



ALIMENTOS

ciencia e ingeniería
Vol. 25 (2) • Diciembre 2017



ISSN 1390-2180

Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



ALIMENTOS

CIENCIA E INGENIERÍA

Revista de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Vol. 25 (2) - 2017





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-2017-25 (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

INDEXACIÓN

DIRECTORIO

COMITÉ EDITORIAL

ISSN

TIRAJE

CONVOCATORIA PRÓXIMO NÚMERO

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Pag. 06

GUÍA PARA AUTORES

Pag. 65

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, Consultora en Ingeniería de Alimentos (Ecuador)
Dr. Borja Velásquez, Universidad Politécnica de Valencia (España)
Dr. Juan Sebastián Ramírez, Universidad del Valle (Colombia)
Dr. Khalid Ziani, Consultor en Ingeniería de Alimentos (España)
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 (35 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 DICIEMBRE 2017: Recepción de manuscritos hasta: 15 SEPTIEMBRE 2017.
- Para publicación en JUNIO 2018 Recepción de manuscritos hasta: 15 ABRIL 2018

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

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

T. X. Camacho, O. D. López, D. Morales, W. Romero Fernández

Pag. 06-15

Métodos de extracción y purificación de β -glucanos en hongos y cereales

Extraction and purification methods of β -glucans in fungi and cereals

G. V. Hidalgo, O. D. López

Pag. 16-25

Validación del método para la determinación de vitamina C en alimentos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Validation of the method of determination of vitamin C in foods by high efficiency liquid chromatography (HPLC)

M. Córdova-Suárez, S. Aguirre-Arias, E. Garcés-Sánchez, P. Ramos-Córdova, D. Córdova-Suárez

Pag. 26-32

Sustitución de huevos por el mucilago de chía en la tecnología de pan de camote

Replacement of eggs by chia mucilage in sweet potato bread technology

M. Robayo, C. German

Pag. 33-39

Capacidad biocida de la aleación de aluminio 6063-T5 como material de construcción de asideros en autobuses en la Provincia de Tungurahua

Biocidal capacity of 6063-T5 aluminum alloy as construction material for railings in buses in the Province of Tungurahua

M. Córdova-Suárez, J. Martínez, E. Garcés-Sánchez

Pag. 40-44

Aplicación del proceso foto-Fenton solar para la recuperación del cloroformo residual obtenido luego de la realización del ensayo de cadmio (método HACH 8017)

Application of the solar photo-Fenton process for the recovery of residual chloroform obtained after the cadmium assay (HACH Method 8017)

M. Córdova-Suárez, A. Rivadeneira

Pag. 45-54

Obtención y caracterización de agua de coco (*Cocos nucifera*) en polvo mediante secado por aspersión

Obtaining and characterizing coconut water (*Cocos nucifera*) in powder by spray drying

Z. Riofrío, O. D. López, Y. Hernández

Pag. 55-64

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

T. X. Camacho^{1*}, O. D. López¹, D. Morales¹, W. Romero Fernández²

¹Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, Campus Académico Huachi, Av. Los Chasquis y Río Payamino, Ambato, Ecuador

²Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Campus Académico Ingahurco, Av. Colombia y Chile, Ambato, Ecuador

Artículo recibido: 21/04/2017

Artículo aceptado: 15/12/2017

RESUMEN

El proyecto de investigación se basó en un análisis a la microalga Spirulina (*Arthrospira platensis*), que fue estudiada mediante la aplicación de varios tratamientos con distintas condiciones específicas que permitan una mejor asimilación de la misma, en el caso de ser aplicada como ingrediente farmacéutico activo o suplemento proteico. El mejor tratamiento obtuvo las siguientes condiciones: pH 5, relación 1:20 de sustrato: agua y una temperatura de hidrólisis mantenida en un rango entre 65°C y 70°C. El hidrolizado fue pulverizado mediante secado por aspersión que dio un rendimiento óptimo de 73,89 % y una coloración distinta a la Spirulina en polvo concentrada, a causa de la modificación estructural de las ficobiliproteínas en el proceso hidrolítico. Además se analizó el grado de hidrólisis del polvo mediante una comparación del contenido de nitrógeno amínico del hidrolizado y la Spirulina en polvo concentrada, además se aplicó técnicas de electroforesis SDS – PAGE y cromatografía RP – HPLC, que permitieron determinar que el proceso de hidrólisis fue idóneo y se logró obtener una mezcla compleja de péptidos y aminoácidos libres con bajos pesos moleculares que cumplen con las características necesarias para la futura aplicación del hidrolizado de Spirulina como ingrediente funcional.

Palabras clave: Spirulina, *Arthrospira platensis*, hidrólisis, ficobiliproteínas, electroforesis, SDS – PAGE, cromatografía, RP – HPLC.

ABSTRACT

The research project was based on an analysis of the Spirulina microalgae (*Arthrospira platensis*), which was studied by the application of several treatments with different specific conditions that allow a better assimilation of the alga, in case of being applied as active pharmaceutical ingredient or protein supplement. The best treatment was attained at the conditions: pH 5, a concentration of 5% (in relation to 1:20 of substrate: water) and at a hydrolysis temperature maintained in a range of 65 °C to 70 °C. The hydrolyzate was sprayed by spray drying which gave an optimum yield of 73.89% and a different coloration to Spirulina powder concentrate because of the structural modification of the phycobiliproteins in the hydrolytic process. In addition, the degree of hydrolysis of the powder was analyzed by a comparison of the amine nitrogen content of the hydrolyzate and Spirulina powder concentrate, SDS - PAGE electrophoresis and RP - HPLC chromatography techniques were also applied, which allowed to determine that the hydrolysis process was adequate and produced a complex mixture of free amino acids and low molecular weights peptides with with the necessary characteristics for the future application of Spirulina hydrolyzate as functional ingredient.

Keywords: Spirulina, *Arthrospira platensis*, hydrolysis, phycobiliproteins, electrophoresis, SDS - PAGE, chromatography, RP - HPLC.

*Autor de correspondencia: Tarsis Xavier Camacho. E-mail: tarsis_92_93@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

La Spirulina es un alga unicelular que crece y se multiplica en aguas naturales de medio alcalino. El nombre de Spirulina se deriva de la palabra latina “espiral o hélix”, que se refiere a su configuración física. Se le llama alga azul verdosa por la presencia de clorofila, que le da el color verde, y ficocianina, que le da el color azulado (Antenna-Technologies, 2005).

El presente proyecto de investigación trata la microalga *Spirulina platensis*, debido a las características singulares que posee. La Spirulina tiene una capacidad enorme de almacenar nutrientes y posee un alto contenido proteico. Su contenido de proteínas y aminoácidos es de 65%; 5% de lípidos; 7% de minerales; 20% de carbohidratos y 3% de humedad (Belay, 2002).

Otro aspecto que caracteriza a esta microalga y que impulsa a que las investigaciones se expandan es su capacidad de reproducción, el alga se divide en dos cada 7 horas, y en condiciones ideales puede generar hasta 15000 kg/ha anuales de material seco, pero con la aplicación de tecnología apropiada los rendimientos pueden mejorar (Cabranes et al., 2000). La Spirulina posee cualidades inmunológicas, antioxidantes, antivirales, protectoras contra el cáncer, retiene metales pesados por lo que es un antitóxico, y se ha demostrado que es un regulador contra la hiperglicemia y la hiperlipidemia (Ponce, 2013). El propósito de esta investigación fue obtener un hidrolizado de Spirulina mediante la aplicación de un proceso de hidrólisis enzimática con papaína, para una futura aplicación se pulverizó al hidrolizado mediante la técnica de secado por aspersión, que permite conservar las extraordinarias características físico – químicas de esta microalga.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima y Reactivos

Spirulina platensis (Andes Spirulina, Ecuador), Papaína soluble con la actividad de 6000 USP-U/mg (Merck, Alemania), Formaldehído (Merck, Alemania), Agua MiliQ (Merck, Alemania), Metanol (Merck, Alemania), Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma Aldrich, USA).

2.2. Preparación de los tratamientos.

Se utilizó la enzima papaína (Merck - Alemania) en base a una relación de 10 g de enzima (papaína) por kg de sustrato (Spirulina). Además

se aplicó dos relaciones para la concentración entre la Spirulina y el agua, en base a la información de (Zhurbenko y Rodríguez-Martínez, 2005). Se realizó dos diluciones en la relación entre el sustrato, Spirulina, y el disolvente, agua destilada: relación 1:10 (20g de Spirulina + 200 mL de agua) y relación 1:20 (10g de Spirulina + 200 mL de agua).

2.3. Estudio de influencia de condiciones de operación

Se realizó 4 ensayos con distintas condiciones experimentales: donde se varió el pH entre 5 – 6, se utilizó NaOH 0,1 N y HCl 0,1 N (previamente preparado) para la regulación, y la concentración del sustrato (5 % y 10 %). La temperatura se mantuvo en un rango de 65 °C a 70 °C durante 4 horas, una vez transcurridas las 4 horas del proceso de hidrólisis se sometió a ebullición (92 °C) por 5 minutos al hidrolizado. En cada hora del proceso de hidrólisis se ajustó el pH y temperatura en los límites establecidos. Se realizó 3 réplicas de cada tratamiento.

2.4. Preparación del hidrolizado de Spirulina en base al mejor tratamiento.

Una vez aplicadas las corridas respectivas del diseño experimental se determinó que el mejor tratamiento se produce a las siguientes condiciones: pH = 5, concentración del sustrato 5 % (dilución 1/20), temperatura de 65 °C – 70 °C.

En un reactor con agitación vertical y en las condiciones previamente detalladas se mezcló 200 g de Spirulina y 4 L de agua destilada (1/20), una vez alcanzada la temperatura óptima (65 °C) se agregó la enzima papaína y se mantuvo la mezcla en las condiciones indicadas durante 4 horas, una vez transcurrido este tiempo del proceso de hidrólisis se aumentó la temperatura del reactor hasta que llegue el hidrolizado al punto de ebullición y se mantuvo así por 5 minutos. En cada hora del proceso de hidrólisis se ajustó el pH y temperatura en los límites establecidos.

2.5. Análisis fisicoquímico del hidrolizado

2.5.1. Determinación de sólidos totales

Se realizó en el equipo de determinación de humedad (KERN MLS 50-3, Alemania). A peso constante en un rango de temperatura entre 103 °C – 121 °C, durante 40 minutos, se colocó 3 g de muestra del hidrolizado y se determinó la humedad del mismo. En base al porcentaje de

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

humedad obtenido, se restó del 100 % y el resultado fue el porcentaje de sólidos totales. Se efectuó dos mediciones por cada muestra de hidrolizado.

2.5.2. Determinación del contenido de nitrógeno amínico

Se preparó una solución al 2 % del hidrolizado, de la solución preparada se tomó 3 mL y se completó a 20 mL con agua destilada en un matraz de Erlenmeyer de 100 mL. Posteriormente se colocó 20 mL de una solución de formaldehído a concentración normal en un vaso de precipitación de 50 mL. Ambas soluciones fueron neutralizadas (pH 6,95 – 7,01) con solución de NaOH 0,1 N. Después se agregó 2 mL de la solución de formaldehído neutralizada a la solución del hidrolizado y se mezcló. Se tituló con NaOH 0,1 N la solución final hasta un pH entre 9,10 - 9,20. Se anotó el gasto exacto de NaOH y se realizó los cálculos correspondientes en base a la siguiente fórmula:

$$\%N. am. = \frac{ml\ NaOH * 1.4 * k}{ml\ muestra * 1000} * 100 * \frac{95}{\%S.T}$$

Ecuación 1

Dónde:

- ml NaOH = gasto de NaOH 0,1 N en la titulación
- $k = \frac{\text{concentración práctica NaOH}}{\text{concentración teórica NaOH}}$
- %S.T = Porcentaje de sólidos totales

2.5.3. Análisis del tamaño de partícula del hidrolizado de Spirulina mediante Microscopia Electrónica de Barrido.

El tamaño, forma y superficie de las partículas del hidrolizado de Spirulina se analizó mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, la muestra se preparó fijando una mínima cantidad sobre una placa porta muestras metálica (diámetro 1 cm), luego se fijó la muestra a un metalizador al vacío (Q150R, Reino Unido), donde se recubrió con oro a 20 nm de espesor; finalmente se colocó en el microscopio electrónico de barrido (Phenom 1255, Eindhoven), los parámetros utilizados fueron: resolución de ≤ 30 nm y un voltaje de aceleración de 5kV.

2.6. Secado por aspersión del hidrolizado de Spirulina

Se utilizó 2500 mL del hidrolizado de Spirulina, se instaló la manguera de absorción del equipo Spray Dryer (BUCHI B-290, USA) y se

estableció en el panel una temperatura de entrada de 140 °C y una temperatura de salida de 80 °C. Seguidamente la manguera de absorción succionó la solución del hidrolizado, concluido el proceso se recolectó todo el polvo secado y se pesó para la determinar el rendimiento de secado.

2.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)

Se realizó una comparación del polvo obtenido de Spirulina hidrolizada con la Spirulina concentrada mediante el proceso de electroforesis SDS-PAGE.

Se caracterizó el hidrolizado de Spirulina en polvo, siguiendo la metodología descrita por (Laemmli, 1970). Se utilizó geles de poliacrilamida al 12 %, para determinar los pesos moleculares aproximados de la Spirulina concentrada y del hidrolizado.

Se agregó con la micropipeta 20 μ L de muestra en los pocillos del gel, la electroforesis se llevó a cabo en el equipo PowerPac™ Basic (BIO-RAD, USA) a 200 voltios durante 30 minutos, posteriormente se realizó la tinción de las bandas de polipéptidos con el colorante azul de Coomassie G-250 durante aproximadamente 12 horas, y se destiñó con una solución de ácido acético (5%), agua y metanol (50 %). Se reveló las bandas del gel en el equipo CHEMIDOC MP (BIO-RAD, USA).

2.8. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)

Se analizó el perfil de aminoácidos del hidrolizado de Spirulina mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa aplicando el método descrito por (Niessen et al., 2006). Se examinó el hidrolizado, la Spirulina concentrada y la enzima papaina en RP-HPLC utilizando el Cromatógrafo líquido de alta resolución (Agilent Technologies, USA). El eluyente A que se empleó fue 100 % de agua MilliQ con Ácido Trifluoroacético (TFA) a concentración 0,027 % (v/v), el eluyente B fue 70 % de metanol con TFA al 0,027 % (v/v).

El sistema de cromatografía HPLC, se equipó con una bomba cuaternaria, un detector de longitud de onda variable a 280 nm y un inyector automático, todos de la serie Agilent 1100. El sistema de adquisición de datos fue OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Se empleó una columna en fase inversa C18 Hi-pore (250 x 4,6 nm de diámetro interno) (Bio-Rad, Richmond; USA). El volumen de inyección fue de 100 μ L, con una concentración de la

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

muestra de 5 mg/mL disuelta en la fase A. La muestra del hidrolizado se eluyó con un gradiente lineal del 0 % al 70 % en fase B hasta 5 minutos a un flujo de 1 ml/min. Y a una presión de 200 – 400 bar. El tiempo de corrida fue de 12 minutos por muestra.

2.9. Diseño experimental

Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV Versión 15.205. Se aplicó un diseño factorial 2^2 , donde se utilizó los siguientes factores experimentales:

Factor 1: pH del hidrolizado

Niveles del factor: 5, 6

Factor 2: Concentración del sustrato

Niveles del factor: 5 % (1/20), 10 % (1/10)

Respuesta experimental: % Nitrógeno amínico

Se comparó entre tratamientos mediante análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95 %.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados del estudio de influencia de las condiciones de operación

En los ensayos realizados para determinar las condiciones idóneas de operación para el hidrolizado de Spirulina, se efectuó 3 réplicas de cada tratamiento; el pH tuvo un efecto altamente significativo en el proceso de hidrólisis, debido a que la disminución de la concentración de iones de hidrógeno en las disoluciones es un indicativo de que la hidrólisis enzimática se ejecutó de manera efectiva.

3.2. Resultados obtenidos de los parámetros físico-químicos de los tratamientos

Uno de los principales indicadores físico – químicos que se determinó al concluir el proceso de hidrólisis fue el porcentaje de sólidos totales en base a la humedad del hidrolizado. En el caso de la muestra 2 y sus respectivas réplicas; se diferenció que existe mayor contenido de nitrógeno amínico que en las otras muestras cuyos resultados son muy análogos entre replicas.

Tabla 1. Concentración de Sólidos totales y Nitrógeno Amínico

<i>Réplica</i>	<i>Relación</i>	<i>ml sustrato 2%</i>	<i>ml NaOH</i>	<i>%ST</i>	<i>%N.ami</i>
1	1:10	1,2	1,45	10,07	1,60
1'	1:10	1,2	1,55	9,78	1,76
1''	1:10	1,2	1,3	9,91	1,45
2	1:20	0,6	0,65	4,89	2,95
2'	1:20	0,6	0,6	4,95	2,69
2''	1:20	0,6	0,625	5,04	2,75
3	1:10	1,2	1,45	9,37	1,72
3'	1:10	1,2	1,7	9,53	1,98
3''	1:10	1,2	1,55	10,02	1,71
4	1:20	0,6	0,5	5,02	2,21
4'	1:20	0,6	0,6	5,23	2,54
4''	1:20	0,6	0,65	5,38	2,68

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

3.3. Determinación del mejor tratamiento para el hidrolizado de Spirulina

En la determinación del mejor tratamiento para la obtención del hidrolizado se empleó un diseño factorial 2^2 , se aplicó un análisis estadístico que engloba a todos los tratamientos propuestos, y se basó en la respuesta experimental del porcentaje de nitrógeno amínico contenido en el hidrolizado de Spirulina.

Para el análisis estadístico se tomó en cuenta los parámetros pH y la concentración del sustrato, de esta manera se expresó estos factores en función del porcentaje de nitrógeno amínico. El diseño experimental fue aplicado en el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV, se

evaluaron los datos experimentales mediante un análisis de varianza al 95% de nivel de significancia. El análisis de varianza indicó estadísticamente la significancia de cada efecto mediante la comparación de los cuadrados medios contra un estimado del error experimental.

En la **Figura 1** se representa la superficie de respuesta estimada de los tratamientos experimentales, aquí se observó la tendencia de los ensayos experimentales para alcanzar los niveles máximos en cuanto a sus factores, enfocados en los valores de nitrógeno amínico hasta un máximo de 5%.

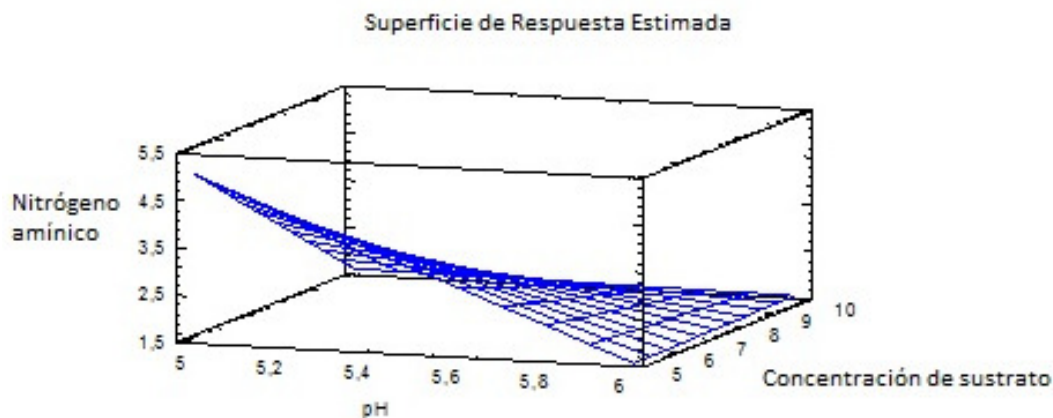


Figura 1. Efecto del pH y de la concentración de sustrato sobre el contenido de Nitrógeno Amínico para los tratamientos estudiados.

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

3.4 Análisis físico – químico del hidrolizado de Spirulina a pH 5 y concentración de sustrato 5%

3.4.1. Determinación de la humedad y sólidos totales del hidrolizado

Se obtuvo $4,89\% \pm 0,65\%$, de sólidos totales en el hidrolizado, esto concuerda con lo reportado por (Zhurbenko y Rodriguez-Martinez, 2005), en donde el porcentaje de sólidos totales obtenidos en el hidrolizado de Spirulina fue de $4,30\% \pm 0,60\%$. La diferencia es mínima con el experimento comparado y el valor experimental concuerda con el rango del valor bibliográfico.

3.4.2. Determinación del contenido de nitrógeno amínico

El nitrógeno amínico para (Hicks, 2001) representa aproximadamente el 16% del peso de las proteínas y su valor biológico se basa en los aminoácidos; por esta razón la determinación de este parámetro fue muy importante en el proyecto de investigación, ya que la Spirulina además de los aminoácidos esenciales que posee, presenta cantidades significativas de los no esenciales. El nitrógeno amínico obtenido en el hidrolizado fue de $2,58\% \pm 0,61$ que es un valor significativo en el producto obtenido, según Zhurbenko & Martínez (2005) el rango porcentual de

nitrógeno amínico que debe contener un hidrolizado de Spirulina es de $2,69\% \pm 0,10\%$. También se analizó el contenido de nitrógeno amínico del polvo concentrado de Spirulina, que resultó un valor cercano a 0, lo que tiene sentido ya que en éste existe una mínima cantidad de grupos amino libres de los aminoácidos y péptidos, lo contrario al hidrolizado.

