incertidumbre tipo B $v \rightarrow \infty$

Para incertidumbre tipo A $\approx n-1$, $n-2$ o $n-3$ (de acuerdo al número de variables involucradas y n corresponde al número de datos).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación y el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio se realizaron mediante la tabulación e interpretación de los mismos, para su posterior análisis estadístico.

3.1 Obtención de los Datos Primarios

La concentración de vitamina B₂ se determinó mediante el análisis previo de los cromatogramas obtenidos en el software N2000 (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las concentraciones de riboflavina presente en productos comerciales.

Réplica	CONCENTRACIÓN (mg/100 g)							
	NIVEL 1		NIVEL 2		NIVEL 3		NIVEL 4	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	0,24	0,23	0,76	0,77	1,45	1,46	6,95	6,97
2	0,24	0,24	0,75	0,76	1,49	1,46	6,99	6,97
3	0,23	0,24	0,76	0,77	1,48	1,52	6,97	6,95
4	0,23	0,23	0,77	0,76	1,50	1,50	6,96	6,96
5	0,23	0,24	0,77	0,75	1,49	1,47	7,00	6,98
6	0,24	0,24	0,75	0,76	1,49	1,48	6,99	7,01
$\bar{X}$	0,24	0,24	0,76	0,76	1,48	1,48	6,98	6,97

Nota: los productos analizados fueron: Harina Ya (nivel 1), Cerelac (nivel 2), Pediasure (nivel 3) y Nitricalcin (nivel 4). Los análisis se realizaron por duplicado con 6 réplicas, cada análisis fue realizado por dos técnicos, cada técnico identificado como T1 y T2.



3.3 Linealidad

Se obtuvieron coeficientes de correlación lineal que consideró un criterio de aceptabilidad superior a $r=0,999$. Las curvas obtenidas se ajustaron al modelo lineal y al evaluar las rectas de calibración obtenidas no existieron diferencia. Adicionalmente, se determinó por el método de mínimos cuadrados los valores globales de la ecuación de la recta, integrando todas las curvas de calibración y se estableció que no existió variabilidad en la función respuesta (área de cada estándar). Además, se realizó un análisis global de las curvas obtenidas y se determinó que se puede utilizar cualquier curva para el análisis de las muestras en la determinación de vitamina B₂.

3.4 Límite de detección (LD)

El valor del LD fue igual a 0,002 µg de riboflavina por mL de solución, que determinó la concentración mínima de vitamina B₂ que pudo ser detectada con una certeza razonable por HPLC bajo las condiciones de trabajo del equipo.

3.5 Límite de cuantificación (LC)

El LC es de 0,08 µg de riboflavina por mL de solución, este valor determina la menor

3.6 Rango de trabajo

El rango de trabajo para la validación de vitamina B₂ estableció como límite inferior al límite de cuantificación igual a 0,008 y como límite superior a la concentración del último estándar de la curva de calibración de 1,003 (expresados en unidades de µg de riboflavina/mL de solución).

3.7 Precisión

Los coeficientes de variación de repetibilidad (% CV_r) y reproducibilidad (% CV_R), se obtuvieron utilizando los resultados del análisis de varianza ANOVA, estos fueron aceptados de acuerdo a la

Guía de Validación. Adicionalmente, se calculó el Lr y LR que es igual a 0,05 mg de riboflavina/100 g de muestra para cada límite.

Los límites fueron definidos según términos de repetibilidad (6 réplicas), reproducibilidad (2 técnicos) y se establecieron 4 niveles de concentración.

3.8 Tratamiento estadístico

Se determinó que no existieron diferencias significativas en las varianzas de los grupos muestrales (tratamientos) a un nivel confianza del 95 % al comparar los valores obtenidos de la prueba de Fisher. El P calculado fue menor que el valor crítico en todos los niveles.

3.9 Análisis de exactitud

Se determinó la concentración media de vitamina B₂ por MRC, para el MRC-77 de 76,53 y el reportado en el certificado es de 76±2 (mg de riboflavina/kg de muestra). Para el MRC-78 la media es igual a 20,40 y el establecido en el certificado es de 20,37±0,52 (mg de riboflavina/kg de muestra).

El método empleado para la determinación de la concentración de Vitamina B₂ en las muestras fue exacto y demostró un gran desempeño en las condiciones de trabajo del laboratorio.

3.10 Análisis de incertidumbre

Para los tres primeros niveles la Incertidumbre Expandida (*U*) fue igual a ±0,08 mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra y la Incertidumbre Estándar Combinada (*u*) correspondió a ±0,04 mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra. El último nivel representa un rango más amplio de trabajo que comprende un valor de Incertidumbre Expandida (*U*) de ±0,09 y la Incertidumbre Estándar Combinada (*u*) es igual a ±0,05 mg de vitamina B₂ por cada 100 g de muestra (Tabla 2).