3.4.3. Análisis del tamaño de partícula mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Se analizó la forma y la superficie del hidrolizado de Spirulina en polvo mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 2 se observa las partículas formadas por el proceso de hidrólisis, se puede determinar que la morfología de las partículas del hidrolizado en polvo es indefinida y porosa, característica de las partículas de hidrolizados proteicos, las proteínas al ser sometidas a un proceso de hidrólisis y en este caso a un posterior proceso de secado por aspersión adquieren esta morfología esférica. El diámetro de partícula indicado en la imagen a) con un aumento de 2450x es de aproximadamente $10\text{ }\mu\text{m}$. En el caso de la imagen b) que fue aumentada 9900x se consiguió determinar un diámetro de partícula más exacto de $8\text{ }\mu\text{m}$.

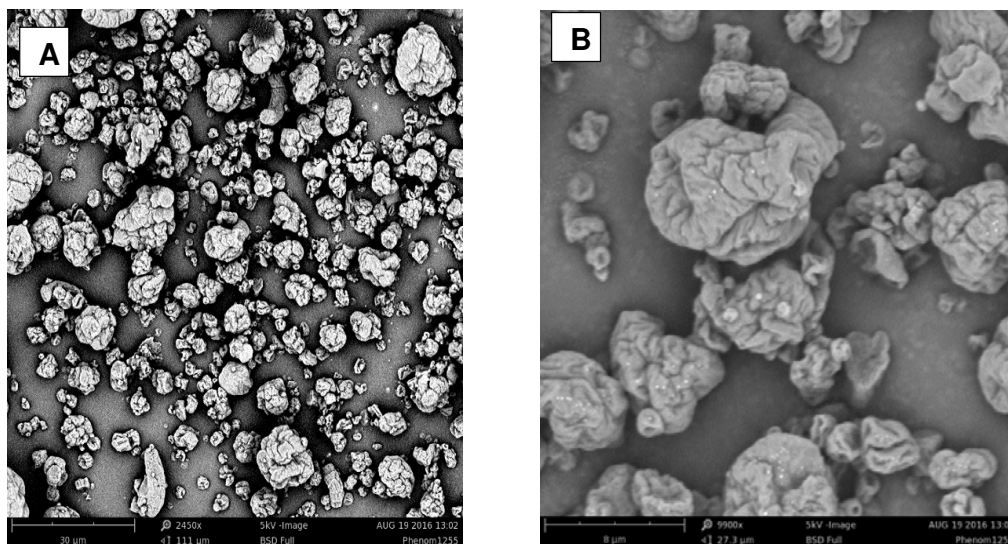


Figura 2. Morfología del hidrolizado de Spirulina en polvo. Medición del diámetro de partículas del polvo a diferentes aumentos (A) 2450x (B) 9900x mediante microscopía electrónica de barrido.

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

3.6. Análisis del rendimiento del Secado por aspersión del hidrolizado de Spirulina

Para la obtención del hidrolizado de Spirulina en polvo se secó la solución del hidrolizado en el Spray Dryer, de la cual se utilizó un volumen de 2500 mL, de este se obtuvo 133,37 g de hidrolizado en polvo. En base al cálculo de peso teórico la cantidad de polvo obtenido debía ser 180,5 g, se comparó los pesos obtenidos tanto teórica como el experimentalmente, dando un rendimiento neto de 73,89 %, este rendimiento es óptimo para la cantidad de solución del hidrolizado que se secó, incluso pudo tener un mayor rendimiento el hidrolizado en polvo pero en el proceso de secado por aspersión se adhieren a las paredes internas de la cámara de secado una mínima cantidad del polvo el cual no puede ser retirado por completo y es desechado. Sin

embargo la cantidad obtenida supera al 50 % de rendimiento, en la investigación de (López et al., 2008) quien especifica que en el proceso de secado por aspersión de extractos acuosos los rendimientos obtenidos superan el 50%, además la aplicación de esta metodología asegura la calidad del principio activo ya que elimina todo tipo de impurezas que existan en la muestra.

Una de las características más evidentes de la hidrólisis de Spirulina fue la coloración que presentó al concluir el proceso, ya que de una solución acuosa color verde pasión, característico de la Spirulina, se obtuvo una solución color caribe verde lima, esta solución al ser sometida a secado por aspersión se presentó como en la **figura 3**. Los colores de ambos polvos de Spirulina fueron asignados según la tabla internacional de colores.



Figura 3. Spirulina concentrada en polvo (Izquierda) y Spirulina hidrolizada obtenida mediante secado por aspersión (Derecha).

Para (Cabranes, et al., 2000), las ficobiliproteínas son pigmentos – proteínas fluorescentes naturales, que presentan grupos cromóforos denominados bilinas, las cuales son tetrapirroles lineales unidos a su esqueleto covalente, responsable de las características ópticas de la Spirulina, estas proteínas al ser hidrolizadas, en especial la ficocianina responsable de la coloración verde azulada de la microalga, provocan que se den cambios en estas estructuras y alteren las características en la coloración de producto final.

3.7. Comparación del concentrado de Spirulina y del hidrolizado de Spirulina mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil-Sulfato Sódico (SDS-PAGE)

Se comparó el polvo del hidrolizado de Spirulina con el polvo concentrado de Spirulina mediante SDS-PAGE, no se utilizó ningún tipo de estándar de peso molecular, debido a que el propósito de

la electroforesis fue comprobar que las proteínas de la Spirulina fueron hidrolizadas, es decir que se formaron péptidos de distintos pesos moleculares lo cual permitió el paso de los mismos a través del gel. Para esta determinación se realizó varias repeticiones a distintas concentraciones de las muestras y se definió la imagen de los geles con dos contrastes: el normal de coloración azul y en contraste plata que fue el que permitió una mejor definición de las bandas del gel.

En todas las muestras se puede distinguir dos bandas con mayor intensidad, una ubicada en la parte superior del gel, lo cual indica que tiene un peso molecular alto y probablemente pertenece a las C-ficocianinas (CPC) y la que se encuentra en la parte inferior que puede corresponder a las subunidades α y β de las ficocianinas y aloficocianinas, esto se corrobora con el estudio de (Martínez-Palma et al., 2015), que presenta perfiles electroforéticos de las proteínas de Spirulina y explica, que la fracción principal de las proteínas de Spirulina se encuentra en forma

de disposiciones supramoleculares conocidas como ficobilisomas, que están constituidas por polipéptidos pigmentados (ficobiliproteínas) y no pigmentados (péptidos de unión), las ficobiliproteínas más importantes son la C-ficocianina (CPC) y aloficocianina (APC), que en conjunto representan más del 60% de la proteína total.

En la **Figura 4** se presentó un gel de 1.00 mm de grosor en donde se cargó 4 muestras con mayor concentración, aquí se comparó los perfiles electroforéticos a diferentes contrastes a) y b), en el contraste b) en color plata es donde se tuvo

mejor definición de las bandas de las muestras. Las muestras 1 y 2 fueron cargadas en ausencia de 2-mercaptoetanol mientras que las 3 y 4 se cargó con el reactivo, esto nos permitió definir que en presencia del 2-mercaptoetanol se puede tener una mejor apreciación de las bandas proteicas. Además en este gel se visualizó como, en el carril 4 correspondiente al hidrolizado, se fraccionaron las proteínas en péptidos de menor peso molecular hasta llegar al final del carril, al contrario del carril 3 perteneciente a la *Spirulina* concentrada cuyas bandas son intensas cuando tienen pesos moleculares más altos.

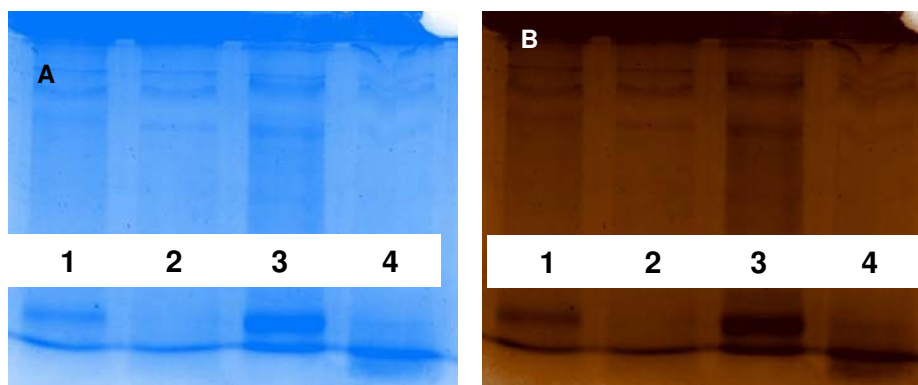


Figura 4. Perfil electroforético SDS – PAGE de las proteínas de *Spirulina platensis*.

A) Gel de electroforesis en contraste azul B) Gel de electroforesis en contraste plata. Carril 1: *Spirulina* sin 2-mercaptoetanol, Carril 2: Hidrolizado de *Spirulina* sin 2-mercaptoetanol, Carril 3: *Spirulina* con 2-mercaptoetanol, Carril 4: Hidrolizado de *Spirulina* con 2-mercaptoetanol.

En la **Figura 5** se observa el gel donde se comparó la *Spirulina* concentrada (1) con el hidrolizado de *Spirulina* (2) aquí se puede distinguir las bandas de proteínas de alto peso molecular presentes en el concentrado, además se visualiza que al final del carril existe una banda con mayor intensidad que todas, al comparar con

la investigación de (Martínez-Palma, et al., 2015), esta banda podría corresponder a las subunidades de las principales ficobiliproteínas. En el caso del hidrolizado (carril 2) se distingue la disociación que tuvieron las proteínas siendo fraccionadas en moléculas de bajos pesos moleculares por lo que tendieron a precipitar.

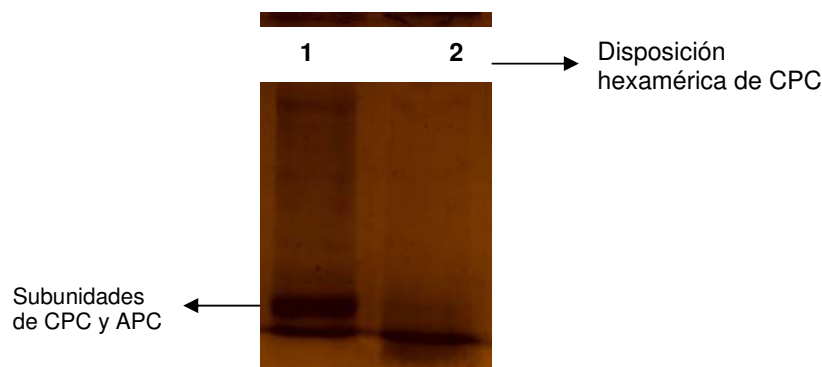


Figura 5. Electroforesis SDS – PAGE de *Spirulina* y el hidrolizado en polvo (10µg/µL) en contraste plata. Carril 1: *Spirulina* con 2-mercaptoetanol, Carril 2: Hidrolizado de *Spirulina* con 2-mercaptoetanol.

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

3.8. Análisis del hidrolizado de Spirulina en polvo mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC)

Para conocer el perfil cromatográfico del hidrolizado de Spirulina en polvo se utilizó la técnica de RP-HPLC, en este análisis se confirmó que las proteínas de la Spirulina concentrada fueron hidrolizadas gracias a la acción de la papaína. Se inyectó una muestra de la Spirulina concentrada, otra del hidrolizado y una de la enzima papaína. Los perfiles cromatográficos de las 3 muestras contienen una señal alta aproximadamente en el minuto 1 del análisis, esta señal se debe a la presencia del TFA, es por eso que en el mismo tiempo de cada muestra se formó el pico característico a este compuesto.

Existen varios picos cromatográficos que coinciden en el mismo tiempo entre el hidrolizado y la Spirulina concentrada, pero con diferencia de absorbancias. Según se comparó con la investigación de (Hanaa et al., 2003),

donde se enfoca en los perfiles cromatográficos por RP-HPLC de los carotenoides y el tocoferol de *Spirulina platensis*, existen señales entre los minutos 2 y 4 que son exclusivos de este tipo de compuestos. Además el pico con más absorbancia que se da en el minuto 2,7 aproximadamente representa a la señal de la ficocianina, ya que es el que presentó mayor concentración que el resto.

Se realizó un gráfico de comparación de los 3 cromatogramas como se muestra en la **Figura 6**, donde se puede distinguir la relación de ciertos picos cromatográficos, entre el hidrolizado y el concentrado, y entre el hidrolizado y la enzima, pero con distintas absorbancias. Además, en el hidrolizado, se observa que existen picos que presentan absorbancias similares a los de la papaína, esto se debe a que existen componentes de la papaína que fueron desnaturalizados al momento de aumentar la temperatura para concluir el proceso de hidrólisis.

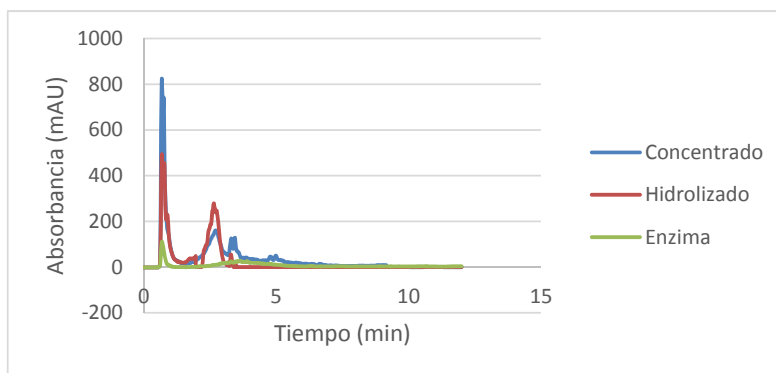


Figura 6. Comparación de los cromatogramas de la Spirulina concentrada, Spirulina Hidrolizada y la enzima papaína.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvo un hidrolizado de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, el mismo que podría ser utilizado como ingrediente funcional, es decir, este hidrolizado tiene la multifuncionalidad de ser aplicado como ingrediente farmacéutico activo o como suplemento proteico. Se evaluaron las condiciones óptimas de obtención del hidrolizado de Spirulina, en base a los ensayos experimentales y al diseño experimental aplicado se determinaron que las mejores condiciones

para la hidrólisis fueron las empleadas en el ensayo experimental 2, en el que se estabilizó el pH a 5, con concentración del sustrato de 5% en base a la relación 1/20 de sustrato: agua y un rango de temperatura entre 65°C y 70°C. Se obtuvo mediante secado por aspersión un hidrolizado de Spirulina en polvo, logrando un rendimiento óptimo de 73,89 % a partir de la cantidad de solución del hidrolizado que se secó y presentó un color caribe verde lima, comparado con el polvo concentrado de Spirulina que presenta un color verde pasión, los cambios en la coloración se debe a modificaciones estructurales

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

de las ficobiliproteínas en el proceso de hidrólisis. Se caracterizó el producto obtenido en cuanto a grado de hidrólisis mediante una comparación con la Spirulina concentrada. Los análisis mediante electroforesis SDS – PAGE, y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC) permitieron establecer que por el proceso de hidrólisis se generó una mezcla compleja de péptidos de bajos pesos moleculares y de aminoácidos libres a diferencia del polvo concentrado que presenta proteínas de pesos moleculares elevados.

gastrointestinal digestion. *Revista mexicana de ingeniería química*, 14, 25-34.

Niessen, S., Mcleod, I. y Yates, J. R. (2006). HPLC Separation of Digested Proteins and Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(7), pdb.prot4663. doi: 10.1101/pdb.prot4663

Ponce, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: Spirulina a bajo costo. *Idesia (Arica)*, 31, 135-139.

Zhurbenko, R. y Rodriguez-Martinez, C. (2005). Metodología para el Desarrollo de Hidrolizados Proteicos para Medios de Cultivo en cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36(4).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antenna-Technologies. (2005). Spirulina: some scientific foundations Consultado, en www.antenna.ch.

Belay, A. (2002). The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5, 26-49.

Cabranes, Y., Lagomasino, J. y Lagomasino, A. (2000). Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la C-ficocianina-620 obtenida a partir de la Spirulina platensis. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 31(3).

Hanaa, H., E., A., Farouk, K., El, B. y Gamal, S. (2003). Spirulina AS a Source of Carotenoids and α -Tocopheril and its Anticarcinoma Factors. *Biotechnology*, 2(3), 222-240.

Hicks, J. (2001). *Bioquímica*. Mexico DF (Mexico): McGraw-Hill.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680. doi: 10.1038/227680a0

López, O., Torres, L., Salomón, S., González, M. y Chávez, D. (2008). Secado por aspersión de extracto acuoso de Bidens alba L. a escalas de laboratorio y banco. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13, 0-0.

Martínez-Palma, N., Martínez-Ayala, A. y Dávila-Ortiz, G. (2015). Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina (Arthrospira maxima) obtained by simulated

Obtención de un hidrolizado de spirulina (*Arthrospira platensis*) en polvo, mediante secado por aspersión, como ingrediente funcional

Obtaining a hydrolyzate of spirulina (*Arthrospira platensis*) powder, by spray drying, as a functional ingredient

Métodos de extracción y purificación de β -glucanos en hongos y cereales

Extraction and purification methods of β -glucans in fungi and cereals

G. V. Hidalgo¹, O López^{1*}

¹Universidad Técnica de Ambato (UTA), Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
Av. Los Chasquis y Río Payamino, Ambato (Ecuador)

Artículo recibido: 06/07/2017

Artículo aceptado: 17/11/2017

RESUMEN

Durante los últimos años el estudio de extracción de componentes bioactivos en los alimentos ha llamado la atención de los investigadores, por el amplio espectro de beneficios a la salud desde mejoramiento de procesos metabólicos hasta estimulación del sistema inmunológico, los β -glucanos sustancia principal de la pared celular de células de setas y en el endospermo de cereales permiten la prevención y el tratamiento de enfermedades como la diabetes, el cáncer y el VIH. La presente revisión pretende abordar los principales procesos para su obtención y purificación. La extracción se logra a través de contacto con disolventes el más empleado el agua caliente 80 -100 °C por la alta solubilidad de los β -glucanos en este, o con disolventes alcalinos como hidróxido de sodio o potasio. Mientras que la purificación del polisacárido puede ser a través de varios métodos en función de las características de la sustancia, se pueden aplicar métodos químicos como as reacción con Solución de Fehling al formar un complejo de los monosacáridos reductores con Cu^{+2} o el tratamiento con disolventes con distintos gradientes de concentración empleando sulfato de amonio, también empleando técnicas para purificación a partir de su tamaño molecular como ultrafiltración, diálisis o dependiendo su carga por electroforesis, o técnicas con mayor precisión como columnas de cromatografía de distintos tipos intercambio iónico, de afinidad, de exclusión molecular, cromatografía en gel, además en base en su solubilidad por el método de congelación descongelación. Tras el análisis de los métodos tanto de extracción como de purificación se determinó que el método más idóneo para la extracción es la que emplea como disolvente agua caliente y que la purificación congelación descongelación es muy efectiva y tiene bajo costo sin embargo las técnicas cromatográficas permiten una mayor pureza en la obtención de la sustancia.

Palabras clave: β – glucanos, salud, obtención, recuperación

ABSTRACT

Nowadays, researchers are interested in the study of extraction methods of bioactive molecules on the food, because there has a spread spectrum of health benefits, from metabolic processes in the human body to stimulation of the immune system. The β – glucans are a substance of the cell-wall of mushroom cells and inside the cereal endosperm, this substance is used for prevention and treatment of diseases such as diabetes, cancer and HIV. The present revision intends to approach the main processes for its obtaining and purification. The extraction is achieved through contact with solvents most commonly used hot water 80 - 100 °C by the high solubility of β - glucans in this, or with alkali solvents such as sodium or potassium hydroxide. While the purification of the polysaccharide may be through several methods depending on the characteristics of the substance, chemical methods such as reaction with Fehling's solution can be applied by forming a complex of Cu^{+2} reducing monosaccharides or treatment with different concentration gradients solvents with ammonium sulfate, also using techniques for purification from molecular size such as ultrafiltration, dialysis or depending on their charge by electrophoresis, or more accurately techniques such as chromatography columns of various types: ion exchange, affinity, molecular exclusion and gel chromatography. Further based on their solubility by the freeze thawing method. After the analysis of the extraction and purification methods, it was determined that the most suitable method for the extraction are successive extraction with hot water and the purification freezing thawing is very effective and has low cost however the chromatographic techniques allow a high purity substance.

Keywords : β – glucan, health, obtaining, recovery.

**** Autor de correspondencia:** Orestes López, E mail: od.lopez@uta.edu.ec

1. INTRODUCCIÓN

Los glucanos son polímeros de monosacáridos unidos por enlaces α y β glucosídicos (Laroche y Michaud, 2007). Están presentes en la pared celular de ciertos organismos vivos: bacterias, levaduras, hongos y plantas específicamente en cereales (Pizarro et al., 2014). La estructura y características del polisacárido varían en

dependencia de su origen, cuando la fuente son levaduras u hongos el polímero se forma de moléculas de glucopiranosas en su mayoría con enlaces 1,3- β y algunos 1,6- β , en el caso de los cereales los monómeros se unen con enlaces 1,3- β y 1,4- β con o sin ramificaciones, pero en el caso de las bacterias son moléculas lineales con enlaces 1,3- β (Laroche y Michaud, 2007).

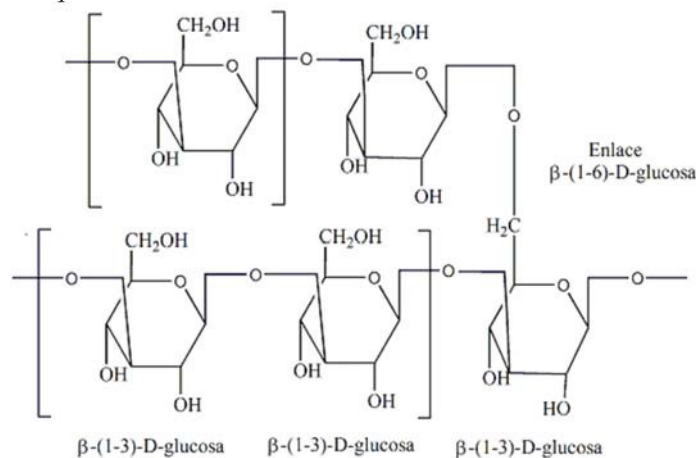


Figura 1. Estructura de β -glucanos en cereales (Volman et al., 2008)

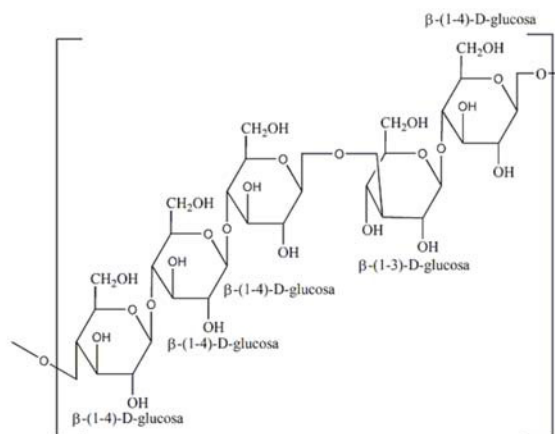


Figura 2. Estructura de β -glucanos en cereales (Volman, et al., 2008)

Los hongos poseen pared celular al igual que células vegetales y bacterias, cuyo espesor varía en mohos y levaduras con un diámetro de 200 nm y de 200 a 300 nm respectivamente; la cual está constituida 80-90 % de polisacáridos como quitina, glucano (β -glucano, α -glucano), manano, celulosa, quitosán; actuando como componentes fibriales o componentes de la matriz amorfa. (Cepero et al., 2012). De la misma manera en los cereales los polisacáridos son parte estructural de la pared de las células pero en este caso del endospermo y la capa de aleurona (Cui, 2001).

Los uso de los alimentos en la actualidad no únicamente se limitan a proporcionar

componentes químicos y energía para la salud humana, hace casi 3 décadas en países del Hemisferio Occidental como China y Japón se empezó a incursionar en investigaciones sobre una tercera función de los alimentos para la regulación de sistemas fisiológicos, debido a la infinidad de componentes que muchos de ellos poseen y no han sido aprovechados (Palencia, 2003).

Uno de estos componentes son los β - glucanos que han despertado un alto interés en los investigadores por la amplitud en sus beneficios tanto en el ámbito industrial como en el tratamiento y prevención de enfermedades. Estas sustancias inofensivas son utilizadas en la

industria alimentaria como agentes texturizantes (Pizarro, et al., 2014). Pero su ámbito de mayor aplicación lo conforma el medicinal, clínico y farmacéutico por su vasto espectro de actividades biológicas (Dang et al., 2013). Se utilizan para prevenir y tratar el cáncer, reducir los niveles de colesterol, controlar la diabetes, en el tratamiento de virus como el VIH y para incrementar la respuesta inmune. Su actividad fisiológica cambia en relación a la fuente por modificaciones en su estructura y conformación.

Los hongos contienen un tipo especial de β -glucanos con propiedades medicinales por su diferente estructura, solubilidad y tamaño molecular (Sobieralski et al., 2012). Los β -1,3-glucanos tienen actividad inmunomoduladora y antitumoral (Kim et al., 2014).

Una amplia cantidad de investigaciones demuestran la actividad antitumoral y anticancerosa de los β -glucanos, modelos de estudio con animales especialmente en ratones el 1,3 glucano con el interferón gamma actuando como inmunoadyuvante inhibieron el desarrollo de tumores y metástasis hepática (Khan et al., 2014; Thompson et al., 1987) demostraron la actividad antioxidante y funcional de β -glucanos en *Coprinus atramentarius*, *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. Otras investigaciones demuestran que el polisacárido a partir de *Agaricus Blazei* posee propiedades anticancerígenas (Toledo et al., 2013).

Los cereales, específicamente la avena y la cebada además de ser fuente de vitaminas, minerales, contienen compuestos bioactivos como caratenoides, esteroides compuestos fenólicos y β -glucanos (Slavin, 2003).

Los β - glucanos presentes en los cereales a diferencia de los que se encuentran en hongos ayudan en actividades metabólicas, interfiriendo en efectos fisiológicos. Se los conoce también como fibra soluble, poseen una alta viscosidad, en la cebada estudios han demostrado la capacidad de reducir la incidencia de enfermedades cardíacas, cáncer de colon, y la concentración de glucosa además de incrementar la producción de insulina (McIntosh et al., 1991; Newman et al., 1989) y los glucanos extraídos de la avena pueden reducir niveles de colesterol sérico y glucosa (Bhatty, 1999).

La obtención del polisacárido puro de distintos tipos de células requiere de procesos físicos y químicos, es por ello la importancia del conocimiento de los métodos de extracción y purificación.

2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Los métodos de extracción pueden ser por vía seca o húmeda, la presente recopilación describe

los tipos de extracción a partir de una fuente seca principalmente polvo fino y seco tanto del cuerpo fructífero como del micelio o ambos de las setas. (Carvajal et al., 2012), recomienda que sea de un diámetro de 40 mesh (0,4mm) y harina de los cereales, (Li et al., 2006) emplearon harina de salvado de trigo con una finura de 50 mesh (0,297mm).

La extracción en cereales requiere de un proceso previo de los granos incluyendo los pasos de: molienda para producir harina, inactivación de β -glucanasas en un medio alcohólico con incremento de temperatura, filtración, secado, molienda y homogenización (Rivero Hernández, 2012). Con una finura de menos de 0,5 mm (Immerstrand, 2009)

En cereales se requieren de tratamientos enzimáticos, se utiliza α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa (Toledo, et al., 2013). Immerstrand (2009) realizó una purificación con enzimas: α -amilasa, pancreatina, proteasa.

Extracción con agua

Es el método más utilizado para la extracción de β -glucanos y polisacáridos en general, ya que una de sus propiedades físicas es su alta solubilidad en agua y estabilidad en altas temperaturas, sin embargo en dependencia del enlace de los monómeros varía la solubilidad: en enlaces glucosídicos β -(1-4) disminuye la solubilidad, y los enlaces de tipo β -(1-3) hacen que la molécula adquiera mayor solubilidad y flexibilidad, adicionalmente este método produce un daño mínimo en el polisacárido (Rivero Hernández, 2012).

La extracción se realiza con agua caliente a temperaturas comprendidas entre 40 °C y 100 °C, o con una mezcla de agua a temperatura ambiente y agua caliente, en un tiempo de 2 a 6 horas aproximadamente; posterior a la extracción para la separación del pellet del sobrenadante se emplea centrifugación (Bao et al., 2001).

Se utilizan extracciones sucesivas con agua para un mayor rendimiento en el proceso y se utiliza tanto para hongos como para cereales, requiriendo los últimos de tratamientos previos con enzimas.

Kim et al. (2005), emplearon extracciones repetidas con agua a 100 °C para la obtención de β -glucanos a partir de frutos secos de *A. blazei*, de igual manera Carbonero et al. (2012) empleo extracciones sucesivas con agua en 2 fases inicialmente con agua a 4 °C y después agua a una temperatura de 100 °C para *Pleurotus sajorcaju*, precipitando el metabolito con etanol concentrado.

La alta solubilidad de los β -glucanos en agua hace que durante la extracción estos polímeros residan en el sobrenadante con la ayuda de

centrifugación, para su recuperación como se mencionó se emplea alcohol en exceso o se puede generar la precipitación con ácido tricloroacético al 5 % (Khan, et al., 2014; Mizuno et al., 1998; Ruthes et al., 2013) precipitó los β -glucanos mediante la adición de etanol en exceso con una relación 3:1 v/v aplicando centrifugación (10.000 rpm) a una temperatura de 10 °C.

Extracción alcalina

Este tipo de extracción produce un mayor daño a los β -glucanos que el tratamiento con agua caliente pero se usa para moléculas más grandes y de mayor peso molecular que no son fácilmente solubles en agua empleando soluciones acuosas básicas como Hidróxido de sodio o potasio (2 %), carbonato de sodio (5-15 %), temperatura 10 °C (Ligarda Samanez et al., 2012; Wang y Fang, 1999) y se reportan casos en los que se empleó oxalato de amonio (Rahar et al., 2011).

Técnicas alternativas

Abarcan nuevas alternativas para extracción del polisacárido, con la ventaja que reducen el tiempo de extracción y los disolventes mientras aumentan el rendimiento, siendo tratamientos poco nocivos para la sustancia (Wang y Weller, 2006).

Dentro de estos tratamientos están: Ultrasonicación o extracción asistida por ultrasonido (UAE), Extracción en fluidos supercríticos, Extracción acelerada de disolventes ASE o extracción líquida a presión PLE (Gangopadhyay et al., 2015).

Los β -glucanos se pueden extraer en ultrasonicación continua con ondas a una frecuencia de 20 kHz controlando la temperatura $50 \pm 1^\circ\text{C}$ con un pH entre 5-9, los mejores resultados se registran con: el tiempo de 4,8 min 50% amplitud y pH 9, peso molecular más bajo que los métodos de extracción con agua (Hematian Sourki et al., 2017).

Métodos de purificación

Los β -glucanos extraídos tanto por el método acuoso como por el alcalino no generan un producto completamente puro puede tener componentes de distinta naturaleza u otro tipo de polisacáridos, por lo que se requiere de un proceso de purificación, de carbohidratos generalmente se realiza por cromatografía o por electroforesis (Voet et al., 2016), sin limitar a una infinidad de opciones para obtener una sustancia con un alto grado de pureza.

Métodos químicos

Solución de Fehling

Este método se basa en una reacción de óxido-reducción. Cuando un azúcar reductor se encuentra a altas temperaturas en condiciones básicas este se desintegra y algunos de estos productos reducen los iones cúpricos para formar óxido cuproso, provocando que los monosacáridos como los disacáridos reductores reaccionen con el Cu^{+2} del reactivo de Fehling formando un complejo insoluble de cobre (Pomeranz y Meloan, 1994).

La solución de Fehling permite la precipitación selectiva de polímeros de glucosa con enlaces (1-6). Pereira (2000) menciona que posterior a la aplicación del licor se requiere de centrifugación, diálisis y filtración

Variación de gradientes de concentración

Se fundamenta en las diferentes solubilidades de los polisacáridos en acetona y etanol, por lo que al incrementar gradualmente las concentraciones de estas sustancias precipitan polisacáridos con diferente peso molecular (Chaplin y Kennedy, 1994) Li, et al. (2006) utilizaron como reactivo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ variando sus concentraciones en cada fase de purificación desde 17- 40 % (F2: 17.01 %, F3: 18.01 %, F4: 19.44 %, F5: 24 %, F6: 40 %).

Disolventes orgánicos

Previo a la extracción se requiere eliminar sustancias que pueden interferir en el aislamiento del polisacárido como: lípidos, fenoles, terpenos (compuestos apolares) y otros, lo que se consigue empleando disolventes orgánicos principalmente etanol, acetona, cloroformo, metanol o dimetilsulfóxido (Smiderle et al., 2006). O se realiza un lavado inicial con alcohol al 85% (Camelini et al., 2005). A parte del agua el alcohol es utilizado como disolvente para la extracción de β -glucanos por su alta disponibilidad y bajo costo (Carvajal, et al., 2012).

Los β -glucanos precipitan también en un nivel bajo de saturación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20-55% (Li, et al., 2006).

Congelación- descongelación

El método se basa en una congelación y descongelación lenta de la solución concentrada con el polisacárido, eliminando otro tipo de sustancias contaminantes o indeseables solubles en agua fría y precipitando las solubles en agua caliente como lo son los β , ya que al enfriar el extracto de agua caliente en función de la

estructura y solubilidad de los componentes de la solución (Gorin y Iacomini, 1984) y con la finalidad de eliminar los disolventes empleados en la extracción como el etanol (Carvajal, et al., 2012).

Columnas de purificación

Cromatografía de exclusión molecular

También denominado cromatografía de filtración en gel, se basa en el control del tamaño de los poros de las matrices dependiendo del tipo y tamaño de polisacárido a purificar, estos no ingresan a los poros del gel sino se segregan a la fase líquida en orden proporcional al tamaño eluyendo primero los azúcares de mayor peso molecular (Ramos et al., 2005). Es un método altamente utilizado para separar los β -glucanos de otro tipo de polisacáridos fundamentados en el tamaño de ellos, con la ventaja de poder identificar también su peso molecular empleando marcadores (Zhang et al., 1998).

Cromatografía de afinidad

Uno de los métodos más utilizados es la cromatografía de afinidad con lecitinas inmovilizadas (Voet, et al., 2016), mediante una unión reversible. Este tipo de columna eluye empleando el polisacárido como fase móvil, las fracciones que no pueden unirse con el ligando se desplazan fuera de la columna (Shi, 2016).

Cromatografía de intercambio iónico

Mizuno, et al. (1998) reportan una columna de intercambio aniónico DEAE- Sepharosa como opción para purificar β -glucanos, empleando resinas cambiadoras de iones formadas por cadenas poliméricas tridimensionales con grupos funcionales ionizables

Diálisis

La purificación por diálisis permite separar moléculas grandes y pequeñas a través de una membrana semipermeable. (Kozarski et al., 2009) empleo este método para purificación de polisacáridos empleando agua destilada a través de un sistema denominado MilliQ por 24 horas a temperatura ambiente.

Ultrafiltración

Se emplean para separaciones de muestras de alta complejidad (Susanto et al., 2008). La ultrafiltración es la separación basándose en el diámetro de las partículas a través de un tamiz, en un intervalo de diámetros entre 0,002-0,2 μm permitiendo retener sustancias macromoleculares: azúcares de gran tamaño y polisacáridos en general y para este tipo de moléculas se utilizan membranas de tipo asimétrico (Hernandez et al., 1990).

Este procedimiento emplea pocos reactivos y disolventes por lo que es una opción menos dañina para el producto a purificar y tiene un bajo costo (Beer et al., 1996), sin embargo tiene como desventaja que las membranas pueden absorber a los polisacáridos reduciendo la cantidad de producto durante la purificación (Shi, 2016).

Electroforesis

Permite la migración de sustancias iónicas a través de un campo eléctrico en dependencia de la carga, estructura y peso molar de la sustancia, es un método de purificación de alta sensibilidad para la separación de biomoléculas complejas como los polisacáridos, ya que estas poseen determinada carga eléctrica en aniones o cationes capaces de disociarse (Martínez et al., 1999).

El gel más empleado para electroforesis de polisacáridos es la poliacrilamida con tinción de nitrato de plata (Gualtero et al., 2008).

Table 1 Resumen de métodos de extracción y purificación de B- glucanos

ORIGEN	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	MÉTODO DE PURIFICACIÓN	FUENTE BIBLIOGRÁFICA
<i>Agaricus blazei</i>	Extracción acuosa 80°C	Cromatografía de intercambio aniónico	(Mizuno, et al., 1998)
<i>Agaricus blazei</i>	Extracción acuosa sucesiva 100°C	Cromatografía Sephadex G-50	(Kim, et al., 2005)
<i>Agaricus blazei</i>	Extracción con etanol 25°C	Freeze thawing	(Carvajal, et al., 2012)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Extracción acuosa sucesiva 4° C/100° C	Freeze thawing	(Carbonero, et al., 2012)
<i>Cebada</i>	Etanol/agua	-	(Moreano, 2011)
<i>Harina de cebada</i>	Etanol/agua	Precipitación con etanol	(Kayal Vizhi y Nirmala Many, 2013)
<i>Cebada</i>	Etanol	Precipitación con etanol	(Immerstrand, 2009)
<i>Flammulina velutipes</i>	Hidróxido de sodio, cloroformo, metanol, dimetil sulfoxido, agua destilada	Precipitación con disolventes orgánicos	(Pillancari, 2010)
<i>Pleurotus florida</i>	Extracciones sucesivas con agua	Separación por membranas	(Santos-Neves et al., 2008)
<i>A. brasiliensis</i>	Lavado con etanol, extracción con agua	Cromatografía Columna DEAE-celulosa	(Camelini, et al., 2005)
<i>A.bisporus, P. ostreatus y C. atramentarius</i>	Extracción sucesiva con agua fría y caliente	Congelación – descongelación (freeze thawing)	(Khan, et al., 2014)
<i>Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus, and Phellinus linteus</i>	Agua 100 °C	Freezing drying	(Kim, et al., 2014)
<i>Salvado de trigo</i>	Tratamiento con etanol Lavado con etanol Tratamiento con α amilasa al residuo	Cromatografía	(Dey et al., 2012)
<i>Harina de cebada</i>	Sonicación	-	(Morgan, 2000)

3. CONCLUSIONES

Existen distintos métodos y condiciones para la extracción y purificación de β -glucanos que varían en dependencia de su origen (hongos o cereales), la aplicación y el autor. En el caso de los procesos de extracción se destacan las extracciones sucesivas con agua caliente por la alta solubilidad del componente en agua, por la facilidad del método, eficiencia del

procedimiento y bajo costo, constituyendo un tratamiento poco dañino para la sustancia a obtener con una posterior precipitación alcohólica del polisacárido con etanol en una concentración 3:1. Para su purificación los métodos son más analíticos y minuciosos abarcando métodos químicos, cromatográficos de filtración y electroforéticos principalmente. En base a la pureza los métodos más empleados son las columnas de cromatografía ya sean de

intercambio iónico o exclusión molecular, permitiendo las últimas identificar el peso molecular de la sustancia extraída, sin embargo presentan un alto costo, en contraste existe un método con menor costo denominado *Freeze-Thawing*, que implica la congelación y descongelación de la sustancia basándose por la solubilidad de los compuestos a diferentes temperaturas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bao, X., Duan, J., Fang, X. y Fang, J. (2001). Chemical modifications of the (1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. *Carbohydr Res*, 336(2), 127-140.
- Beer, M. U., Arrigoni, E. y Amado, R. (1996). Extraction of oat gum from oat bran: Effects of process on yield, molecular weight distribution, viscosity and (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan content of the gum. *Cereal Chemistry*, 73(1), 58-62.
- Bhatty, R. (1999). The potential of hull-less barley. *Cereal Chemistry*, 76, 589-599.
- Camelini, C. M., Maraschin, M., de Mendonca, M. M., Zucco, C., Ferreira, A. G. y Tavares, L. A. (2005). Structural characterization of beta-glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnol Lett*, 27(17), 1295-1299. doi: 10.1007/s10529-005-0222-6
- Carbonero, E. R., Ruthes, A. C., Freitas, C. S., Utrilla, P., Galvez, J., da Silva, E. V., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. y Iacomini, M. (2012). Chemical and biological properties of a highly branched beta-glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydr Polym*, 90(2), 814-819. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.06.005
- Carvajal, A. E. S. S., Koehnlein, E. A., Soares, A. A., Eler, G. J., Nakashima, A. T. A., Bracht, A. y Peralta, R. M. (2012). Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 493-499. doi: 10.1016/j.lwt.2011.11.018
- Cepero, M. C., Restrepo, S. y Franco, A. (2012). *Biología de hongos* (1 ed.). Bogotá, (Colombia): Universidad de los Andes.
- Cui, S. (2001). *Processing, structures and Functionality*. Lancaster, Pennsylvania (EEUU): Technomic Publishing.
- Chaplin, M. F. y Kennedy, J. F. (1994). *Carbohydrate Analysis A practical Approach* Oxford: Oxford University Press.
- Dang, Z., Feng, D., Liu, X., Yang, T., Guo, L., Liang, J., Liang, J., Hu, F., Cui, F. y Feng, S. (2013). Structure and antioxidant activity study of sulfated acetamido-polysaccharide from *Radix Hedysari*. *Fitoterapia*, 89, 20-32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.05.011>
- Dey, B., Bhunia, S. K., Maity, K. K., Patra, S., Mandal, S., Maiti, S., Maiti, T. K., Sikdar, S. R. y Islam, S. S. (2012). Glucans of *Pleurotus florida* blue variant: Isolation, purification, characterization and immunological studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 591-597. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.031>
- Gangopadhyay, N., Hossain, M., Rai, D. y Brunton, N. (2015). A Review of Extraction and Analysis of Bioactives in Oat and Barley and Scope for Use of Novel Food Processing Technologies. *Molecules*, 20(6), 10884.
- Gorin, P. A. J. y Iacomini, M. (1984). Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydrate Research*, 128(1), 119-132. doi: [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85090-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85090-9)
- Gualtero, D., Castellanos, J., Pérez, G. y Lafaurie, G. (2008). Porphyromonas Gingivalis libre de polisacáridos utilizando cromatografía de alta resolución SEPHACRYL S-200. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 147-160.
- Hematian Sourki, A., Koocheki, A. y Elahi, M. (2017). Ultrasound-assisted extraction of β -d-glucan from hull-less barley: Assessment of physicochemical and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 462-475. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.111>
- Hernandez, A., Tejerina, F., Arribas, J., Martinez, L. y Martinez, F. (1990). *Microfiltración, Ultrafiltración, y Ósmosis Inversa* (Vol. 4). Murcia (España): Universidad de Murcia.