Tabla 2. Incertidumbre combinada del método y expandida del método

NIVEL	Concentración (mg/100 g)	µ _{MET} (mg/100 g)	Factor de cobertura (k)	U _{MET}
Nivel 1	0,23	0,04	2,0	0,08
Nivel 2	0,76	0,04	2,0	0,08
Nivel 3	1,48	0,04	2,0	0,08
Nivel 4	6,97	0,045	2,0	0,09



4. CONCLUSIONES

Se elaboró un procedimiento para la determinación de Vitamina B₂ por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia empleando la metodología descrita en el Método AOAC 970.65 modificado. Este documento describe las directrices y parámetros establecidos en el trabajo de validación.

Se estableció la aplicabilidad del método para la determinación de Vitamina B₂, por el método HPLC, cumpliendo con las directrices descritas en la ISO 17025 y el método validado, asegurando la confiabilidad de los resultados utilizando un análisis estadístico para demostrar que no existió diferencia significativa.

REFERENCIAS

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the AOAC (Vol. 1): AOAC.
- Bueno-Solano, C., Campas-Baypoli, O. N., Díaz-García, A. S., Izaguirre-Flores, E. I., Verdugo-Zamorano, W., Estrada-Alvarado, M. I., Sánchez-Machado, D. I. y López-Cervantes, J. (2009). Cuantificación de riboflavina (vitamina B₂) en productos lácteos por HPLC. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(2), 136-142. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182009000200005>
- Eurolab España (2012). *Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas. Guía*
- CG 4 EURACHEM /CITAC (1 ed.). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_ES.pdf.
- Eurolab España (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (1 ed.). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf.
- Miller, J. (2008) *Estadística para Química Analítica*. Inglaterra: Addison-Wesley Iberoamérica.
- Pappa, H. (2013). Validación y Verificación de Procedimientos analíticos: Nuevos enfoques: Global Expertise.
- Rao, S. (2006). IMViC Reactions. *Microrao. Ready Notes*. from <https://www.microrao.com/>
- Sierra, N., Rojas, J., Cuadra, Y., Sisa, A. y Castro, G. (2007). Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y E en inyectables de uso veterinario. *Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(4), 623-630. doi: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322007000400016&script=sci_arttext
- Swadesh, J. (2000). *HPLC: Practical and Industrial Applications*. New York: CRC Press.



Determinación de grasa de cereales, lácteos, cárnicos y derivados con el método gravimétrico

Determination of grease of cereals, dairy products, meat and derivatives with the gravimetric method

M. Córdova-Suárez¹, J. Jácome

Universidad Técnica de Ambato (UTA), Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
Av. Los Chasquis y Río Payamino, Ambato (Ecuador)

Artículo recibido: 30/11/2016

Artículo aceptado: 21/12/2016

RESUMEN

La validación de métodos analíticos para un laboratorio es un proceso indispensable para garantizar que los resultados obtenidos sean fiables, reproducibles e incrementar la lista de análisis que puede ofrecer el laboratorio lo cual mejoraría la competitividad del mismo. Se utilizó el Método Oficial de la AOAC 2003.06 para la determinación de grasa cruda a partir de muestras alimenticias (cereales, lácteos y cárnicos), el cual arrojó variaciones tanto en repetitividad como reproducibilidad. Los valores críticos de repetitividad (L_r) y reproducibilidad (L_R) se realizaron para los dos analistas de estudio y sus resultados fueron para cereales y derivados $L_r = 0,18$; $0,31$ $L_R = 0,22$; lácteos y derivados $L_r = 0,18$; $0,82$ $L_R = 0,68$; cárnicos y derivados $L_r = 0,35$; $0,54$ $L_R = 0,38$. Los valores de incertidumbre para los productos analizados fueron para cereales y derivados $\pm 0,16$ g/100g, lácteos y derivados $\pm 0,50$ g/100g; cárnicos y derivados $\pm 0,27$ g/100g. Estos valores indican una alta fidelidad en los valores que arroje el método de análisis. Los valores de exactitud de las tres matrices utilizadas (cereales, lácteos y cárnicos con sus derivados) se encontraron dentro del rango de desviación estándar de la muestra de referencia previamente validada.

Palabras Clave: repetitividad, reproducibilidad, exactitud e incertidumbre, validación de método.

ABSTRACT

The validation of analytical methods for a laboratory is an indispensable process to guarantee that the obtained results are reliable, reproducible and increase the list of analyzes that can offer the laboratory which would improve the competitiveness of the same one. The AOAC 2003.06 Official Method was used for the determination of crude fat from food samples (cereals, dairy and meat), which showed variations in both repeatability and reproducibility. The critical values of repeatability (L_r) and reproducibility (L_R) were performed for the two study analysts and their results were for cereals and derivatives $L_r = 0.18$; 0.31 $L_R = 0.22$; Dairy products and derivatives $L_r = 0.18$; 0.82 $L_R = 0.68$; Meat and Derivatives $L_r = 0.35$; 0.54 $L_R = 0.38$. The uncertainty values for the analyzed products were for cereals and derivatives ± 0.16 g / 100 g, dairy products and derivatives ± 0.50 g / 100 g; Meat and derivatives ± 0.27 g / 100g. These values indicate a high fidelity in the values that the analytical method throws. The accuracy values of the three matrices used (cereals, dairy and meat products with their derivatives) were within the standard deviation range of the previously validated reference sample.