- Immerstrand, T. (2009). Extraction of β -Glucan from Oat Bran in Laboratory Scale. *Cereal chemistry*, v. 86(no. 6), pp. 601-608-2009 v.2086 no.2006. doi: 10.1094/CCHEM-86-6-0601
- Kayal Vizhi, V. y Nirmala Many, J. (2013). Study on Estimation, Extraction and Analysis of Barley Beta-glucan. *International Journal of Science and Research*, 3(10), 1480-1484.
- Khan, A. A., Adil, G., Masoodi, F. A., Shaheen, K. y Mudasir, A. (2014). *Antioxidant and functional properties of β -glucan extracted from edible mushrooms Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus and Coprinus atramentarius*. Paper presented at the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Solan (India).
- Kim, J., Lee, K., Hwang, K. y Yoo, G. (2014). *Total Phenolics and Beta-1,3-Glucans Extracted from Medicinal Mushrooms (Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus, and Phellinus linteus)*. Department of Food and Nutrition, and Research Institute of Human Ecology. Seoul National University. Seul (Korea). Retrieved from <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/total-phenolics-and-beta-13-glucans-extracted-from-medicinal-mushrooms-ganoderma-lucidum-inonotus.pdf>
- Kim, Y. W., Kim, K. H., Choi, H. J. y Dong-Seok, L. (2005). Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from Agaricus blazei. *Biotechnol Letters*, 27(7), 483-487. doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2225-8>
- Kozarski, M. S., Klaus, A. S. y Nikšić, M. P. (2009). *Influence of structural features on immunostimulating activity of glucans extracted from Agaricus blazei mushroom*. Paper presented at the Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences Novi Sad (Serbia).
- Laroche, C. y Michaud, P. (2007). New Developments and Prospective Applications for β -Glucans. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), 59-73. doi: 10.2174/187220807779813938
- Li, W., Cui, S. W. y Kakuda, Y. (2006). Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat β -d-glucans. *Carbohydrate Polymers*, 63(3), 408-416. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.025>
- Ligarda Samanez, C. A., Repo-Carrasco, R., Encina Zelada, C. R., Herrera Bernabé, I. y Quinde-Axtell, Z. (2012). Extracción con soluciones neutra y alcalina para el aislamiento de fibra soluble e insoluble a partir de salvado de quinua (chenopodium quinoa willd.), kiwicha (amaranthus caudatus l.) y cañihua (chenopodium pallidicaule). *Revista Sociedad Química Peru*, 78(1), 53-64.
- Martínez, I., Muñoz, Y., Riverón, L., Duarte, M., Jones, C., Lemercinier, X., Nápoles, L. y Muñoz, X. (1999). Caracterización físico-química del polisacárido Vi de Salmonella typhi. *Revista VacciMonitor (Vacunología y Temas Afines)* 8(5), 6-12.
- McIntosh, G. H., Whyte, J., McArthur, R. y Nestel, P. J. (1991). Barley and wheat foods: influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(5), 1205-1209. doi: 10.1093/ajcn/53.5.1205
- Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K.-i. y Tsuchida, H. (1998). Polysaccharides from Agaricus blazei Stimulate Lymphocyte T-Cell Subsets in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(3), 434-437. doi: 10.1271/bbb.62.434
- Moreano, F. (2011). *Determinación del contenido de betaglucanos en líneas avanzadas y en variedades de cebada, procesada y no procesada, por medio de un método enzimático*. Ingeniería Bioquímica, Universidad Técnica de Ambato, Ambato (Ecuador). Disponible en <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3087/1/BQ.13.pdf>
- Morgan, K. R. (2000). Process for extraction of β -glucan from cereals and products obtained therefrom.
- Newman, R. K., Newman, C. W. y Graham, H. (1989). The hypocholesterolemic function of barley β -glucan. *Cereal Foods World*, 36, 800-805.
- Palencia, Y. (2003). Que son los alimentos funcionales. *Medicina naturista*.

- Pereira, M. (2000). *Producción de polisacáridos por células inmovilizadas de Pseudevernia Furfuracea*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España). Disponible en <http://eprints.ucm.es/5213/1/T24794.pdf>
- Pillancari, P. J. (2010). *Extracción, aislamiento y análisis cualitativo de polisacáridos, terpenos y proteínas presentes Flammulina velutipes*. Químico Farmacéutico, Universidad Austral de Chile, Valdivia (Chile). Disponible en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2010/fcp641e/doc/fcp641e.pdf>
- Pizarro, S., Ronco, A. M. y Gotteland, M. (2014). β -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición*, 41, 439-446.
- Pomeranz, Y. y Meloan, C. E. (1994). *Food Analysis Theory and Practice*. United States: Springer US.
- Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M. A. y Singh, G. S. (2011). Preparation, characterization, and biological properties of beta-glucans. *J Adv Pharm Technol Res*, 2(2), 94-103. doi: 10.4103/2231-4040.82953
- Ramos, E. L., E., R., Bordallo, S. y León, V. (2005). Determinación de polisacáridos por filtración por gel de celulosa. *ICIDCA Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba*, 39, 35-39.
- Rivero Hernández, M. (2012). *Extracción y reología de Betaglucanos de cebada y elaboración de masas de pan sin gluten enriquecidas con los extractos*. Universidad de Valladolid, Valladolid (España). Disponible en <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/1688>
- Ruthes, A. C., Rattmann, Y. D., Malquevicz-Paiva, S. M., Carbonero, E. R., Cordova, M. M., Baggio, C. H., Santos, A. R., Gorin, P. A. y Iacomini, M. (2013). Agaricus bisporus fucogalactan: structural characterization and pharmacological approaches. *Carbohydr Polym*, 92(1), 184-191. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.08.071
- Santos-Neves, J. C., Pereira, M. I., Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Alquini, G., Gorin, P. A. J., Sassaki, G. L. y Iacomini, M. (2008). A novel branched $\alpha\beta$ -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom Pleurotus florida. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 309-314. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.030>
- Shi, L. (2016). Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *Int J Biol Macromol*, 92, 37-48. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100
- Slavin, J. (2003). Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc Nutr Soc*, 62(1), 129-134. doi: 10.1079/pns2002221
- Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Mellinger, C. G., Sassaki, G. L., Gorin, P. A. y Iacomini, M. (2006). Structural characterization of a polysaccharide and a beta-glucan isolated from the edible mushroom Flammulina velutipes. *Phytochemistry*, 67(19), 2189-2196. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.06.022
- Sobieralski, K., Siwulski, M., Lisiecka, J., Jdryczka, M., Sas-Golak, I. y Fruyska-Jówiak, D. (2012). *Fungi-derived β -Glucans as a component of functional food* (Vol. 11).
- Susanto, H., Arafat, H., Janssen, E. M. L. y Ulbricht, M. (2008). Ultrafiltration of polysaccharide-protein mixtures: Elucidation of fouling mechanisms and fouling control by membrane surface modification. *Separation and Purification Technology*, 63(3), 558-565. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.06.017>
- Thompson, I. M., Ritchie Spence, C., Lamm, D. L. y Diluzio, N. R. (1987). Immunotherapy of Bladder Carcinoma with Glucan and Cyclophosphamide. *The American Journal of the Medical Sciences*, 294(5), 294-300. doi: <https://doi.org/10.1097/00000441-198711000-00002>
- Toledo, R. C., Carvalho, M. A., Lima, L. C., Vilas-Boas, E. V. d. B. y Dias, E. S. (2013). Measurement of β -glucan and other nutritional characteristics in distinct strains of Agaricus subrufescens mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 12(43), 6203-6209.
- Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. (2016). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level* (5th ed.). New Jersey, (EEUU): Wiley.

- Volman, J. J., Ramakers, J. D. y Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol Behav*, 94(2), 276-284. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.045
- Wang, L. y Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wang, S. y Fang, J. (1999). Studies on separation, purification and chemical structure of a polysaccharide in *Cynanchum paniculatum*. [Article]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 34(10), 656-658.
- Zhang, L., Zhou, J., Yang, G. y Chen, J. (1998). Preparative fractionation of polysaccharides by columns packed with regenerated cellulose gels. *Journal of Chromatography A*, 816(2), 131-136. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00475-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00475-0)

Validación del método para la determinación de vitamina C en alimentos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Validation of the method of determination of vitamin C in foods by high efficiency liquid chromatography (HPLC)

M. Córdova-Suarez^{1*}, S. Aguirre-Arias¹, E. Garcés-Sánchez¹, P. Ramos-Córdova², D. Córdova-Suarez³

¹Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Ambato – Ecuador

²Empresa Pública Municipal Gestión Integral Desechos Sólidos Ambato, EPM-GIDSA, Ambato - Ecuador

³HES WELL Coordinator Schlumberger SPM-SHAYA, Auca - Ecuador

Artículo recibido: 06/07/2017

Artículo aceptado: 17/11/2017

RESUMEN

La validación de un método es un requisito importante para garantizar que los laboratorios de ensayo emitan resultados confiables y reproducibles. La validación se realizó empleando la metodología descrita por la AOAC 967.21 complementada con la metodología de Ledezma-Gairaud (2004). El método desarrollado produce una respuesta lineal con un coeficiente de correlación $r=0,999$ para cada curva de calibración, el LD igual a 0,0002 mg/ml y el LC igual a 0,007 mg/ml. El rango de trabajo comprende valores de 0,007 mg/ml hasta 0,15 mg/ml para la concentración de ácido ascórbico que va desde 7,25 mg hasta 142,73 mg de vitamina C por cada 100 g de muestra. El coeficiente de variación fue menor al 2 % para repetibilidad y reproducibilidad. El % de recuperabilidad se encontró en el rango establecido para HPLC con un valor igual al 99 %. Los límites de repetibilidad y reproducibilidad con valores de 2,16 y 2,61 mg ácido ascórbico/100g de muestra respectivamente. La Incertidumbre Combinada del método para todos los niveles de concentración empleadas con un valor igual a $\pm 0,95$ y la incertidumbre expandida con un valor igual a $\pm 1,91$ expresado en unidades de mg de vitamina C por cada 100 g de muestra. Finalmente se determinó que la incertidumbre encontrada (26 %) fue menor al rango bajo de criterio de aceptación (30 %), cumpliendo de este modo con el objetivo de validación planteado.

Palabras claves: ácido ascórbico, repetibilidad, reproducibilidad, incertidumbre.

ABSTRACT

Validation of a method is an important requirement to ensure reliable and reproducible results from test laboratories. Validation was performed using the methodology described by AOAC 967.21 supplemented with the methodology of Ledezma-Gairaud (2004). The developed method produces a linear response with a correlation coefficient equal to 0.007 mg / ml. The working range comprises values from 0.007 mg / ml to 0.15 mg / ml for the concentration of ascorbic acid ranging from 7.25 mg to 142.73 mg of vitamin C per 100 g of sample. The coefficient of variation was less than 2% for repeatability and reproducibility. The% recoverability was found in the range set for HPLC with a value equal to 99%. The limits of repeatability and reproducibility with values of 2.16 and 2.61 mg ascorbic acid / 100 g of sample respectively. The Combined Uncertainty of the method for all concentration levels used with a value equal to ± 0.95 and the expanded uncertainty with a value equal to ± 1.91 expressed in units of mg of vitamin C per 100 g. Finally, it was determined that the uncertainty found (26%) the lowest of the lowest in the criterion of acceptance (30%), thus fulfilling the objective of validation

Keywords: ascorbic acid, repeatability, reproducibility, uncertainty

* Autor de correspondencia: Manolo Córdova 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 (Muñoz, 2009). El resultado de la validación es probar la aptitud de los métodos, documentar su validez y cumplir con los estándares de calidad (Muñoz, 2009).

La técnica de cromatografía de gases se emplea con más frecuencia para la determinación de vitaminas utilizando columnas de sílice en fase normal y en fase reversa columnas C18 (Sierra et al., 2007). La detección de vitamina C se realiza mediante espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible que resulta de la excitación de los electrones de enlace. Como consecuencia los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio (Skoog et al., 2000). El método consiste en la extracción de la vitamina C (ácido ascórbico) con reactivos y condiciones que eviten al máximo su deterioro, esto se logra utilizando una disolución extractora de ácido metafosfórico y ácido acético (Ledezma-Gairaud, 2004).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (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). La finalidad del presente trabajo es validar una metodología analítica que permita la determinación de ácido ascórbico (Vitamina C) en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la realización de la parte experimental del siguiente trabajo se utilizó estándar de Vitamina C (CHEM SERVICE INC, USA). Se trabajó con una columna para HPLC C18 (25 x 4) mm 5 µm MERCK LiChroC ART. Se necesitaron pipetas automáticas de 1 y 10 ml (Oxford, USA) y pipetas volumétricas, Viales (Agilent ZORBAX, USA) para HPLC, Micro filtro poro 0,45 µm (Amp®) y Papel filtro. Además, balones de aforo 25, 50, 200 y 500 ml, embudos y piseta. Se utilizaron los siguientes reactivos para HPLC, fosfato mono básico de potasio (KH_2PO_4), (LOBA Chemia, India), ácido Metafosfórico (LOBA Chemia, India), ácido acético glacial concentrado (Merck, Alemania) y agua grado I. Los equipos que se utilizaron fueron un HPLC (Perkin Helmer series 200, USA), software para análisis versión N200 (Chromatography Data System, SURWIT TECHNOLOGY INC, Hangzhou-China)

certificado, detección por UV/visible (PerkinElmer serie 200, USA), sistema de purificación de agua MILLI Q-SYSTHEIS Millipore SAS67120 MOISHEI (Merck, USA), balanza analítica (Mettler Toledo modelo AX 05, México), ultrasonido (Spectrum, USA), pH-metro (Mettler Toledo, México).

2.2 Metodología

La metodología que se empleó para la consecución del trabajo experimental es el método oficial 967.21 de la AOAC (1968) modificado por Ledezma-Gairaud (2004).

2.2.1 Preparación de la fase móvil KH_2PO_4 0,1M : Agua proporción (90:10)

Se diluyó 6,80 g de fosfato monobásico de potasio en 300 ml de agua desmineralizada, posterior a ello se llevó a volumen de 500 ml y se ajustó el pH a 2,50 con ácido fosfórico concentrado. La fase móvil se preparó mezclando 450 ml de la solución KH_2PO_4 con 50 ml de agua desmineralizada post-ultrasonido.

2.2.2 Preparación de la solución extractora

Se aforaron 40 ml de ácido acético glacial con agua desmineralizada en un balón de 200 ml. Se diluyó 15 g de ácido metafosfórico en 200 ml de la solución de ácido acético glacial, esta solución se llevó al ultrasonido hasta tener una dilución total. Se retiró y a temperatura ambiente (25 °C) se llevó a volumen final de 500 ml con agua desmineralizada.

2.2.3 Preparación de la curva de calibración

Se aforó 25,40 mg de estándar de ácido ascórbico en 25 ml de solución extractora en un balón de 50 ml. Partiendo de esta solución se tomaron alícuotas de 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 y se aforaron en balones de 25 ml con solución extractora.

2.2.4 Preparación de la muestra

Se tomaron 4 puntos de medición los cuales fueron MR-10, MR-16, MR-20, MR-23, se diluyeron de MR-10 0,1 g; de MR-16 y MR-20 2 g y de MR-23 3 g en 25 ml de soluciones extractora y se aforan en balones de 50 ml limpios y secos. Los puntos de medición se llevaron al ultrasonido por 10 minutos. Posterior a ellos se filtraron en papel y seguido en microfiltros de poro 0,45 µm para finalmente, colocar el filtrado en viales e inyectar en el HPLC.

2.2.5 Condiciones cromatográficas

Se colocó la columna dentro del termostato y se establecieron las siguientes condiciones: temperatura del horno 30 °C, flujo 0,5 ml/min, volumen de inyección 5 µl y tiempo de corrida de 5 minutos por muestra, detección por UV/visible a una longitud de onda de 254 nm.

2.2.6 Validación del método

Para la validación del método se estableció un diseño de un solo factor completamente aleatorizado (DCA) con cuatro niveles (muestras de referencia MR) La respuesta experimental es la concentración de vitamina C expresada en mg de ácido ascórbico/100 g muestra.

2.2.7 Linealidad

En condiciones de reproducibilidad, se elaboraron cinco curvas de calibración, a partir de estas se realizó la estimación de la ecuación de la recta que fue empleada para determinar la linealidad del método. Además, se determinó el coeficiente de correlación lineal el cual fue considerado como criterio de aceptabilidad si el valor fuese igual o superior a $r \geq 0,999$.

Se prepararon seis estándares de vitamina C y analizaron por HPLC, como función respuesta se obtuvo el área de cada curva estándar. También, se aplicó el método de mínimos cuadrados que aseguró estadísticamente la confiabilidad y exactitud de las curvas realizadas (Miller y Miller, 1993).

2.2.8 Límite de detección (LD)

Se realizó una serie de diluciones para la identificación de la concentración más baja de analito que puede ser detectada de forma confiable mediante el método expuesto por Duffau et al. (2010) y basado en lo que indica la Guía de Validación que menciona que el Límite de Detección (LD) es igual a 3 veces la desviación estándar (Eurachem, 2005). Dichas diluciones fueron 10 blancos de muestras independientes fortificados a la menor concentración aceptable que fue de 0,000482 mg/ml.

2.2.9 Límite de cuantificación (LC)

Según la Guía de Validación el Límite de Cuantificación (LC) es igual a 10 veces la desviación estándar (Eurachem, 2005). Para calcular dicho límite, se prepararon 10 blancos independientes y se determinó el ruido generado en cada cromatograma que es igual a la desviación estándar.

2.2.10 Rango de trabajo

Se estableció el rango de trabajo tomando el valor del LC como límite inferior y el valor de la concentración donde la curva de calibración se desvía de la linealidad como límite superior.

2.2.11 Precisión

Se determinó la precisión del método bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, con dichos resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en los cuatro niveles de concentración establecidos. Se compararon los valores de F crítico reportado en la tabla de ANOVA por nivel, con el F experimental obtenido de las mediciones. Conjuntamente, se determinó el coeficiente de variación (% CV) el cual no puede ser mayor al 2 % en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad (Eurachem, 2005).

2.2.12 Repetibilidad y Reproducibilidad

Se realizaron 6 repeticiones por día por nivel. Para darle validez a los datos se calculó el límite, la desviación estándar y el coeficiente de variación menor o igual al 2 % tanto para repetibilidad (r) como para reproducibilidad (R).

2.2.13 Tratamiento estadístico

Para determinar la precisión de la metodología de validación, se empleó una hoja de cálculo Excel. Además, dentro de un proceso de validación es recomendable emplear pruebas de significancia estadística especialmente la Prueba F-Fisher que se utiliza para comprobar si los datos obtenidos no presentan diferencia significativa. Adicional a esto, se llevó a cabo un análisis estadístico denominado análisis de varianza (ANOVA), con el que se compara las diferencias dentro de cada grupo de datos.

2.2.14 Exactitud

Para el cálculo de la exactitud se utilizó el método de análisis repetido de una muestra de concentración única conocida y se calculó el porcentaje de recuperación (% R) para el nivel bajo, el mismo que debía encontrarse en un intervalo entre el 97 % y el 103 % para la técnica HPLC (Gutiérrez et al., 2007).

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, donde menciona, que se deben tomar en cuenta todas aquellas incertidumbres que intervengan en la obtención del resultado las mismas que son: Incertidumbre estándar por repetibilidad, Incertidumbre estándar por reproducibilidad, Incertidumbre estándar a partir de certificados de calibración, Incertidumbre estándar a partir de tolerancia del material volumétrico (considerando una distribución triangular), Incertidumbre combinada de concentración. Empleando estos datos se estimó la incertidumbre expandida (U)

que es igual a la incertidumbre estándar combinada multiplicada por el factor de cobertura (Eurachem, 2012; Skoog, et al., 2000).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de los Datos Primarios

Realizado el análisis de los cromatogramas obtenidos en el software N2000, se determinó la concentración de vitamina C (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las concentraciones de ácido ascórbico en muestras comerciales

Réplica	*CONCENTRACIÓN (mg/100g)							
	NIVEL 1		NIVEL 2		NIVEL 3		NIVEL 4	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1	7,27	7,10	23,75	23,78	44,38	44,38	142,32	144,92
2	7,44	7,21	23,85	23,38	44,75	44,75	143,22	141,80
3	7,31	7,24	23,29	23,16	44,09	44,09	142,68	143,75
4	7,26	7,34	23,71	23,86	45,75	45,75	143,49	145,84
5	7,25	7,28	23,01	23,01	45,24	45,24	140,16	140,70
6	7,14	7,12	23,04	23,71	45,55	45,55	142,15	141,70
$\bar{X}$	7,28	7,22	23,44	23,48	44,96	44,96	142,34	144,92

Nota: *Concentración de vitamina C en miligramos por cada 100 gramos de muestra. Las muestras comerciales analizadas fueron: Pulp de sandía (nivel 1), Pulp, Néctar de durazno (nivel 2), Cerelac (nivel 3) y Bio C (nivel 4). Los análisis se realizaron por duplicado con 6 réplicas, cada análisis fue realizado en días diferentes identificado como día 1 y día 2.