Keywords: Repeatability, reproducibility, accuracy and uncertainty, method validation.

¹ Autor de correspondencia: Manolo Córdova Suárez. E-mail: ma.cordova@uta.edu.ec

1. INTRODUCCIÓN

La determinación de grasa de cereales, lácteos, cárnicos y derivados se consolidan con la validación y la confirmación mediante examen y aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto (ENAC 2014). Las características típicas que se deberían considerar en la validación son exactitud, precisión, incertidumbre, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, robustez.

La incertidumbre del resultado de una medida refleja la falta de conocimiento exacto del valor del mensurando. Esa incertidumbre proviene de los efectos aleatorios y de la corrección imperfecta del resultado de la medida debida a efectos sistemáticos. El objetivo de un sistema de gestión de las mediciones es gestionar el riesgo de que los equipos y procesos de medición pudieran producir resultados incorrectos que afecten a la calidad del producto de una prueba de ensayo (Saavedra et al., 2010).

Los alimentos están constituidos por diversas sustancias que pueden agruparse como: compuestos nutritivos (proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas), sin carácter nutricional (presentes de forma natural que pueden ser beneficiosos o no), presentes de forma accidental (contaminantes procedentes del medio) y compuestos exógenos (adicionados con un fin determinado) (Gil y Ruiz, 2010). Para tener una idea general de la calidad de un alimento y su composición se hacen usualmente análisis de contenido inmediato o proximal, que comprende una evaluación de los componentes globales de los alimentos: grasa, proteínas, carbohidratos, humedad, y ceniza (Castañeda, 2011).

El objetivo de este trabajo de investigación es la validación del método gravimétrico para la determinación de grasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de la muestra

2.1.1 Cereales y derivados

Se realizó una homogenización previa, mezclando (en el recipiente original de preferencia) mediante agitación por lo menos tres veces. En caso de granos y muestras heterogéneas, se trituró las muestras hasta lograr partículas finas, se trasvasó al recipiente de muestra correspondiente homogenizando la muestra mediante agitación antes de proceder a pesar.

2.1.2 Lácteos y derivados

Para muestras de leche fluida o semejantes se homogenizó bien la muestra agitando el envase por lo menos tres veces antes de pesar, los derivados sólidos se trituraron lo más finamente posible.

2.1.3 Cárnicos y derivados

En el caso de cárnicos que se hallaban en refrigeración, se esperó que la muestra adquiriera temperatura ambiente (20 °C), si la muestra ya se encontraba a temperatura ambiente se trituró en pedazos pequeños, se homogenizó por lo menos tres veces y se pesó.

2.2 Hidrólisis

2.2.1 Cereales y derivados

Se pesaron 1-5 g de muestra en un matraz Erlenmeyer, se añadió 70 ml de agua desmineralizada y 60 ml de ácido clorhídrico concentrado grado técnico. Se sometió a hidrólisis mediante calentamiento; a partir de que comenzó a hervir se tomó 30 minutos, todo el tratamiento se realizó dentro de la sorbona.

2.2.2 Lácteos líquidos y derivados líquidos

Se pesó 25 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se añadió 70 ml de agua desmineralizada y 60 ml de ácido clorhídrico concentrado grado técnico. Se sometió a hidrólisis mediante calentamiento a partir de que comenzó a hervir se tomó 30 minutos, todo el tratamiento se realizó dentro de la sorbona.

2.2.3 Leche en polvo o quesos.

Se pesaron 3 g de muestra en un matraz Erlenmeyer, se añadieron 70 ml de agua desmineralizada y 60 ml de ácido clorhídrico concentrado grado técnico. Se sometió a hidrólisis mediante calentamiento, a partir de que comenzó a hervir se tomó 30 minutos, todo el tratamiento se realizó dentro de la sorbona.

2.2.4 Cárnicos y derivados

Se pesaron 3 g de muestra en un matraz Erlenmeyer, se añadieron 70 ml de agua desmineralizada y 60 ml de ácido clorhídrico concentrado grado técnico. Se sometió a hidrólisis mediante calentamiento a partir de que comenzó a hervir se tomó 30 minutos, todo el tratamiento se realizó dentro de la sorbona.



2.3. Filtración

Después del hidrólisis se retiró de la cocineta y se esperó a que no emita vapores, se filtró la muestra, sobre papel filtro debidamente doblado y previamente humedecido para evitar pérdida de muestra, Se lavó el matraz Erlenmeyer con agua caliente, evitando pérdidas de muestra. Se lavó la muestra retenida en el papel filtro hasta ausencia total de ácido clorhídrico técnico (aproximadamente con 400 ml de agua caliente), se retiró con cuidado el papel filtro y se colocó en una cápsula, identificando cada una de ellas con el número correspondiente a la muestra, se colocó en la estufa por 20 minutos a 130 °C. Cuando el papel se estuvo seco y frío se introdujo cuidadosamente en los capuchones de celulosa, se limpió la cápsula contenedora cuidadosamente con algodón empapado en hexano para evitar pérdida de grasa adherida a la cápsula.

2.4. Extracción

Se tomó el peso de un vaso de extracción de grasa, previamente lavado, secado a 130 °C por al menos una hora. Se encendió el extractor de grasa y se abrió el flujo de agua del condensador. Se adhirió a las columnas de extracción los capuchones que contienen las muestras, se añadió suficiente hexano (alrededor de 40 ml) dentro de cada vaso para cubrir las porciones de prueba cuando los capuchones están en la posición de inmersión. Se colocó los vasos

debajo de las columnas de extracción y se fijó en el lugar correspondiente, se colocó las columnas de extracción en la posición de inmersión, asegurándose que los dedales se encuentren sumergidos en el solvente y se hirvió por 20 min. Se verificó el rango de reflujo apropiado, después de los 20 min se levantó los capuchones y se colocó en la posición de lavado por 40 min. Después de corridos los 40 minutos se cerró las llaves de las columnas de extracción y se destiló la mayor cantidad de solvente posible de los vasos para recuperar el hexano y alcanzar sequedad aparente, alrededor de 20 min. Se removió los vasos de extracción del extractor de grasa y se colocó en la sorbona para finalizar la evaporación del solvente a baja temperatura cuando fue necesario, si no lo requiere se llevó los vasos a la estufa directamente a 130 °C por 30 min para eliminar los restos del solvente y la humedad residual existente. Se pusieron los vasos con la grasa en el desecador, se enfriaron hasta temperatura ambiente y se tomó el peso de los vasos más la grasa.

2.5. Validación del método

La validación del método se realizó en 3 matrices (cárnicos, lácteos y cereales) cada uno con 4 puntos (Tabla 1) con 20 repeticiones, los 10 primeros datos los tomó el analista 1 y los 10 restantes el analista 2.

Tabla 1. Matrices y puntos utilizados

MATRIZ		PUNTOS		
Cárnicos	Lomo de cerdo	Mortadela	Salchicha	Tocino
Lácteos	Leche descremada	Manjar de leche	Queso fresco	Crema de leche
Cereales	Arroz	Avena	Galleta	Soya

Los puntos propuestos han sido tomados mediante revisión bibliográfica en Food Composition and Nutrition Tables (Souci et al.,

2000) de tal forma que se pueda trabajar con un rango adecuado y se detallan en la Tabla 2.



Tabla 2. Puntos de medición

Matriz	Puntos	% grasa
Cárnicos y derivados	Lomo de cerdo	7,50
	Mortadela	12,4
	Salchicha	16,5
	Tocino	21,1
Lácteos y derivados	Leche descremada	0,07
	Manjar de leche	8,80
	Queso fresco	18,1
	Crema de leche	31,7
Cereales y derivados	Arroz	0,98
	Avena	7,9
	Galleta	-----
	Soya	20,6

Fuente: FCNT *et al.*, 2000.

En el desarrollo del trabajo propuesto, la validación del método se basó en la obtención de Exactitud, Precisión e Incertidumbre. Para la determinación de valor de incertidumbre de medida implícita en el método se empleó Tablas de Análisis de Varianza (ANOVA). Para realizar los cálculos de la estimación de la incertidumbre las contribuciones se clasifican en:

TIPO A: Es la contribución mediante el estudio estadístico de una serie de observaciones, es decir, la desviación estándar máxima de la repetitividad y reproducibilidad.

TIPO B: Contribución de la incertidumbre y resolución de equipos calibrados (Certificado de calibración de la balanza analítica).

2.5.1 Incertidumbre Combinada

La incertidumbre de una medición cuando el resultado se obtiene a partir de la raíz cuadrada positiva de las contribuciones de tipo A y de tipo B.

$$U_{combinada} = \sqrt{\text{Contribuciones de Tipo A} - \text{Contribuciones del Tipo B}}$$

Ec. 1

2.5.2 Incertidumbre Expandida

Magnitud que define un intervalo alrededor del resultado de una medición el que se espera cubra una fracción grande de la distribución de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mesurando.

$$U_{expandida} = U_{combinada} \times k$$

Ec. 2

k= factor de cobertura= 2 (95 %)

2.5.3 Factor de cobertura (k)

Factor que puede considerarse como la probabilidad de cobertura o nivel de confianza del intervalo, factor numérico usado como multiplicador de la incertidumbre combinada para obtener una incertidumbre expandida. El factor de cobertura se encuentra típicamente en el intervalo de 2 a 3. De acuerdo al tipo de método de validación se evaluó precisión