3.2 Linealidad

Se calculó el coeficiente de correlación lineal que es considerado un criterio de aceptabilidad cuando su valor es superior a $r=0,999$, las cinco curvas realizadas en condiciones de reproducibilidad cumplen con este criterio y se ajustaron al modelo

de regresión lineal por lo cual son aceptadas para determinar la concentración en mg de ácido ascórbico por ml de solución de cada una de las muestras de referencia empleadas. A demás integrando todas las curvas de calibración (ver Figura 1) se calculó la ecuación global de la recta.

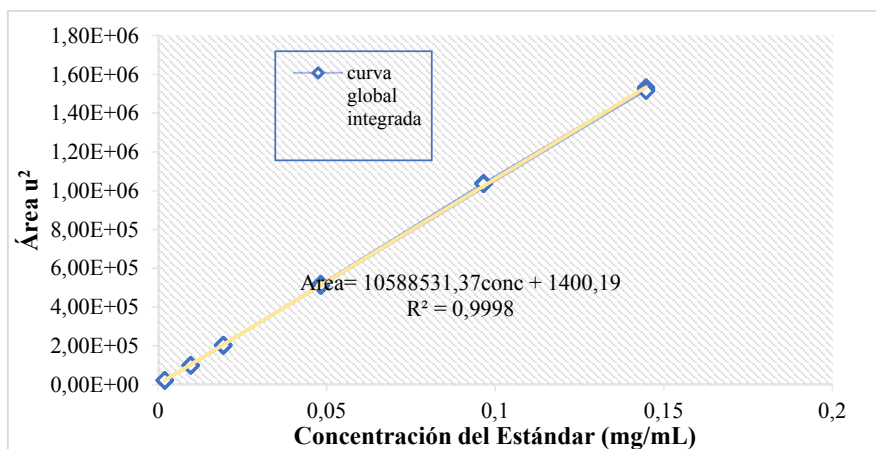


Figura 1. Ecuación global de las curvas de calibración integradas para la determinación de ácido ascórbico

Además, utilizando el método de mínimos cuadrados se determinó los valores globales de la

ecuación de la recta, los mismos que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Estimación Lineal de las curvas en forma integrada

Estadístico	Valor Global
m	10588531,37
b	1400,186722
r	0,99978864
Sm	29094,73978
Sb	2160,204208
Syx	8219,354744

3.3 Límite de detección (LD)

El valor del LD fue de 0,002 mg de ácido ascórbico por ml de solución, esto determinó la mínima concentración de vitamina C que puede ser detectada por el HPLC bajo las condiciones del trabajo del equipo.

3.4 Límite de cuantificación (LC)

El valor del LC fue de 0,007 mg de ácido ascórbico por ml de solución, esto determinó la menor concentración de vitamina C que puede cuantificarse por el HPLC bajo las condiciones del trabajo del equipo, por debajo de esos valores se considera la inexistencia de vitamina C.

3.5 Rango de Trabajo

El rango de trabajo establecido para la validación de vitamina C definió como límite inferior para la cuantificación un valor de 0,007 y como límite superior la última concentración de la curva de calibración de 0,1448, valores expresados en unidades de mg de ácido ascórbico/mL de solución, estos valores permitieron cuantificar vitamina C en muestras con concentraciones que

van desde 7,25 mg hasta 142,73 mg de ácido ascórbico por cada 100 g de muestra.

3.6 Precisión

Utilizando los resultados obtenidos del análisis de varianza ANOVA, se calcularon Los coeficientes de variación de repetibilidad (% CV_r) y reproducibilidad (% CV_R) con un valor menor al 2 % respectivamente, lo cual se considera aceptable según la guía de validación (Eurachem, 2005). Además, se calcularon los Límites de repetibilidad (Lr) de los cuales se escogió el valor menor, que fue de 2,16 mg de ácido ascórbico/100 g de muestra, de este modo se ajustó el método para la eliminación de errores en el proceso. El límite de reproducibilidad (LR) presentó un valor de 2,61 mg de ácido ascórbico/ 100 g de muestra.

3.7 Tratamiento estadístico

Se determinó que no existió diferencia significativa en las varianzas de los grupos muestrales (tratamientos) al comparar el F crítico con el F calculado mediante una prueba de F-Fisher realizada a un nivel de confianza del 95 %, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen del Análisis de Varianza ANOVA

*Concentración (mg/100g)	F calculado	F Crítico	Conclusión
Nivel 1	1,4	4,387	No existe diferencia significativa
Nivel 2	3,219	4,387	No existe diferencia significativa
Nivel 3	0,618	4,387	No existe diferencia significativa
Nivel 4	3,250	4,387	No existe diferencia significativa

Nota: *Concentración de vitamina C en miligramos por cada 100 gramos de muestra.

3.8 Análisis de Exactitud

Se calculó el valor del porcentaje de recuperación de 99,32 %, el mismo que se encuentra dentro del rango reportado que esta entre 97 % y 103 % (Gutiérrez, et al., 2007), demostrando que el método empleado para determinar la concentración de Vitamina C es exacto y con gran desempeño bajo condiciones de trabajo de laboratorio.

3.9 Análisis de Incertidumbre

Se calculó la incertidumbre combinada (μ) del método para los cuatro niveles igual a $\pm 0,95$ y la Incertidumbre Expandida (U) de $\pm 1,91$ expresado en mg de vitamina C por cada 100 g de muestra.

En la Tabla 4 se muestran los criterios de aceptación de la validación.

Tabla 4. Criterios de Validación.

INCERTIDUMBRE $\leq 30\%$ RANGO BAJO	30 % DEL RANGO BAJO	INCERTIDUMBRE EXPANDIDA	% DE INCERTIDUMBRE
	2,18 mg/100g	1,91 mg/100g	26,31 %

El Servicio de Acreditación Ecuatoriana (SAE) dentro de sus criterios de validación menciona que el porcentaje de la incertidumbre del límite más bajo debe ser $\leq 30\%$, de este modo se corrobora que la incertidumbre expandida del método analizado cumple con el objetivo de validación.

4. CONCLUSIONES

Se elaboró el procedimiento en el que se detallan las directrices a seguir para la cuantificación de vitamina C empleando la metodología de la AOAC 967.21 modificado con el método realizado por Ledezma-Gairaud (2004).

Se estableció la aplicabilidad del método para la determinación de Vitamina C, validando el método, asegurando la confiabilidad de los resultados utilizando un análisis estadístico para demostrar que no existió diferencia significativa.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AOAC (1968). AOAC Official Method 967.21. Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices. 2, 6-Dichlorophenol Titrimetric Method. (pp. 2). : AOAC INTERNATIONAL.

Bueno-Solano, C., Campas-Baypoli, O. N., Díaz-García, A. S., Izaguirre-Flores, E. I., Verdugo-Zamorano, W., Estrada-Alvarado, M. I. y López-Cervantes, J. (2009). Cuantificación de rivo flavina (vitamina B2) en productos lácteos por HPLC. *Chil Nutr.*

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Rodriguez, L., Soto, M., Aguilera, M. y Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos

generales sobre la validación de métodos. *Instituto de Salud Pública de Chile.*

Eurachem. (2005). Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados <http://www.metroquimica.com.ar/descargas/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>.

Eurachem. (2012). Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. (3 ed.). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.

Gutiérrez, T. M., Hoyos, O. L. y Páez, M. I. (2007). Determinación del contenido de ácido ascórbico en uchuva (*Physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 5(1), 70-79. doi: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6117626.pdf>

Ledezma-Gairaud, M. (2004). Validación del método: Determinación de vitamina C total por cromatografía líquida de alta resolución "HPLC". *Tecnología en Marcha*, 17, 9.

Miller, J. C. y Miller, J. N. (1993). *Estadística para química analítica*. Delaware (EEUU).

Muñoz, M. F. B. (2009). Validación de Métodos de ensayo para el análisis de parámetros

físico-químicos en aguas limpias y residuales en el laboratorio de medio ambiente (pp. 9-12). Sangolquí, Pichincha.

Sierra, N., Rojas, J. H., 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. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 623-630.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. y Gómez, M. C. (2000). *Principios de Análisis Instrumental*: McGraw-Hill.

Sustitución de huevos por el mucílago de chíá en la tecnología de pan de camote

Replacement of eggs by chia mucilage in sweet potato bread technology

M. Robayo, C. German*

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ambato, Ecuador

Artículo recibido: 17/08/2017

Artículo aceptado: 17/11/2017

RESUMEN

Para establecer el tratamiento de sustitución más adecuado para la elaboración de pan de camote, se evaluó la influencia de la sustitución de huevos por el mucílago de chíá en distintas concentraciones (20 y 40 % mucílago de chíá cada uno con 0, 20, 40 y 60 % huevos) dentro del 4 % de la formulación general del pan. Se realizó pruebas viscoelásticas en masas de la mezcla de harinas de trigo y camote 0, 10, 15, 20, 25 % de harina de camote y 100, 90, 85, 80, 75 % de harina de trigo respectivamente, analizando parámetros como: índice de absorción, amasado, gluten, viscosidad, amilasas y la retrogradación del almidón para cada masa, según estos parámetros analizados la sustitución de harinas que se debe realizar para obtener un pan con las características adecuadas es de hasta un 80 % de harina de trigo y un 20 % de harina de camote. Los parámetros que se evaluaron al producto final fueron: dureza, trabajo de dureza terminado, deformación recuperable, trabajo total y masticabilidad durante 4 días a cada tratamiento. Parámetros como dureza, trabajo de dureza y trabajo total al pasar los días aumentaban en cada tratamiento, mientras que la deformación recuperable disminuye, debido al envejecimiento que sufre el pan por pérdida de agua. El tratamiento con 40 % de mucílago de chíá y 60 % de huevos fue el mejor tratamiento, por presentar mayor contenido de mucílago, que es un hidrocoloide modificador de estructura de la amilosa y amilopectina, retardando así la velocidad de envejecimiento del pan.

Palabras clave: masa, textura, comportamiento viscoelástico, análisis sensorial.

ABSTRACT

To establish the most adequate treatment of substitution for the elaboration of sweet potato bread, it was evaluated the influence of the substitution of eggs by mucilage of chia in different concentrations (20 and 40 % mucilage chia each one with 0, 20, 40 and 60 % eggs) within 4 % of the overall formulation of the bread. Viscoelastic tests in mass were realized to the mixture of wheat and sweet potato flours 0, 10, 15, 20, 25 % of sweet potato and 100, 90, 85, 80, 75 % of wheat flour respectively, analyzing parameters such as , the absorption rate, the unit operation of kneaded, gluten, viscosity, amylases and the retrogradation of starch for each mass, according to these parameters analyzed the substitution of flour that has to be performed to obtain a bread with the adequate features is up to 80 % of wheat flour and 20 % of sweet potato flour. The parameters evaluated to the final product were: hardness, hardness finished work, recoverable deformation, total work, chewiness and for 4 days. Parameters as hardness, toughness and work total work increased every day in each treatment, while recoverable deformation decreases, due to aging suffered of the bread by water loss. The treatment with 40 % mucilage chia and 60 % of eggs was the best, by having more chia mucilage, which is a hydrocolloid modifier of the structure of amylose and amylopectin, retarding the velocity of aging of the bread.

Keywords: mass, texture, viscoelastic behavior, sensory analysis.

* Autor de correspondencia: Cesar German. E-mail: ca.german@uta.edu.ec

1. INTRODUCCIÓN

La chía es una semilla milenaria poco conocida en Ecuador hasta hace alrededor de una década pese a sus enormes beneficios nutricionales (Gallardo, 2015).

Ayerza y Coates (2011) indican que las semillas de chía contienen en 56,9 % al 64,8 % del ácido graso alfa linoléico conocido como omega 3, ácido que es esencial en el organismo y según estudios realizados el mucílago obtenido de la semilla de chía poseen un enorme potencial como fuente de nutrientes, hidrocoloides y propiedades funcionales, como; gran capacidad de retención de agua, emulsificante, espesante, estabilizante en la formación de espumas, altamente soluble en agua fría y/o caliente, de gran interés para la ciencia, tecnología e ingeniería de los alimentos (Muñoz Hernández, 2012).

Las propiedades funcionales del huevo dentro de la panificación son las de contribuir a la capacidad de retención de gas y el contenido proteico de la masa, dando lugar a un aporte estructural extra y un mayor volumen (Boatella Riera et al., 2004). De esta forma se puede sustituir hasta en un 25 % a huevos o aceites por semillas de chía en la elaboración de pasteles, obteniendo un producto final con buenas características organolépticas y nutritivas (Borneo et al., 2010) mismo dato que indica los

efectos de la sustitución del mucílago de chía por grasa, utilizando 25, 50, 75 y 100 g / 100 g de grasa en las propiedades de pan, sin alterar la actividad de volumen, simetría, uniformidad, humedad y aw, niveles más altos de mucílago de chía afectaron al color y firmeza de la miga y llegaron a la conclusión de que una sustitución de 25 g / 100 g de grasa es tecnológicamente factible en la elaboración de panes sin alterar sus propiedades de calidad (Anónimo., 2015).

El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto que tiene la sustitución de huevos por el mucílago de chía en la elaboración de un pan de camote, realizando ensayos con diferentes concentraciones de sustitución y mediante pruebas organolépticas y de perfil de textura poder elegir el mejor tratamiento.

2. METODOS

El camote que se utilizó para la obtención de la harina fue de la provincia de Tungurahua del cantón de Baños que se expende en el mercado mayorista de la ciudad de Ambato. La harina de trigo que se utilizó es de la marca comercial YA instantánea auto leudante fortificada con polvo de hornear para todo uso. Las semillas de chía fueron adquiridas del cantón Urcuquí, provincia de Imbabura lugar donde se realiza el cultivo.

2.1 Elaboración del pan

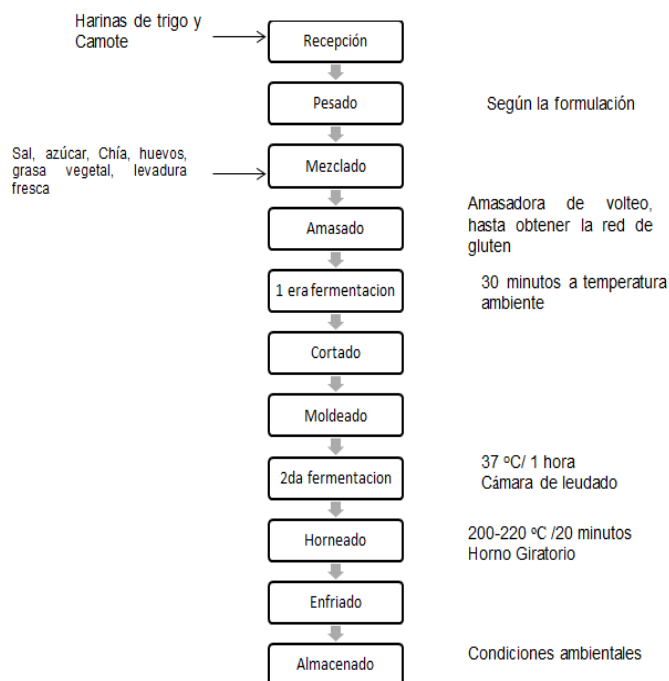


Figura 2. Diagrama de flujo elaboración de pan

Se realizó un diseño experimental AxB con tres replicas. Los factores fueron mucilago de chífa al 20 y 40 % y huevos al 0, 20, 40 y 60 % en la formulación del pan de camote.

Pruebas viscoelásticas

Se realizó el análisis del comportamiento viscoelástico de las masas mediante el equipo MIXOLAB siguiendo el método descrito por la casa comercial CHOPIN (CHOPIN Technologies, 2006) y que permite determinar el comportamiento de las masas a diferentes temperaturas cuando es sometido al proceso de amasado, calentado y enfriado. Se realizó el análisis para muestras con los siguientes porcentajes de sustitución de harina de camote: 0, 10, 15, 20 y 25 %, el porcentaje restante es harina de trigo, se analizó el comportamiento de las masas según los índices de absorción, amasado, gluten, viscosidad, amilazas y retrogradación

Evaluación de textura

La textura se analizó según los parámetros de dureza, trabajo de dureza terminado, deformación recuperable, trabajo total y masticabilidad del producto final de cada tratamiento mediante el TEXTUROMETRO PRO CT3 (BROKFIELD) durante 4 días.

Análisis sensorial

Se realizó una evaluación sensorial a un panel de catadores semientrenados, con el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION (XV) 16.1.15 y mejor tratamiento mediante el análisis sensorial, la evaluación de la textura se llevó a cabo en el software propio del equipo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas viscoelásticas

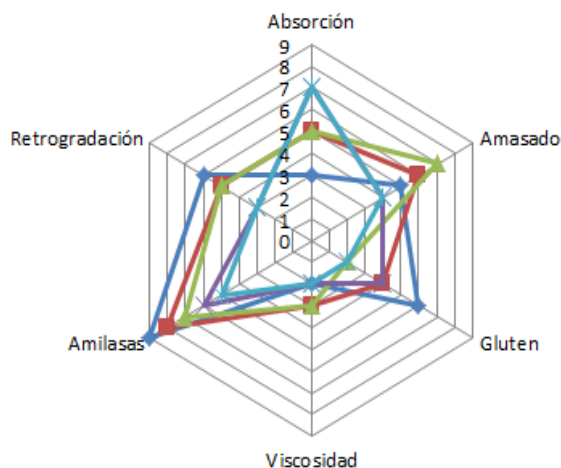


Figura 3. Resultados de los índices evaluados en el Mixolab para ● (0 % Harina de camote: 100 % harina de trigo), ■ (10 % Harina de camote: 90 % harina de trigo), ▲ (15 % Harina de camote: 85 % harina de trigo), X (20 % Harina de camote: 80 % harina de trigo), X (15 % Harina de camote: 75 % harina de trigo).

El potencial de hidratación de las harinas se ve reflejado en su capacidad de absorber agua hasta formar una masa viscoelástica; y registra valores de 7 a 8 en el índice de absorción (Lascano Sumbana, 2010). Lugo (2010) también menciona que la cantidad de agua añadida es el porcentaje de absorción de esa harina, este porcentaje es ligeramente superior al real debido a que los otros ingredientes influyen en la absorción final de la harina y es un parámetro que relaciona el rendimiento que tendrá dicha harina en máquina

y, por tanto, es un factor económico a tomar en cuenta. El índice de absorción de las diferentes mezclas de harinas varía según el porcentaje de sustitución. El valor de la harina de trigo sin mezcla de harina de camote es el que presenta un índice menor de absorción de agua, lo que indica que no se necesita mayor adición de agua para que se forme una masa viscoelástica, en comparación con las mezclas 90 HT - 10 % HC y 85 HT - 15 % HC que tiene un nivel intermedio y las mezclas 75 HT - 25 % HC y 80 HT - 20 %

HC son las que presentan un nivel más alto de absorción, es decir que para formarse una masa viscoelástica se necesita mayor cantidad de adición de agua.

Álvarez Pulluquitín (2012) confirma en su estudio de la elaboración de pan solo con harina de trigo los valores que obtiene para el índice de amasado son de 2 y 5, y estos índices de amasado de las harinas varían debido a la cantidad de gluten; puesto que a una mayor cantidad de proteína provoca mayor resistencia a la acción del amasado. La harina de trigo sin adición de harina de camote presenta un índice de amasado de 5 y junto con las mezclas de 90 - 10 %, 80 - 20 %, y 75 - 25 % (HT - HC) como indica la Figura 3 son harinas fuerte que son aptos para la elaboración de pan, la mezcla 85 - 15 % tiene un índice de amasado muy alto de 7 que tendrá una mayor estabilidad durante el amasado y las mezclas de 80 - 20 % y 75 - 25 % tienen menor estabilidad durante el proceso del amasado.

Un aumento de la temperatura de la masa trae una caída de la viscosidad. Es un movimiento entre las moléculas de gluteninas, cada una conectada con redes hidrofóbicas o hidrógenos. Estas redes tienen un valor de baja energía y pueden ser fácilmente rotas, moviendo por lo tanto la red de gluteninas antes de rebotar por otra parte. Este fenómeno se acelera con la temperatura; hace naturalmente caer la viscosidad entre 20 °C y 60 °C. Esta evolución modificará la elasticidad de la masa (CHOPIN Technologies, 2013).

El índice de gluten de la muestra sin adición de harina de camote presenta un valor de 6 siendo este el valor el más alto por poseer únicamente harina de trigo y por ende mayor cantidad de gluten. La sustitución de 90 - 10 % y 80 - 20 % (harina de trigo HT - harina de camote HC) presentan el valor más alto de todas las sustituciones con un valor de 4, y las dos mezclas restantes con un valor muy bajo de 2, las muestras que poseen un bajo contenido en gluten presentan menos resistencia a la presión y una disminución de la viscosidad, y por el contrario las mezclas que presentaron un índice mayor tiene una mejor estructura proteica por los enlaces de hidrógeno que se han formado.

Cuando la temperatura alcanza más de 50 - 60 °C la viscosidad de la masa aumenta muy rápido al compás del almidón que gelatiniza y de las proteínas que se desnaturalizan. La viscosidad máxima dependerá de 2 factores interdependientes: la gelatinización del almidón y los exógenos y endógenos ataques de enzimas amilasas (CHOPIN Technologies, 2013). Los índices de viscosidad en todas las muestras son bajos sin mucha diferencia pues en las mezclas 100 - 0 %, 90 - 10 % y 85 - 15 % (HT - HC) se tiene un valor de 3 y en las dos mezclas restantes (80 - 20 % y 75 - 25 %) un valor de 2, obteniendo

una masa no muy viscosa y al hidrolizarse el almidón las amilasas no llegan a su alcance máximo.

El índice amilásico será alto con una baja actividad amilásica (hipo diastásica) mientras que un bajo índice demostrará una actividad amilásica importante (hiper diastásica), un índice de 5 es para un trigo que no tiene una gran actividad diastásica, alrededor de 3 - 4, y por debajo de 2 la muestra está por seguro hiper diastásica (CHOPIN Technologies, 2013). La muestra sin ninguna mezcla tiene un índice muy alto de 9 con una actividad amilásica y por ende un índice de viscosidad baja, la mezcla 90 - 10 %, 85 - 15 %, 80 - 20 % y 75 - 25 % tienen un índice de 8, 7, 6 y 5 respectivamente, es decir aumenta la actividad amilásica mientras aumenta la mezcla de harina de trigo y camote.

El almidón tiene un papel crítico en el endurecimiento del pan. Cuando los panes bajan de temperatura después de la cocción, eso le da su firmeza a la miga. El gluten es también importante en esta fase, debido a su interacción conectándola con el almidón (CHOPIN Technologies, 2013). Mientras más alto es el índice de retrogradación menor será la vida útil del pan, en este caso la vida útil es inversamente proporcional a la mezcla realizada de harina de trigo y harina de camote pues va de 6, 5, 5, 3, 3 a 100 - 0 %, 90 - 10 %, 85 - 15 %, 80 - 20 % y 75 - 25 % de (HT - HC) respectivamente. Siendo las mezclas 80 - 20 % y 75 - 25 % los que poseen menor índice de retrogradación menor, y retardando la velocidad del envejecimiento del pan.

La sustitución de harina de camote para obtener un buen pan de características sensoriales aptas para el consumo se puede dar hasta en un 80 % de harina de trigo y 20 % harina de camote, ya que a mayor sustitución la harina no es apta para utilizar en panificación, se pierde la consistencia de: la masa, el volumen, contenido de proteína, más daño del almidón y disminuye la viscosidad de la masa, es decir la masa que se forma no es adecuada para la elaboración de un pan.

Análisis de textura

Se ensayó 8 diferentes concentraciones de sustitución de huevos y mucílago de chí, como se indicó en el diseño experimental.

Los tratamientos que se ensayaron fueron los siguientes: 20 y 40 % de mucílago de chí cada uno con 0, 20, 40, 60 % de huevos, estos porcentajes se encuentran dentro del 4 % de huevos que ocupa en la formulación general de la elaboración de pan, además se realizó un tratamiento testigo sin sustitución del mucílago de chí.

Tabla 2. Resultados de textura de cada tratamiento

Porcentaje de sustitución (mucilago de chía: huevos)	Dureza (N)	Trabajo de Dureza Terminado	Def. recuperable	Masticabilidad
20:00	20.5	170.4	4.62	161.4
20:20	48.09	302.9	6.12	221.05
20:40	22.48	119.8	5.23	129.9
0,875	22.48	87	4.51	99.1
40:00:00	18.48	319.1	6.66	372.9
40:20:00	69.58	90.89	5.21	247.8
40:40:00	58.96	128	5.28	110.5
40:60	18.04	131.7	5.17	75.3
Testigo	22.37	444	5.88	360.2

Según Luna-Fernández y Bárcenas-Pozos (2011), los gránulos de almidón son insolubles en agua, pero al ser calentadas a 55 - 60 °C estos absorben agua y se hinchan produciéndose un proceso llamado gelatinización, al disminuir esta temperatura el almidón gelatinizado disminuye y se forma una estructura más rígida con el paso del tiempo, porque la amilosa y amilopectina se reorganizan y comienzan a eliminar agua este proceso se denomina la retrogradación del almidón, la migración de agua que ocurre en el pan da lugar a ciertas características como la resequedad de la miga y la pérdida de la naturaleza crujiente de la corteza.

Lazaridou et al. (2007) han realizado diversas investigaciones para poder retardar este envejecimiento del pan utilizando varios hidrocoloides como: la pectina, la goma xantana, alginato de sodio, carboximetilcelulosa (CMC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), con los cuales se ha obtenido buenos resultados reduciendo la velocidad de envejecimiento, ya que entre los hidrocoloides y el almidón modifican la estructura e influyen en los procesos de gelatinización y retrogradación por ende en el envejecimiento del pan, mejora los parámetros tecnológicos y no afecta a los atributos sensoriales (Bárcenas y Rosell, 2007).

En la presente investigación se utilizó un hidrocoloide como es el mucílago de la chía obteniendo también buenos resultados, ya que en los análisis de perfil de textura se puede evidenciar que los tratamientos que poseen en su

formulación mayor cantidad de mucílago de chía retardan la velocidad de envejecimiento basados en que la dureza, trabajo de dureza, trabajo total, deformación recuperable y masticabilidad son mucho menores en relación a los tratamientos con menor cantidad de mucílago de chía y en relación al tratamiento testigo que no posee el mucílago en su formulación, siendo el tratamiento a1b3 (40 % de mucílago de chía y 60 % de huevos) el que en todos los parámetros presenta menor esfuerzo por lo tanto es menor su envejecimiento.

Análisis Sensorial

Para el análisis sensorial se utilizó una escala hedónica evaluando: color, apariencia, sabor, textura y aceptabilidad, considerando como 1 a la menor y 5 a la mayor calificación según el parámetro evaluado. El panel estuvo conformado por 84 catadores semientrenados los cuales evaluaron 3 tratamientos, se utilizó un diseño de bloques incompletos para evitar la fatiga en los consumidores, cada tratamiento se repitió 28 veces y el emparejamiento entre tratamientos 7 veces para así poder obtener resultados más confiables de los catadores.

A estos datos se realizó una prueba de ANOVA multifactorial para cada atributo y se obtuvo diferencia significativa, seguidamente se realizó una prueba de Fisher para poder elegir el mejor tratamiento

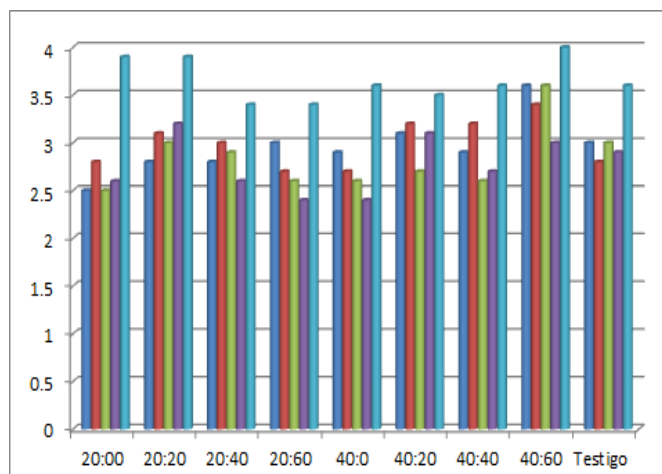


Figura 4. Resultados de las cataciones de pan con sustitución en porcentaje de mucílago de chíá por huevos: ■ Color, ■ Apariencia, ■ Sabor, ■ Textura, ■ Aceptabilidad.

Los tratamientos más aceptados por los consumidores en este caso por los catadores son el tratamiento (20 % mucílago de chíá y 20 % de huevos) y (40 % de mucílago de chíá y 60 % de huevos), este último tratamiento obtuvo el mayor promedio de evaluación en la mayoría de atributos evaluados, siendo este mediante la evaluación sensorial el mejor tratamiento.

4. CONCLUSIONES

Mediante un análisis del comportamiento viscoelástico de cada una de las masas utilizando sustituciones de 0, 10, 15, 20, 25 % de harina de camote con 100, 90, 85, 80, 75 % de harina de trigo respectivamente, teniendo como parámetros de evaluación los índices de absorción, amasado, gluten, viscosidad, amilasas y retrogradación. Se obtuvo que la sustitución de 80 % harina de trigo y 20 % harina de camote cumple con los parámetros necesarios para obtener harina panificable, ya que al sustituir 75 % harina de trigo y 25 % harina de camote presentaban muy bajo contenido de gluten, bajo contenido de proteína, una humedad demasiado alta y almidón dañado, es decir la sustitución hasta la que se puede realizar es de 80 % harina de trigo 20 % harina de camote.

Con el análisis de perfil de textura para cada tratamiento en los que se evaluó dureza, trabajo de dureza terminado, deformación recuperable, trabajo total y masticabilidad durante 4 días, se encontró una diferencia significativa en todos estos parámetros, indicadores de envejecimiento del pan van en aumento, sin embargo el tratamiento que supo mantener estas características en un valor promedio menor a los

demás y en los 4 días es el tratamiento fue el que es 40 % de mucílago de chíá y 60 % de huevos, comprobando que el mucílago de chíá siendo un hidrocoloide actúa retardando la velocidad en el envejecimiento del pan, además que este tratamiento mediante un análisis sensorial fue el más aceptado por el catador.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Álvarez Pulluquitín, M. A. (2012). *Utilización de mejoradores en la harina de trigo nacional (Triticum aestivum) para la elaboración de pan*. Tesis Grado, Universidad Técnica de Ambato, Ambato (Ecuador).
- Anónimo:. (2015). Gel de Chia mucílago excelente sustituto de la grasa en productos de panadería. Retrieved from <http://www.foodnewlatam.com/empresas/2-2-cereales-panaderia/3641-gel-de-chia-muc%C3%ADlago-excelente-sustituto-de-la-grasa-en-productos-de-panader%C3%ADa.html>
- Ayerza, A. y Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1366-1371. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669010003274>
- Bárceñas, M. E. y Rosell, C. M. (2007). Different approaches for increasing the shelf life of partially baked bread: Low temperatures and hydrocolloid addition. *Food Chemistry*,

- 100(4), 1594-1601. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.043>
- Boatella Riera, J., Codony Salcedo, R. y López Alegret, P. (2004). *Química y bioquímica de los alimentos II*. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Borneo, R., Aguirre, A. y Leon, A. E. (2010). Chia (*Salvia hispanica* L) gel can be used as egg or oil replacer in cake formulations. *J Am Diet Assoc*, 110(6), 946-949. doi: 10.1016/j.jada.2010.03.011
- CHOPIN Technologies. (2006). *Mixolab Applications Handbook. Rheological and Enzymatic Analysis* (Vol. 1). EE.UU.
- CHOPIN Technologies. (2013). Mixolab(R): Dominio de la Calidad de los Cereales, Harinas y Productos de Molienda. Solución completa para las industrias de primera transformación de los cereales. Concereal.es.
- Gallardo, C. (2015). Los Beneficios de la Chia. Retrieved from <http://www.vistazo.com/opinion/opini%C3%B3n-cora-gallardo/cora-gallardo/los-beneficios-de-la-ch%C3%ADa>
- Lascano Sumbana, A. V. (2010). *Estudio reológico de mezclas de harinas de cereales: cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), quinua (*Chenopodium quinoa*), trigo (*Triticum vulgare*) y tubérculo: papa (*Solanum tuberosum*) nacionales con trigo (*Triticum vulgare*) importado para orientar su uso en la elaboración de pan y pastas alimenticias*. Tesis Grado, Universidad técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N. y Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1033-1047. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.03.032>
- Lugo, B. (2010). El Pan Tiene su Ciencia. *Revista Venezolana de la Industria de la Panificación*.
- Luna-Fernández, M. y Bárcenas-Pozos, M. E. (2011). Envejecimiento del pan: causas y soluciones. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(2), 40-53. doi: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-2/TSIA-5\(2\)-Luna-Fernandez-et-al-2011.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-2/TSIA-5(2)-Luna-Fernandez-et-al-2011.pdf)
- Muñoz Hernández, L. (2012). *Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica*) : microestructure, physico-chemical characterization and applications in food industry*. Tesis Doctoral, Pontifica Universidad Catolica de Chile, Santiago de Chile (Chile).

Capacidad biocida de la aleación de aluminio 6063-T5 como material de construcción de asideros en autobuses en la Provincia de Tungurahua

Biocidal capacity of 6063-T5 aluminum alloy as construction material for railings in buses in the Province of Tungurahua

M. Córdova-Suárez¹; J. Martínez ²; E. Garcés-Sánchez¹

¹Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Av. Los Chasquis y Payamino, Ambato – Ecuador

²Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Civil y Mecánica, Av. Los Chasquis y Payamino, Ambato – Ecuador

Artículo recibido: 30/09/2017

Artículo aceptado: 16/11/2017

RESUMEN

La industria carrocería, asentada en la provincia de Tungurahua, se consolida como la más fuerte en la región, en la actualidad se encuentra conformada por 80 empresas grandes y pequeñas, dedicadas a la fabricación de carrocerías, que se han preocupado en mejorar su tecnología y productividad. Por ello, el presente estudio tuvo la finalidad de determinar la actividad bactericida de la aleación de aluminio 6063-T5 utilizada en la fabricación de pasamanos de buses y compararla con la contaminación biológica generada en materiales alternativos como aluminio 6063-T5 no anodizado, aleación aluminio 6061-T6, cobre (Cu), bronce dulce, aleación cobre-aluminio (Al-Cu), aleación plata 925, oro 18 quilates, acero con recubrimiento polimérico, acero inoxidable 304 austenítico, acero inoxidable 304, aluminio con pinturas antibacteriales, para lo cual se realizaron ensayos microbiológicos en ambientes controlados con probetas metálicas de cada material.

Para el análisis microbiológico se analizaron 12 probetas (muestras metálicas) de dimensión 0,5x2 cm, dichas muestras fueron inoculadas por difusión en placa en agar nutritivo y conteo de colonias microbianas. En el análisis se determinó que el aluminio 6063-T5 no es recomendable como materia prima para la fabricación asideros (pasamanos), sin embargo, las aleaciones de cobre con un porcentaje en su composición química de hasta el 60 % Cu, presentaron mejor capacidad biocida que el aluminio y acero inoxidable.

Palabras Clave: cobre, difusión en placa, microorganismos, bactericida, pasamanos.

ABSTRACT

The bodybuilder industry, based in the province of Tungurahua, is consolidated as the strongest in the region, currently is made up of 80 large and small companies, dedicated to the manufacture of bodies, which have been concerned with improving their technology and productivity. Therefore, the present study aimed to determine the bactericidal activity of the 6063-T5 aluminum alloy used in the manufacture of bus rails and compare it with the biological contamination generated in alternative materials such as non-anodized aluminum 6063-T5, aluminum alloy 6061-T6, copper (Cu), sweet bronze, copper-aluminum alloy (Al-Cu), 925 silver alloy, 18 carat gold, polymer coated steel, 304 austenitic stainless steel, 304 stainless steel, antibacterial which were microbiological tests in controlled environments with metal specimens of each material.

For the microbiological analysis, 12 specimens (metal samples) with a dimension of 0.5x2 cm were analyzed. These samples were inoculated by plaque diffusion on nutritive agar and microbial colonies. In the analysis, it was determined that aluminum 6063-T5 is not recommended as a raw material for manufacturing handrails (handrails), however, copper alloys with a percentage in their chemical composition of up to 60% Cu, presented better biocidal capacity than aluminum and stainless steel.

Keywords: copper, plate diffusion, microorganisms, bactericide, handrails.

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

1. INTRODUCCIÓN

Según la Cámara Nacional de Fabricantes de Carrocerías (CANFAC 2014), el 63 % de la producción carrocera del Ecuador se localiza en la ciudad de Ambato, lo que genera 1400 plazas de trabajo a nivel nacional, produciendo en promedio 127 carrocerías mensuales.

Las carrocerías de buses intraprovinciales e interprovinciales utilizan para la fabricación de pasamanos aluminio 6063-T5 cumpliendo lo que recomienda la norma RTE INEN 043 (2010a), además, se ha evidenciado que esta aleación presenta una porosidad considerable que permitiría la acumulación microbiana en las superficies, esta acumulación de microorganismos, puede convertirse en un foco infeccioso para el contagio de enfermedades en los usuarios de los buses.

La aleación de aluminio 6063 posee gran facilidad de extrusión, obtiene características mecánicas adecuadas, un correcto aspecto de superficie y buen coloreado. Al anodizarse tiene múltiples aplicaciones. El aluminio aleación magnesio silicio 6063 se utiliza en perfiles de carpintería metálica, manillas, pomos, herrajes, sillas de terraza, campo y playa (Broncesval, 2017).

Los tipos de aceros inoxidables utilizados son aleaciones de hierro con un mínimo de un 10,5% de cromo, su principal característica se consigue mediante la película adherente e invisible de óxido de cromo. La aleación 304 es un acero inoxidable austenítico de uso general con una estructura cúbica de caras centradas, este material esencialmente es no magnético en estado recocido, una de las desventajas que presenta el acero es su porosidad, debido a que, gracias a esta los microorganismos pueden acumularse en su superficie (GoodFellow, 2017). En la actualidad existen estudios que muestran que la acción bactericida de las superficies de cobre en pasamanos de buses ejerce la misma eficacia a diferentes temperaturas (22-35 °C) y en diferentes condiciones de humedad relativa de aire (rangos de 20 % y 90 %). Sin embargo, existen otros metales como la plata, que también tiene propiedad bactericida, pero solamente es activo en ambientes de temperatura elevada (35 °C) y alta humedad (90 %) (Michels et al., 2009). La capacidad biocida de un material metálico se define como la capacidad de actuar a nivel de la membrana celular del microorganismo, provocando la lisis de la pared proteica o lipoproteica del organismo, penetrando en su interior interrumpiendo las reacciones bioquímicas que sostienen la vida en el organismo (Sánchez-Fortún y Barahona, 2002).

Por lo mencionado el estudio de aleación aluminio 6063-T5 utilizado para la fabricación de pasamanos de buses tiene como finalidad comprobar la propiedad antimicrobiana de este con la generada por materiales alternativos.

2. METODOLOGÍA

2.1 Muestras metálicas (probetas)

Se consideraron 12 tipos de metales que se pueden utilizar para la fabricación de pasamanos de los buses urbanos en la ciudad de Ambato entre estos metales se encontraron: aluminio 6063-T5, aluminio 6063-T5 no anodizado, aluminio 6061-T6, cobre, bronce dulce, aleación cobre-aluminio, plata 9.25, oro 18 quilates, acero con recubrimiento polimérico, acero inoxidable 304 austenítico, acero inoxidable 304, aluminio con pinturas antibacteriales.

2.2 Preparación de las muestras

Se tomaron muestras de 0,5x2 cm de cada tipo de metal (probeta), para llevar la posterior evaluación en ambientes controlados.

2.3 Análisis microbiológicos

Las probetas de cada metal fueron sometidas a las condiciones antisépticas (exposición a microorganismos) que los pasamanos de los buses están expuestos diariamente, este acondicionamiento se dio con la finalidad de conseguir resultados más reales. En 12 tubos de ensayo con tapa rosca, se colocaron 10 ml de solución de agua peptonada al 1 % y las probetas de cada metal, estos tubos fueron incubados por 48 horas a 27 °C (temperatura de buses). De estas muestras fueron inoculados 0,1 ml en cada caja Petri, basándose en la técnica difusión en placa, dichas cajas fueron incubadas por 24 horas a 27°C (Santambrosio et al., 2009)

El conteo microbiano se realizó en todas las muestras observadas, debido a que, ninguna de ellas presentó crecimiento mayor a 300 colonias, sin embargo, en algunos casos no existió crecimiento. Con el número de colonias microbianas se determinó las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por cada ml inoculado, lo que permitió determinar el tipo de metal con propiedad inhibitoria para el crecimiento microbiano. Para la determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se utilizó la ecuación 1.

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\# colonias * f}{VD} \quad Ec.1$$

Donde:

UFC/ml = Unidad Formadora de Colonia por volumen de dilución.

f = factor de dilución.

colonias = células viables contadas en la caja Petri.

VD = volumen de inoculación

2.4 Tabulación e interpretación de resultados

Los resultados obtenidos del conteo de placas se graficaron en curvas comparativas entre los UFC/ml y los tipos de materiales metálicos analizados. Las gráficas resultantes permitirán apreciar la capacidad biocida de los materiales, posteriormente se determinará el material con mejor capacidad (menor cantidad de UFC/ml) y se recomendará para su uso en la fabricación de asideros de buses.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Datos de colonias obtenidas de las probetas analizadas.