(repetitividad y reproducibilidad) y exactitud. Precisión: Se determinó la precisión en términos de repetitividad y reproducibilidad: Repetitividad: Se realizó 10 repeticiones (por cada analista) de cada punto para cada una de las matrices. Adicionalmente se calculó la desviación estándar (Rao, 2006) y el coeficiente de variación (CVr %). Reproducibilidad: Se tomaron 5 datos del primer analista y 5 datos del segundo analista para cada punto de cada una de las matrices. Así mismo, se calculó la desviación estándar (Sridhar) y el coeficiente de variación (CVri %). Exactitud: Se demostró la capacidad del método para dar resultados lo más próximo posible a un valor verdadero utilizando material de referencia certificado.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para medir las fuentes de variación entre los datos obtenidos de los ensayos realizados a cereales, lácticos y cárnicos en condiciones de repetitividad y reproducibilidad, se realizó un análisis de varianza observando que todos los valores críticos para F son mayores para el F calculado aceptando y comprobando que no existe diferencia significativa en los diferentes porcentajes de determinación de grasa.

El comportamiento al aplicar el Método Oficial de la AOAC (2003) para determinación de porcentaje de grasa en cereales, lácticos, cárnicos y sus derivados respectivamente, en condiciones de repetitividad y de reproducibilidad no generó variación significativa en ningún punto; se puede utilizar el método el número de veces que sea necesario en diferentes condiciones como equipo, tiempo y reactivo, así como también se demuestra que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado. Lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta. Los criterios de aceptación de la exactitud deben ser similares a los utilizados para medir la precisión (UNODC 2010).

Se obtuvieron 3 muestras una para cada matriz: una con porcentaje de grasa baja (cereales) el valor de referencia del NIST se encuentra en un intervalo de $2,02 \pm 0,40$; porcentaje de grasa media (cárnicos) se encuentra en un intervalo de $18,96 \pm 0,40$ y para el porcentaje de grasa alto (lácteos) se encuentra en un intervalo de $30,43 \pm 0,95$ abarcando así la totalidad del rango del trabajo. Encontrándose así que el porcentaje de grasa de cada una de las muestras de referencia permitió comprobar la exactitud del método comparando las muestras de referencia y los datos obtenidos en el análisis de cada una de las muestras en el laboratorio ECUACHEMLAB Cía. Ltda.

La concordancia y cercanía de los valores obtenidos al aplicar el método Oficial de la AOAC para la determinación de porcentaje de grasa en cereales, lácteos, cárnicos y sus derivados respectivamente, en comparación con valores tomados como verdaderos debidamente certificados estuvieron dentro del intervalo de aceptación. Por lo mismo todo resultado que se obtenga al aplicar el método deberá ser tomado como verdadero.

Se calculó la incertidumbre combinada y expandida ya que cuando se trata de modelos no lineales se puede realizar la aproximación de segundo orden de la serie de Taylor, o incluso obtener los valores de esperanza matemática y varianza sin aproximaciones, directamente, soluciones mucho más complejas matemáticamente que la ley de propagación de incertidumbres (Pérez, 2012).

4. CONCLUSIONES

Se validó el método gravimétrico para la determinación de grasa en el laboratorio ECUACHEMLAB Cía. Ltda. al cumplir con los criterios de aceptación de precisión, exactitud en las matrices de lácteos, cereales, cárnicos y sus derivados con sus respectivas incertidumbres.

Se verificó la validez del método a través de pruebas con muestras de referencia certificadas obtenidas del NIST (National Institute of Standards and Technology) para productos de cereales, lácteos y cárnicos.

REFERENCIAS

- AOAC (2003). Official Method 2003.06. Crude Fat, Hexanes Extraction, in Feed, Cereal Grain, and Forage: AOAC.
- Castañeda, A. (2011). Importancia del análisis de los alimentos.
- ENAC (2014). Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 (pp. 8). España: Entidad Nacional de Acreditación.
- Gil, A. y Ruiz, M. (2010). *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. España: Editorial Medica Panamericana.
- Pérez, M. (2012). Estimación de incertidumbres. Guía GUM. *Revista Española de Metrología*, 3(Diciembre), 113-130.
- Rao, S. (2006). IMViC Reactions. *Microrao*. Ready Notes. from <https://www.microrao.com/>
- Saavedra, N., Guzmán, J., Molina, N. y Martínez, V. (2010). Evaluación de la incertidumbre en los resultados de la prueba de ensayo para determinar el contenido de grasas por el



Córdova-Suárez y Jácome / *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 2016: 24(2) 48-53

método Soxhlet. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 1, 11. doi:
http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-01-2010/documentos/trabajos_libres/TL29.pdf

Souci, W., Fachmann, W. y Kraut, H. (2000). *Food Composition and Nutrition Tables*. Germany: Medpharm GmbH Scientific Publishers.