Materiales	Crecimiento microbiano		Actividad bactericida
	Colonias	UFC/ml	
Acero inoxidable 304	2	20	SI
Acero Inoxidable 304 austenítico	13	130	NO
Acero con recubrimiento polimérico	9	90	NO
Aluminio 6061-T6	4	40	NO
Aluminio 6063-T5	4	40	NO
Aluminio 6063-T5 no anodizado	10	100	NO
Aluminio con pintura	4	40	NO
Aleación plata 925	15	150	NO
Aleación cobre-aluminio	2	20	SI
Bronce dulce	2	20	SI
Cobre	4	40	NO
Oro 18 k	10	100	NO

Figura 2. Colonias microbianas en cada probeta metálica analizada

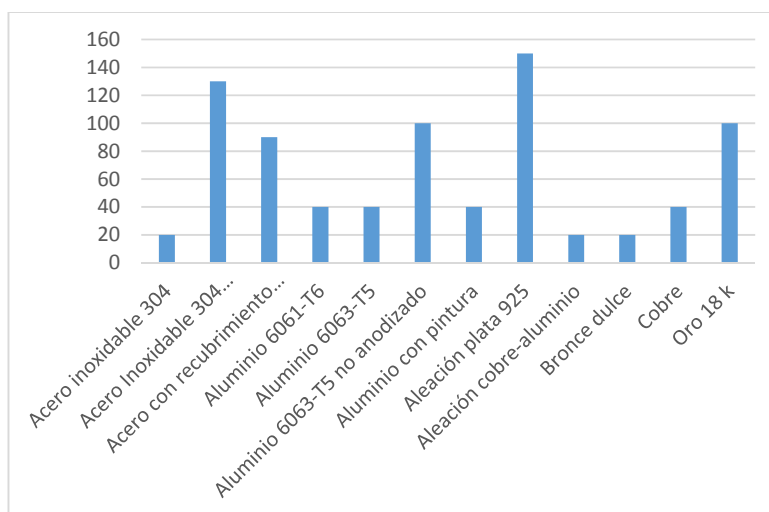


Figura 2. Presencia de colonias (UFC/ml) en cada probeta metálica analizada

Capacidad biocida de la aleación de aluminio 6063-T5 como material de construcción de asideros en autobuses en la Provincia de Tungurahua

Biocidal capacity of 6063-T5 aluminum alloy as construction material for railings in buses in the Province of Tungurahua

El estudio microbiológico realizado al aluminio 6063-T5 y a los otros metales, para la determinación de acción bactericida fue realizado con la inoculación de las muestras con la técnica de difusión en placa. Los resultados obtenidos de este estudio se presentan en la tabla 1, donde se aprecia el número de colonias con sus respectivas unidades formadoras de colonias por cada ml inoculado, los análisis microbiológicos empleados a las probetas, no mostraron si los organismos encontrados fueron patógenos.

Bajo las condiciones controladas de un laboratorio la aleación plata 925 presentó mayor crecimiento microbiano, seguido de acero inoxidable 304 austenítico, aluminio 6063-T5 no anodizado y acero con recubrimiento polimérico, esto indicó que estos materiales no poseen acción bactericida. Sin embargo, la aleación de cobre-aluminio, bronce dulce y acero inoxidable 304, presentaron menor crecimiento microbiano, lo que permite asumir que tienen propiedad bactericida.

En el caso de las aleaciones de plata 925 y el aluminio con pintura antibacterial, la bibliografía consultada menciona que el crecimiento de microorganismos en ellos debe ser bajo, casi nulo, sin embargo, para las pruebas realizadas dieron resultados muy altos en crecimiento microbiano. Por ello, es presumible asumir que en el caso del aluminio con pintura antibacterial una mala preparación de la misma pudo ser la responsable de mencionado resultado. En el caso de la aleación de la plata 925 la baja presencia de cobre (7,5

%) no presenta el impacto nocivo para los microorganismos presentes en la superficie de esta aleación.

El cobre es un material con grandes propiedades bactericidas, que podría ser utilizado en la fabricación de pasamanos de buses, en instrumental hospitalarios, entre otras utilidades que se le puede dar a este metal. Como lo mencionan estudios realizados al cobre como material para la fabricación de instrumental hospitalario, el cobre tiene una capacidad bactericida capaz de eliminar 99,9 % de bacterias en dos horas, evitando la acumulación la propagación de enfermedades. En el caso de aluminio e incluso plata, los mismos estudios revelaron que superficies creadas con estos materiales, estaban altamente contaminadas con colonias microbianas, por ello, en algunos hospitales y transportes europeos han cambiado la materia prima de fabricación de estos elementos por aleaciones con cobre o cobre solo (International Copper Association 2015).

En la figura 1 se aprecia la relación existente entre microorganismos y el tipo de material, dicha relación va desde 0 a 15, este rango indicó el número de colonias que crecieron durante las

24 horas de incubación de las placas, siendo la aleación de plata 925 la que mayor crecimiento presentó (no tiene capacidad biocida). Cada caja Petri en la que se inoculó la muestra contenía 30 ml de agar nutritivo, este agar cumplió con la función de proveer nutrientes a los microorganismos, no se utilizó un medio selectivo, debido a que, no se conocía el tipo de microorganismos que se desarrollarían y porque el análisis que se llevó a cabo no fue para determinar el tipo de microorganismos, sino, para determinar solo el crecimiento de ellos.

En la figura 2 se muestra la relación con las unidades formadoras de colonia, estas UFC fueron determinadas con la aplicación de la ecuación 1, teniendo como factor de dilución 1 debido a que, se partió de la solución madre (100) y el volumen de inoculación fue de 0,1 ml.

4. CONCLUSIONES

La investigación realizada a la aleación de aluminio 6063-T5 anodizado utilizado en la fabricación de pasamanos de buses presentó uno de los niveles más altos en unidades formadoras de colonias (UFC/ml), lo que evidenció que no posee propiedad bactericida, por lo que, no es recomendable su utilización en la fabricación de pasamanos. A pesar de que la plata es un material recomendado por su capacidad biocida, en este estudio no presentó dicha propiedad, presumiblemente esto se debió a que, la cantidad de cobre (7,5 %) presente en la aleación de plata 925, fue mínima como para que inhibiera el crecimiento microbiano.

Los materiales con propiedades antimicrobianas fueron cobre (Cu) y bronce dulce, estos materiales son recomendados para la fabricación de pasamanos en los buses. El recubrimiento polimérico y el acero inoxidable mencionados en la norma INEN 043 (2010a) e INEN 2205 (2010b) tampoco presentaron propiedades antimicrobianas por lo que se recomienda la sustitución de estos por aleaciones de cobre.

Al finalizar este análisis de los materiales metálicos, se recomienda realizar un estudio fenotípico y genotípico de las colonias de microorganismos localizadas en las probetas metálicas.

REFERENCIAS

Broncesval. (2017). Aluminio Aleación Magnesio Silicio 6063. Retrieved 23/05/2017, from <http://www.broncesval.com/productos/aluminio/93-aluminio-aleacion-magnesio-silicio-6063>

CANFAC (2014). Diagnóstico sector carroceros a nivel nacional. Retrieved 23/05/2017, from <http://canfacecuador.com/Informe-Final-Diagnostico-Sector-Carroceros.pdf>

GoodFellow. (2017). Acero Inoxidable-AISI 304 (Fe(Cr 18/Ni10) - Información sobre el material. Retrieved 23/05/2017, from <http://www.goodfellow.com/S/Acero-Inoxidable-AISI-304.html>

INEN (2010a). Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 043 (2R): Vehículos de transporte público de pasajeros intraregional, interprovincial e intraprovincial (pp. 7). Quito (Ecuador): Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.

INEN (2010b). Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 2205: Vehículos Automotores. Bus Urbano. Requisitos. (pp. 24). Quito (Ecuador): Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.

International Copper Association (2015). Antimicrobial Copper Cu⁺. Retrieved 20/05/2017, from <http://www.antimicrobialcopper.org/es/eficacia-antimicrobiana>

Michels, H. T., Noyce, J. O. y Keevil, C. W. (2009). Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Letters of Applied Microbiology*, 49(2), 191-195. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02637.x

Sánchez-Fortún, S. y Barahona, M. V. (2002). *Riesgo toxicológico medioambiental de compuestos activos utilizados para la desinfección de torres de refrigeración* (Complutense Ed.).

Santambrosio, E., Ortega, M. y Garibaldi, A. (2009). Siembra y recuento de microorganismos.: Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Rosario.

Aplicación del proceso foto-Fenton solar para la recuperación del cloroformo residual obtenido luego de la realización del ensayo de cadmio (método HACH 8017)

Application of the solar photo-Fenton process for the recovery of residual chloroform obtained after the cadmium assay (HACH Method 8017)

M. Córdova-Suárez* ; A. Rivadeneira

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

Artículo recibido: 30/09/2017

Artículo aceptado: 16/11/2017

RESUMEN

La aplicación de métodos de degradación de residuos líquidos tóxicos generados en los laboratorios permite eliminarlos, reutilizarlos y reducirlos. Por ellos la presente investigación tuvo como finalidad estudiar la recuperación del cloroformo residual obtenido luego de la realización del ensayo de cadmio (Método HACH 8017) en el Laboratorio de Control de Calidad de la Empresa Pública-Empresa Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Ambato (EP-EMAPA-A) mediante la aplicación del proceso Foto-Fenton solar. Las muestras utilizadas contenían una mezcla del residuo-agua en relación 1:3. Se ensayaron diferentes volúmenes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y concentraciones de ión ferroso [Fe^{2+}]. La relación óptima de H_2O_2/Fe^{2+} se determinó por cromatografía de gases al analizar el cloroformo recuperado después de la aplicación del proceso oxidativo. Los valores correspondientes a la relación óptima fueron 0,075 ml/27,563 mg para H_2O_2 y Fe^{2+} respectivamente. Lográndose un porcentaje en área de cloroformo del $100,0 \pm 0,0\%$ y una probabilidad de que la muestra leída estaba constituida por cloroformo del $93,45\% \pm 2,05\%$. Aplicando esta relación óptima en el proceso Foto-Fenton solar se alcanzó una remoción de cadmio del 96,4%. Al correr el ensayo de cadmio con el cloroformo recuperado frente a un material de referencia (Trace Metals 1-WS, Fluka Analytica) se obtuvo una lectura de 28,2 mg Cu/L, valor establecido dentro de los valores certificados del análisis correspondiente a $28,1 \pm 0,4$ mg Cu/L.

Palabras clave: Foto-Fenton solar, peróxido de hidrógeno, ión ferroso, cadmio, HACH 8017, análisis de agua, Laboratorio de Control de Calidad EP-EMAPA-A.

ABSTRACT

The application of toxic liquid waste degradation methods generated in the laboratories allows to eliminate them, to reuse them and to reduce them. The aim of the present study was to study the recovery of residual chloroform obtained after the cadmium test (HACH Method 8017) in the Laboratory of Quality Control of the Public Company-Municipal Drinking Water and Sewerage Company of Ambato (EP-EMAPA-A) by applying the solar Photo-Fenton process. The samples used contained a mixture of residue-water in 1:3 ratio. Different volumes of hydrogen peroxide (H_2O_2) and ferrous ion concentration [Fe^{2+}] were applied. The optimum H_2O_2/Fe^{2+} ratio was determined by gas chromatography analyzing the chloroform recovered after the application of the oxidative process. The values corresponding the optimum ratio were 0,075 mL/27,563 mg for H_2O_2 and Fe^{2+} respectively. Reaching a percentage of chloroform area of $100.0 \pm 0.0\%$ and a probability that the sample read was constituted by chloroform of 93.45 ± 2.05 . Applying this optimum ratio in the solar Photo-Fenton process, a 96.4% cadmium removal was achieved. When the cadmium test was run with chloroform recovered against a reference material (Trace Metals 1-WS, Fluka Analytica) a reading of 28.2 mg Cu / L was obtained, established value within the certified values of the analysis corresponding to 28.1 ± 0.4 mg Cu / L.

Keywords: Photo Fenton solar, chloroform, hydrogen peroxide, ferrous ion, cadmium, HACH 8017, water analysis, quality control laboratory EP-EMAPA-A.

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

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los residuos líquidos generados en laboratorios muestran características de elevada peligrosidad, variedad y volúmenes reducidos, esto complica su gestión en relación a los residuos de origen industrial. Se considera a un residuo de laboratorio toda sustancia que presente propiedades tóxicas y peligrosas, constituyendo su inadecuado almacenamiento un riesgo potencial hacia las personas relacionadas con el laboratorio. Se debe considerar para efectos de seguridad y económicos la búsqueda de alternativas que permitan la minimización de generación de residuos, la reutilización y reciclaje de productos cuando sea posible (INSHT 2004).

El artículo 176 de la Constitución de la República del Ecuador, establece que los residuos generados por actividades realizadas en laboratorios, centros de investigación y unidades educativas, deben ser gestionados de manera que no generen contaminación ambiental, en especial aquellos considerados como peligrosos, como en el caso del cloroformo (Ministerio del Ambiente, 2017).

Los progresos en el conocimiento de metodologías para el tratamiento de efluentes y aguas residuales, han permitido el desarrollo de alternativas denominadas procesos avanzados oxidativos (PAOs). Entre las PAOs más empleadas se encuentran: ozono (O_3)-UV, peróxido de hidrógeno (H_2O_2)-UV, dióxido de titanio (TiO_2)-UV y Foto-Fenton solar (Peras *et al.*, 2004). El proceso Foto-Fenton solar constituye una opción económica y eficiente para la degradación de una gran variedad de compuestos como: efluentes de curtiembre (Karthikeyan *et al.*, 2012), colorantes generados en la industria alimentaria (Ignachewsky *et al.*, 2010), aceites (Arvanitoyannis *et al.*, 2007), compuestos fenólicos (Basheer Hasan *et al.*, 2012), efluentes textiles (Pey Clemente, 2008), compuestos clorados (Valero Lázaro, 2011), mezclas de anaranjado de metilo y cadmio (Visa y Duta, 2013).

2. METODOLOGÍA

2.1. Aplicación del Proceso Foto-Fenton solar para la purificación del cloroformo residual

Para llevar a cabo el proceso Foto-Fenton solar se utilizó un matraz de 500 ml como reactor con un agitador magnético, sobre una plancha de calentamiento y como fuente de radiación UV se empleó la luz solar (Blanco, 2009).

Se utilizaron alícuotas de 150 ml (50 ml de residuo cloroformo-complejo cadmio ditizona y 100 ml de agua destilada). El proceso se realizó a una temperatura de 30 °C (Torrades *et al.*, 2004), pH de 2,8 (Pignatello *et al.*, 2006), velocidad de agitación de 700 rpm y tiempo de reacción de 40 minutos.

2.2. Acidificación

La mezcla de reacción se acidificó a pH 2,8 con H_2SO_4 (ácido sulfúrico) 6N (Blanco, 2009). Para desestabilizar el complejo cadmio ditizona, logrando la liberación de Ca^{2+} y ditizona (Cela Torrijos y Pérez-Bustamante, 1979).

2.3. Reacción de oxidación

Se agregaron diferentes cantidades de Fe^{2+} (catalizador) y H_2O_2 (agente oxidante) a la mezcla residuo/agua destilada. El ion hierro fue agregado en forma de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato ferroso heptahidratado) con una pureza del 98%. Durante la reacción de oxidación se logró la mineralización del cadmio formando $Cd(OH)_2$ (hidróxido de cadmio) y la oxidación de la ditizona hasta la liberación de CO_2 (anhídrido carbónico) y H_2O .

En la Tabla 2 se presentan los valores correspondientes a las cantidades de peróxido de hidrógeno y hierro (II) establecidos bibliográficamente para un volumen de muestra de 1000 ml. Mientras que la Tabla 3 muestra los valores ensayados experimentalmente para un volumen de 150 ml de muestra.

Tabla 1. Valores para la aplicación del proceso Foto-Fenton solar para la purificación de cloroformo con un volumen de muestra de 1000 ml.

$[H_2O_2]$ (ml)	$[H_2O_2]$ (mg)	$[Fe^{2+}]$ (mg)	$[FeSO_4 \cdot 7H_2O]$ (mg)
0,5	735	122,5	597,62
1	1470	183,75	896,44
1,5	2205	367,5	1792,88

Fuente: Valero Lázaro (2011).

Aplicación del proceso foto-fenton solar para la recuperación del cloroformo residual obtenido luego de la realización del ensayo de cadmio (método HACH 8017)

Application of the solar photo-fenton process for the recovery of residual chloroform obtained after the cadmium assay (HACH Method 8017)

Tabla 2. Valores ensayados en la aplicación del proceso Foto-Fenton solar para la purificación de cloroformo con un volumen de muestra de 150 ml.

[H ₂ O ₂] (ml)	[H ₂ O ₂] (mg)	[Fe ²⁺] (mg)	[FeSO ₄ .7H ₂ O] (mg)
0,075	110,25	18,38	89,64
0,15	220,50	27,56	134,47
0,225	330,75	55,13	268,93

2.4. Neutralización y decantación

Al finalizar la reacción se observó la presencia de dos fases: una acuosa que contenía al cadmio y ditizona oxidados y otra orgánica que contenía al cloroformo. Para precipitar al catalizador metálico (Fe²⁺) se ajustó el pH a 7,5 empleando hidróxido de potasio 6N e hidróxido de sodio 0,1N. Se decantó la mezcla y se procedió a filtrar tres veces consecutivas, utilizando papel filtro con tamaño de poro de 15 µm.

2.5. Determinación de cloruros

La determinación de cloruros se realizó en la fase acuosa para verificar el mecanismo de degradación de parte del cloroformo generando cloruros (Cl⁻). Se empleó el método HACH 8113 para el espectrofotómetro DR6000. Se llenaron dos celdas cuadradas una con 10 ml de muestra y otra con 10 ml de agua destilada, en cada celda se añadieron con ayuda de una micropipeta 0,8 ml de solución de tiocianato mercúrico, se agitó la mezcla, a continuación, se añadieron 0,4 ml de solución de ion hierro en la mezcla y se agitó. Se dejó reaccionar la mezcla por 2 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura. Los resultados fueron expresados mg/L Cl⁻ (HACH 2003).

2.6. Cuantificación del cloroformo residual recuperado

El cloroformo recuperado fue cuantificado por cromatografía de gases, se usó el equipo GC System, 7890B, Autosample, 7693 con el software MassHunter Workstation Software (Agilent, Santa Clara, CA). Las condiciones en las que se corrió la cromatografía fueron:

- Volumen de inyección: 0,1 µL
- Número de lavados con solvente (cloroformo puro): 3
- Número de lavados con muestra (cloroformo recuperado): 3
- Temperatura de inyección: 80°C
- Columna seleccionada: Detector de masa
- Temperatura del horno:
 - 150 °C por 27 minutos
 - 250 °C por 5 minutos.
- Temperatura máxima del horno: 260 °C.
- Número de lavados con cloroformo nuevo: 3.
- Número de lavados con la muestra: 3.

El cloroformo se cuantificó mediante la comparación entre los porcentajes de cloroformo de los compuestos presentes en la muestra y bases de datos almacenadas en el equipo. Después de la cuantificación del cloroformo recuperado se determinó la mejor relación Fe²⁺/H₂O₂ en función del porcentaje de cloroformo de cada muestra. En base a esta relación óptima se corrió nuevamente el proceso Foto-Fenton solar para la recuperación de la totalidad del cloroformo residual obtenido luego de la realización del ensayo de cadmio en el Laboratorio de Control de Calidad de EP-EMAPA-A.

2.7. Análisis de cadmio con horno de grafito

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica equipado con un atomizador de horno de grafito PG-INSTRUMENT – AA500.

Tabla 3. Valores ensayados en la aplicación del proceso Foto-Fenton solar para la purificación de cloroformo.

Parámetros de análisis	Cadmio
Línea analítica	228,8 nm
Banda ancha	0,4 nm
Factor de filtro	0.1
Corriente de la lámpara	5,0 mA
Tiempo de integración	3,0 s
Fondo/ambiente	D2
Tipo de grafito	Plataforma recubierta
Tamaño de la muestra	10 µl
Rango de trabajo	0,1 – 6 ng/ml

2.8. Determinación del porcentaje de remoción de cadmio

Para la determinación del porcentaje de remoción de cadmio se cuantificó por absorción atómica la concentración del metal antes y después del proceso Foto-Fenton solar con la mejor relación $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Se utilizó el equipo de absorción atómica (PG Instrument, n.d) los resultados obtenidos fueron reportados en µg/L.

2.9. Realización del ensayo de Cadmio (Método HACH 8017)

Fue necesaria la realización del ensayo de cadmio (Método HACH 8017) debido a que la EP-EMAPA-A utiliza este método para la determinación de cadmio. Se realizó empleando una muestra de agua destilada y se realizaron cinco ensayos, uno con el cloroformo nuevo (patrón), tres con el cloroformo recuperado y purificado y un ensayo adicional frente a un material de referencia (Trace Metals 1-WS, Fluka Analytica). Para la preparación del material de referencia se empleó el procedimiento detallado en el Certificado de Análisis Trace Metals 1-WS.

Para lo cual se colocaron en un balón de 250 ml, 0,25 ml de HNO_3 (ácido nítrico) grado metales traza, seguido de 2,5 ml de la ampolla QC 1488 Metals y se aforó con agua destilada. El valor obtenido después de la realización del ensayo de

cadmio debía estar situado entre los valores $28,1 \pm 0,400$ µg/L con un límite de aceptación entre 22,5 y 33,7 µg/L. Para la realización del ensayo de cadmio se aplicó el método HACH 8017, para ello se seleccionó el programa 60 Cadmio, Dithizona en el espectrofotómetro DR6000 considerando que el equipo trabaja con una longitud de onda de 190 a 1100 nm.

2.10. Procesamiento y análisis de resultados

Para la determinación del mejor tratamiento para la recuperación de cloroformo se emplearon Tablas de Análisis de Varianza (ANOVA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de cloruros

La determinación de cloruros se realizó en la fase acuosa obtenida después de la realización del proceso Foto-Fenton solar con el fin de verificar el mecanismo de degradación de cloroformo y su liberación en forma de cloruros.

En la tabla 4 se muestran las cantidades de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e ión hierro II (Fe^{2+}) aplicadas para cada tratamiento y los valores obtenidos en la cuantificación de cloruros (Cl^-) por espectrofotometría y el porcentaje de volumen recuperado después de la aplicación del proceso Foto-Fenton solar.