Sridhar, R. (2006). IMViC REACTIONS. Davangere: Dept. Microbiology.

UNODC (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos (pp. 76). Viena (Austria): Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito



ALIMENTOS, CIENCIA E INGENIERÍA

Revista de la **Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos** de la **Universidad Técnica de Ambato. Ambato (Ecuador).**

GUÍA PARA AUTORES (v.10)

Tipos de publicaciones

Los trabajos considerados para publicación en la revista podrán pertenecer a las siguientes categorías:

Artículos de investigación, que presenten resultados de trabajos originales de investigación científica o técnica, de **5000 palabras** de extensión máxima (aproximadamente 14 hojas escritas a doble espacio, Times New Roman 12 puntos).

Artículos de revisión, enfocados a la actualización del estado de la técnica o el conocimiento en un campo científico particular, en base la revisión de trabajos publicados o no, **10000 palabras** de extensión máxima (aproximadamente 28 hojas).

Notas de investigación, que presenten resultados preliminares provenientes de investigaciones originales que, por su carácter y alcance, requieren de una rápida difusión, no teniendo una extensión mayor a **2500 palabras** de extensión máxima (aproximadamente 7 hojas).

Cartas al Director, en las que se manifiesten críticas, análisis y/o interpretaciones sobre trabajos publicados en la revista que, a juicio del Comité Editorial, complementen y enriquezcan la discusión sobre las temáticas abordadas, de **750 palabras** de extensión máxima (aproximadamente 2 hojas).

Principios generales

Las contribuciones a la presente publicación son responsabilidad exclusiva de los autores, no comprometiéndolo a la Universidad Técnica de Ambato en general ni a la Facultad de Ciencia y Tecnología de Alimentos en particular.

Mediante el envío de sus trabajos originales a la revista, los autores asumen implícitamente una posición ética respecto a la autoría de los

trabajos por la cual cada uno de ellos acepta la publicación del trabajo, siendo incluido como autor por haber tenido una relación directa con la elaboración del trabajo, sea esta de planificación, diseño, ejecución, análisis de datos, redacción, revisión o edición del manuscrito. No se considera éticamente aceptable la inclusión de autores con vinculación indirecta, (p. ej.: haber financiado o auspiciado el trabajo de investigación) o vinculación nula (p. ej.: ser parte del mismo grupo de investigación, pero sin relación con el trabajo concernido).

Los trabajos deberán ser originales e inéditos, no haberse enviado previa o simultáneamente a otra publicación, sea en formato papel o electrónica, y cumplir con todas las especificaciones de estilo descritas en el documento *Guía para Autores* para que sean aceptados. Todas las referencias a trabajos ajenos, han de ser convenientemente expresadas de forma implícita o explícita, reduciendo al mínimo las citas textuales. Se considerará autoplagio la copia textual o duplicación de material de trabajos previos de los autores sin una indicación clara del origen del mismo.

El Comité Editorial se reserva el derecho de rechazar todo artículo que no esté conforme a las prescripciones mencionadas.

Proceso editorial

A la recepción de los trabajos originales, el Editor valorará la pertinencia de la temática, el interés del trabajo, su originalidad mediante examen con el software Urkund (<http://www.urkund.com/en>) y el cumplimiento de la adecuación del formato a la Guía para Autores vigente. Tras esta verificación previa, los trabajos se enviarán de forma anónima a dos revisores elegidos por el Editor.

En el plazo máximo de 30 días naturales, se determinará la aceptación o no de los trabajos remitidos para su ingreso en el proceso de revisión. En caso positivo, se remitirá a los autores las correcciones que los revisores hayan estimado conveniente llevar a cabo. Los autores dispondrán de un nuevo plazo de 30 días para llevar a cabo las correcciones y remitir de nuevo su trabajo a la revista, explicitando todas las modificaciones llevadas a cambio en relación al documento enviado en primera instancia a la revista.

Si el resultado de la corrección es a satisfacción del Editor, será aceptado para su inmediata publicación en la revista. En caso negativo, se



continuará el proceso de revisión, pudiendo los autores renunciar a él en cualquier momento. A este respecto, una solicitud de publicación decaerá si, tras la demanda de la revista de llevar a cabo correcciones en un artículo, no se recibe respuesta por parte de los autores en un periodo de tiempo de 6 meses, momento a partir del cual, se deberá iniciar un nuevo proceso editorial.

La revista garantiza la completa confidencialidad de cualquier documento recibido durante el proceso de edición de los trabajos y el reconocimiento de la propiedad intelectual de los autores sobre mismos.

Se permite la reproducción total o parcial de los artículos publicados en la revista, previa autorización por escrito del Editor de la misma así como de los Autores de los artículos.

Las citas o menciones en otras publicaciones se harán de acuerdo a los siguientes ejemplos:

Cita directa o explícita: (Llerena et al., 2014)

Cita indirecta o implícita: Llerena et al. (2014)

Referencia bibliográfica (estilo APA 6ª Ed.):

Llerena, W., Samaniego, I., Ramos, M., y Brito, B. (2014). Caracterización físico-química y funcional de seis frutas tropicales y andinas ecuatorianas. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 22(2), 13-22.

Formato

El artículo deberá ser remitido en formato electrónico, por correo electrónico o correo postal adjuntando CD-ROM o medio de almacenamiento digital análogo, editable mediante software de procesamiento de texto, preferentemente Microsoft Word o similar, con la siguiente configuración de página:

- Formato A4.
- Márgenes laterales de 3,0 cm y superior e inferior de 2,5 cm.
- Tipografía Times New Roman de 12 puntos en el cuerpo de texto principal.
- Una sola columna, escrita a doble espacio
- Líneas numeradas de forma continua.

En el correo electrónico o CD-ROM deberán entregarse las tablas y figuras incluidas en cada

artículo en sus formatos nativos originales (Excel, Powerpoint, etc.), de manera que puedan ser editadas durante el proceso de maquetación, debiendo estar numeradas de la misma forma en que aparecen en el artículo.

Contenido de los artículos de investigación

• Primera página

1. Título

Se escribirá en castellano, tamaño Times New Roman 14, centrado, en letras mayúsculas, tendrá **menos de 16 palabras**. Se proporcionará debajo, en el mismo formato, la traducción al idioma inglés.

2. Autores

Para cada autor se incluirá el primer y, en su caso, segundo nombre de pila, el primer apellido, la dirección institucional, mediante un superíndice en números arábigos, y el correo electrónico de contacto del autor de correspondencia, que se significará mediante un asterisco (*).

3. Resumen/Abstract

El resumen se hará en castellano, no excediendo de **300 palabras**. Se escribirá en un sólo párrafo a espacio simple, en el que se incluirá una breve introducción, el objetivo de la investigación, los métodos utilizados y los principales resultados y conclusiones. No se incluirán aquí subdivisiones ni citas bibliográficas. El resumen se traducirá al idioma inglés y se colocará en párrafo aparte del mismo teniendo la palabra *Abstract* como encabezado.

4. Palabras clave/Keywords

Se proporcionarán, a continuación del Resumen, **entre tres y cinco palabras clave** en castellano **no incluidas en el título**, lo más descriptivas posibles del trabajo efectuado, de forma que faciliten la búsqueda del artículo a través de los sistemas de indexación y búsqueda bibliográfica. De igual manera, tras el *Abstract*, se proporcionarán las mismas palabras clave (*Keywords*), escritas en idioma inglés.

• Estructura del trabajo

El trabajo se escribirá en texto a columna simple, tamaño Times New Roman 12, justificado. Las secciones se subdividirán, en caso necesario, mediante esquema numerado (1.1, 1.1.1, 1.1.1.1; 1.2, etc.), debiendo las siguientes **secciones**:

Resumen (ya descrito en la descripción de la **Primera página**)



1. Introducción, en la que se justificará la motivación que ha llevado a los autores a emprender la investigación y los objetivos perseguidos. Aportará una adecuada base de conocimiento sobre el tema estudiado, evitando extenderse en la descripción de las referencias y la discusión sobre las mismas.
2. Material y métodos utilizados en la investigación, describiendo todo de forma tal que el lector pueda ser capaz de entender completamente o replicar las condiciones experimentales bajo las cuales han trabajado los autores. A este respecto, es necesario mencionar marca y modelo de los principales equipos utilizados y referenciar de forma precisa las técnicas analíticas empleadas, de preferencia, optando por normas estandarizadas y reconocidas en el ámbito internacional, salvo cuando los métodos hayan sido publicados con anterioridad, en cuyo caso, se mencionarán como referencia, describiendo únicamente las modificaciones sustanciales.
Se pide a los autores describir adecuadamente el diseño experimental elegido, las herramientas matemáticas y estadísticas utilizadas y el empleo de unidades de medida y notación del Sistema Internacional, así como adherirse a las normas internacionales de nomenclatura binomial de plantas y animales y hacer uso de abreviaturas previamente explicadas en el texto.
3. Resultados y discusión de los mismos, aportando las tablas, figuras, gráficos y diagramas que sean necesarias. Los resultados serán claros y concisos. Todo aporte de información original por parte de los autores deberá ser contrastado, en la medida de lo posible, con referencias a otros autores, explicando el significado que la nueva información supone dentro del contexto científico-técnico en el que se sitúa el artículo. La mera descripción numérica o textual de los resultados, dejada a libre interpretación del lector, no será considerada aceptable por el Comité Editorial en ningún caso.
4. Conclusiones, en las que se resuman los principales resultados obtenidos en la investigación. Esta sección, podrá tener entidad propia o integrarse dentro de la sección precedente.

Agradecimientos, sección opcional de la que se servirán los autores para el reconocimiento a aquellas personas u organismos que proveyeron de ayuda durante la elaboración del trabajo, bien aportando fuentes de financiación, material experimental, corrigiendo el manuscrito o aportando su opinión crítica.

Referencias bibliográficas, en las que se incluirán las fuentes de información utilizadas por los autores en la introducción, material y métodos y discusión de los resultados. Todas las citas utilizadas en el texto han de estar presentes en las referencias y cada referencia, ha de estar citada en el texto. El formato utilizado para la inclusión de las citas y referencias bibliográficas será **APA 6ª edición** (<http://www.apastyle.org>). A este respecto, se recomienda a los autores la utilización de software de gestión bibliográfica (Endnote, Refworks, Mendeley, etc.) para evitar errores de formato y facilitar el flujo de trabajo al Comité Editorial. En cualquier caso, las referencias han de estar completas, de forma que el lector pueda localizar sin dificultad la fuente de información utilizada por los autores. Se recomienda la inclusión del identificador digital de objeto (DOI) de los artículos, cuando esté disponible (<http://www.doi.org/>).

• **Inserción de elementos no textuales en el trabajo**

1. Tablas: se proporcionarán aparte del texto principal y numerarán en Times New Roman 10, en la parte superior, de forma correlativa (Tabla 1, Tabla 2, etc.) según se vayan citando en el texto. Cada tabla deberá venir acompañada, a continuación de su numeración, de un título adecuadamente informativo, aportando las condiciones experimentales si es necesario, de forma que el lector no tenga la necesidad de referirse al texto para entender el contenido de la tabla (**autoexplicativa**). Los autores podrán utilizar notas al pie de las tablas para aclarar cualquier información o abreviatura utilizada, empleando para ello superíndices. Los autores deberán asegurarse de que la información ofrecida por las tablas no duplica la ofrecida por las figuras y viceversa. Al aportar información analítica, los autores deberán especificar los valores promedio y estadísticos de variabilidad de los datos (desviación típica, error estándar, coeficiente de variación, etc.), además del número de réplicas llevadas a cabo en cada determinación. Las probabilidades se indicarán mediante la



siguiente convención: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$. El texto dentro de las tablas será Times New Roman 10. Se recomienda emplear las herramientas de formato propias del procesador de textos Microsoft Word para crear las tablas. La inserción de tablas en formato gráfico (JPEG, TIFF etc.) está fuertemente desaconsejada, por no permitir la correcta edición de las mismas en la versión final de la revista.

2. Figuras: se proporcionarán aparte del texto principal y numerarán, en Times New Roman 10, en la parte inferior, fuera de la propia figura, de forma correlativa (Figura 1, Figura 2, etc.) según se vayan citando en el texto. Cada figura deberá venir acompañada, a continuación de su numeración, de un título adecuadamente informativo, de forma que el lector no tenga la necesidad de referirse al texto para entender el contenido de la figura (autoexplicativa). Las figuras han de ser presentadas en formatos gráficos de adecuada calidad, como JPEG (con compresión no superior al 80%) o TIFF. Los formatos optimizados para presentación en pantalla (GIF, BMP, PICT, etc.) no ofrecen suficiente calidad para la impresión en formato papel, por lo que ha de evitarse su uso. Se recomienda, para elementos a color, una resolución mínima de 300 ppp (píxeles por pulgada), para medios tonos o escala de grises, una resolución mínima de 500 ppp y para elementos bitmap (blanco/negro) una resolución mínima de 1000 ppp.

La revista se publica en formato digital a color pero, dado que la versión impresa de la revista se edita en blanco y negro, se recomienda a los autores elaborar las figuras de forma que sigan siendo comprensibles en la gama de tonalidades de escala de grises, maximizando el contraste de los elementos gráficos, empleando símbolos claramente diferenciados, etc.

3. Ecuaciones: se intercalarán en el texto principal a medida que sea necesario, numerándose de forma correlativa mediante la notación Ecuación 1, Ecuación 2, etc. Para su incorporación al texto, se aconseja el uso del editor de ecuaciones del procesador de textos Microsoft Word o análogo (MathType, LaTeX, etc.). Todos los términos de cada ecuación deberán ser explicados convenientemente, incluyendo las unidades de cada término.

Contenido de trabajos diferentes a los artículos de investigación

Para las revisiones, notas de investigación y cartas al Editor, el formato de estos trabajos será similar al de los artículos de investigación en cuanto al tipo y tamaño de letra en el cuerpo principal (Times New Roman 12) y las figuras y tablas (Times New Roman 10). La estructura de las notas de investigación será análoga a la de los artículos de investigación, salvo en su extensión. Las revisiones incluirán resumen y palabras clave, pero no material y métodos ni resultados y discusión, aunque sí pueden incluir una sección de conclusiones, además de las referencias bibliográficas. Las cartas al Editor, podrán tener estructura libre.





UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E
INGENIERÍA EN ALIMENTOS

LABORATORIOS DE
INVESTIGACIÓN Y
PLANTA PILOTO
FCIAL