Tabla 4. Determinación de cloruros y porcentaje de reducción del volumen de cloroformo después de la realización del proceso Foto-Fenton solar.

Tratamiento	ml H ₂ O ₂ ; mg Fe ²⁺	Cloruros mg/L	%Recuperación CH ₃ -Cl
1	0,075; 18,375	139,3±1,1	77±1,41
2	0,075; 27,563	542,6±0,4	64±0,00
3	0,075; 55,125	2402,9±0,4	71±0,00
4	0,150; 18,375	77,7±0,2	78±0,00
5	0,150; 27,563	268,1±0,2	68±0,00
6	0,150; 55,125	1614,4±0,1	51±0,00
7	0,225; 18,375	218,5±0,2	72±0,00
8	0,225; 27,563	295,1±0,2	64±0,00
9	0,225; 55,125	1609,9±0,2	66±0,00

Los valores de cloruros y porcentaje de recuperación de cloroformo representan los promedios obtenidos de las dos réplicas aplicadas $\pm$ la desviación estándar entre ellas. El volumen de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y la masa de ion ferroso (Fe²⁺) se establecieron considerando un volumen de 150 ml de mezcla.

En base a los valores obtenidos en la cuantificación de cloruros y volumen de recuperación de cloroformo se evidenció que el mejor tratamiento fue el número cuatro debido a la menor degradación de cloroformo, en forma de cloruros (Cl⁻). Pese a que hasta este punto el tratamiento cuatro era el óptimo estos parámetros no eran suficientes puesto que no brindaban una cuantificación exacta del cloroformo contenido en cada muestra.

Los resultados obtenidos en cuanto al volumen de recuperación de cloroformo son semejantes a los obtenidos en el estudio realizado por Valero Lázaro (2011) en el cual se obtuvo un porcentaje de reducción cloroformo del 45 % y una recuperación del 55 % con la aplicación del proceso Foto-Fenton solar con las mismas condiciones de ensayo.

3.2. Cuantificación del cloroformo residual recuperado

Se consideraron como respuestas experimentales al porcentaje en área de cloroformo y el

porcentaje de probabilidad de que el compuesto detectado era cloroformo. Para las dos respuestas se corrió un diseño factorial AxB con un nivel de confianza del 95 % y la prueba de comparación múltiple de Tukey para establecer el tratamiento óptimo. El porcentaje en área de cloroformo arrojó cuatro tratamientos óptimos (dos, tres, cuatro y cinco), siendo este parámetro insuficiente para la selección de un solo tratamiento óptimo. Por tal motivo se optó por realizar un análisis comparativo entre los valores de porcentaje de probabilidad de cloroformo, obtenidos por comparación entre la composición de las muestras y la librería almacenada en el software propio del cromatógrafo de gases. El análisis estadístico indicó que el tratamiento óptimo fue el tratamiento número dos, con un volumen de 0,075 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 27,563 mg de ion ferroso (Fe²⁺).

En la tabla 5 se muestran los valores del porcentaje en área de cloroformo y el porcentaje de probabilidad para cada tratamiento.

Tabla 5. Porcentaje en área de cloroformo y porcentaje de probabilidad de cloroformo después de la realización del proceso Foto-Fenton solar.

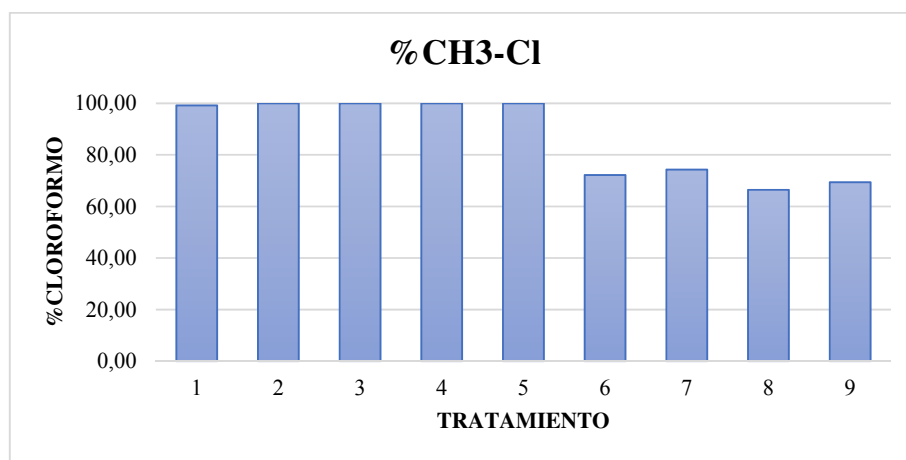
Tratamiento	%CH ₃ -Cl	%Prob. CH ₃ -Cl
1	99,22±1,11 A	89,15±5,75 A
2	100,00±0,00 Aa	93,45±2,05 Aa
3	100,00±0,00 Aa	92,15±1,77 A
4	100,00±0,00 Aa	92,25±1,20 A
5	100,00±0,00 Aa	92,35±2,62 A
6	72,20±1,52 BC	89,95±3,89 A
7	74,33±0,98 B	90,50±1,27 A
8	66,48±0,03 C	86,35±6,29 A
9	69,43±1,05 CD	91,60±0,71 A

Los valores de porcentaje en área de cloroformo y probabilidad de cloroformo corresponden al promedio entre las lecturas de las dos réplicas y su respectiva desviación estándar. Las letras A, B, C y D indican para cada respuesta experimental, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados. Las letras a indican los tratamientos óptimos para cada respuesta experimental.

En los tratamientos en los que no se obtuvo un porcentaje en área del 100 % correspondiente a cloroformo, se debió a que las condiciones ensayadas para dichos tratamientos en la aplicación del proceso Foto-Fenton solar no fueron las óptimas para la purificación del cloroformo, generando intermediarios del

cloroformo (diclorometano, metano, cloruro de carbono y cloruro tricloroacético) o intermediarios de la ditizona (2-pirrolidona y hepta etilen glicol).

Las figuras 1 y 2 muestran los porcentajes en área de cloroformo y el porcentaje de probabilidad para cada tratamiento.

**Figura 1.** Porcentaje en área de cloroformo para cada tratamiento

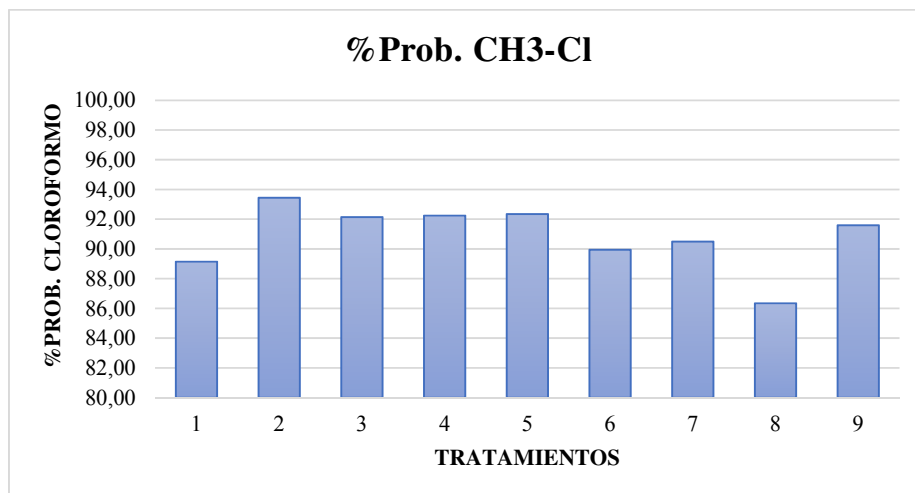


Figura 2. Porcentaje de probabilidad de cloroformo para cada tratamiento.

Las figuras 3 y 4 muestran los cromatogramas obtenidos para el mejor tratamiento, evidenciándose en cada uno un solo pico que representa al cloroformo, el eje de las abscisas corresponde al tiempo de retención y el eje de las

ordenadas a la absorbancia. El valor de absorbancia más alto se observó para las dos réplicas a los seis minutos, esto considerando el bajo punto de ebullición del cloroformo.

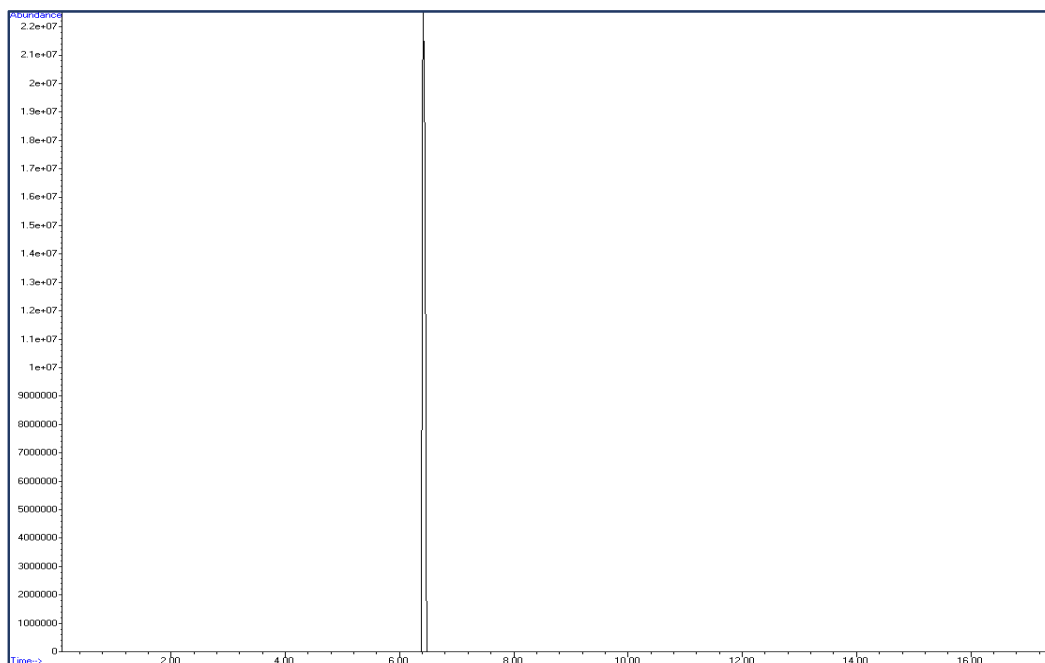


Figura 3. Cromatograma del mejor tratamiento (a0b1, réplica 1).

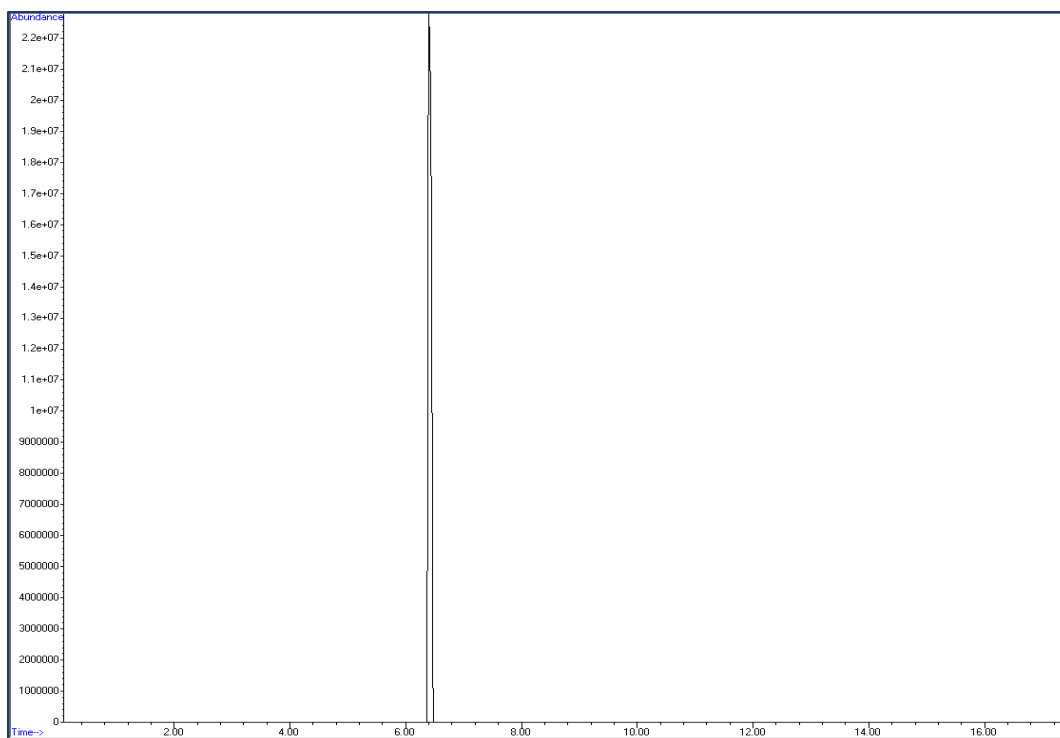


Figura 4. Cromatograma del mejor tratamiento (a0b1, réplica 2)

3.3. Determinación del porcentaje de remoción de cadmio

Se determinó la concentración de cadmio en mg/L de las muestras por absorción atómica en horno de grafito. Se corrieron tres réplicas por cada ensayo, el primero se realizó con una muestra de residuo sin tratamiento, es decir una muestra a la que no se le aplicó el proceso Foto-

Fenton solar y una segunda muestra que correspondía al cloroformo residual recuperado con el proceso antes mencionado.

En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos en la cuantificación de cadmio por absorción atómica para la muestra de residuo sin tratamiento y la muestra de cloroformo recuperado.

Tabla 6. Cuantificación de cadmio por absorción atómica.

Muestra	[Cd] mg/L	% Remoción de cadmio
CH ₃ -Cl sin tratamiento	1,02±0,02	96,4
CH ₃ -Cl con tratamiento	0,04±0,01	-

De los resultados obtenidos después de la cuantificación de cadmio se determinó que el proceso Foto-Fenton solar permite una remoción del 96,4% y que con la aplicación del mejor tratamiento la muestra resultante contiene tan solo 0,04±0,01 mg/L de cadmio.

Los valores obtenidos concuerdan con los expuestos en el estudio realizado por Visa y Duta (2013) en el que se alcanzó un porcentaje de remoción de cadmio del 88 % aplicando un tiempo de reacción de 90 minutos, esto en

muestras que contenían anaranjado de metilo e ión cadmio (Cd²⁺) aplicando el proceso Foto-Fenton solar combinado con cenizas modificadas. Las variaciones entre los porcentajes de remoción se deben a que las muestras evaluadas tenían diferente composición.

Aplicación del proceso foto-fenton solar para la recuperación del cloroformo residual obtenido luego de la realización del ensayo de cadmio (método HACH 8017)

Application of the solar photo-fenton process for the recovery of residual chloroform obtained after the cadmium assay (HACH Method 8017)

3.4. Realización del ensayo de Cadmio (Método HACH 8017)

Para verificar la reproducibilidad del ensayo del cadmio con el cloroformo recuperado se realizó el ensayo de cadmio aplicando el método HACH 8017, considerando que este es el método aplicado para la cuantificación de este metal en

el Laboratorio de Control de Calidad de la EP-EMAPA-A.

La tabla 7 muestra los valores obtenidos al aplicar el método HACH 8017 para los dos tipos de muestra, agua destilada y material de referencia.

Tabla 7. Cuantificación de cadmio por espectrofotometría.

Muestra	Cloroformo utilizado	[Cd] mg/L
Agua destilada	Nuevo	1,00
	Recuperado	1,00±0,00
Material de referencia	Recuperado	28,2

Las concentraciones de cadmio reportadas para la muestra de agua destilada corresponden al promedio ± desviación estándar de las tres réplicas corridas, en cuanto al resultado frente al material de referencia se realizó aplicando lo descrito en el análisis certificado Trace Metals 1-WS, Fluka Analytica.

Los valores de concentración de cadmio en mg/L obtenidos para la muestra de agua destilada fueron los mismos tanto para aquellas en las que se empleó cloroformo nuevo como para aquellas en las que se empleó el cloroformo recuperado, evidenciándose que la aplicación del cloroformo recuperado no produce una lectura errónea de la concentración de cadmio de la muestra, esto coincide con los valores obtenidos en la cuantificación de cadmio por absorción atómica (0,04 mg/L) considerando que el espectrofotómetro empleado para la realización de este análisis (HACH-DR6000) genera una lectura con un solo decimal.

En cuanto al valor obtenido al correr el ensayo frente a un material de referencia (28,2 mg/L) se encuentra dentro del rango de valor certificado establecido en el análisis certificado Trace Metals 1-WS, Fluka Analytica de 28,1±0,4 mg/L.

4. CONCLUSIONES

Se determinó que la relación óptima H_2O_2/Fe^{2+} en el proceso Foto-Fenton solar para la recuperación de cloroformo, fue la correspondiente al tratamiento 2 (a_0b_1), con un porcentaje en área de cloroformo de 100,0±0,0 y un porcentaje de probabilidad de cloroformo del 93,45±2,05. El porcentaje de remoción de cadmio obtenido después de la realización del proceso Foto-Fenton solar con la relación óptima H_2O_2/Fe^{2+} fue del 96,4% con una concentración de cadmio en mg/L de 1,02±0,02 y 0,04±0,01 para la muestra sin Foto-Fenton solar y la

muestra con Foto-Fenton solar, respectivamente. Al correr el ensayo de cadmio (Método HACH 8017) se verificó que las lecturas obtenidas con el cloroformo nuevo y con el cloroformo recuperado eran las mismas siendo 1,0±0,0 mg/L en todos los ensayos. En cuanto a la verificación frente a un material de referencia se obtuvo una lectura de 28,2 mg Cd/L, concentración que se encuentra dentro de los valores certificados en el análisis de Trace Metals 1-WS, Fluka Analytica (28,1±0,4 mg Cd/L).

REFERENCIAS

- Arvanitoyannis, I., Kassaveti, A. y Stefanatos, S. (2007). Olive oil waste treatment: a comparative and critical presentation of methods, advantages & disadvantages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 187-229. doi: 10.1080/10408390600695300
- Basheer Hasan, D. u., Wan Mohd Ashri Wan, D. y Abdul Raman, A. A. (2012). *Treatment technologies for petroleum refinery effluents: A review* (Vol. 89).
- Cela Torrijos, R. y Pérez-Bustamante, J. A. (1979). Determinación de trazas metálicas contaminantes en aditivos alimentarios III. Determinación de cadmio en carboximetilcelulosa. *Revista portuguesa de química*, 21, 70-75. doi: <http://www.spq.pt/magazines/RPQuimica/299/article/950/pdf>

- HACH (2003). DR/4000 Cadmium Method 8017. DR 4000 procedures for Method 8017, Dithizone method, powder pillows, range 0-80 µg/L (11 ed.). <https://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639984295>. (España). Obtenido de <https://zaguan.unizar.es/record/6139?ln=es#>
 - Ignachewsky, F., Fujiwara, S. T., Cótica, L. F., Carneiro, L. M., Tauchert, E. y Peralta-Zamora, P. (2010). Degradación de corantes reativos por proceso foto-Fenton envolviendo o uso de peneira molecular 4A modificada com Fe³⁺. *Química Nova*, 33(8), 1640-1645. doi: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n8/04.pdf>
 - INSHT (2004). NTP 359: Seguridad en el laboratorio: gestión de residuos tóxicos y peligrosos en pequeñas cantidades. Madrid (España): Instituto Nacional de Salud e Higiene en el Trabajo.
 - Karthikeyan, S., Ezhil Priya, M., Boopathy, R., Velan, M., Mandal, A. B. y Sekaran, G. (2012). Heterocatalytic Fenton oxidation process for the treatment of tannery effluent: kinetic and thermodynamic studies. *Environmental science and pollution research international*, 19(5), 1828-1840. doi: 10.1007/s11356-011-0691-1
 - Pey Clemente, J. (2008). *Aplicación de procesos de oxidación avanzada (fotocatálisis solar) para el tratamiento y reutilización de efluentes textiles*. (Tesis Doctoral), Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España). Obtenido de <http://hdl.handle.net/10251/2241>
 - Pignatello, J. J., Oliveros, E. y MacKay, A. (2006). Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1-84. doi: 10.1080/10643380500326564
 - Torrades, F., García-Montaña, J., Antonio García-Hortal, J., Domènech, X. y Peral, J. (2004). Decolorization and mineralization of commercial reactive dyes under solar light assisted photo-Fenton conditions. *Solar Energy*, 77(5), 573-581. doi: <https://doi.org/10.1016/j.solener.2004.05.004>
 - Valero Lázaro, P. (2011). *Determinación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en procesos Fenton y Foto-Fenton*. (Tesis Grado), Universidad de Zaragoza, Zaragoza
- Aplicación del proceso foto-fenton solar para la recuperación del cloroformo residual obtenido luego de la realización del ensayo de cadmio (método HACH 8017)**
- Application of the solar photo-fenton process for the recovery of residual chloroform obtained after the cadmium assay (HACH Method 8017)

Obtención y caracterización de agua de coco (*Cocos nucifera*) en polvo mediante secado por aspersión

Obtaining and characterizing coconut water (*Cocos nucifera*) in powder by spray drying

Z. Riofrío¹, O. D. López, Y. Hernández

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

Artículo recibido: 30/09/2017

Artículo aceptado: 16/11/2017

RESUMEN

La finalidad de esta investigación fue la obtención y caracterización del agua de coco (*Cocos nucifera*) en polvo mediante secado por aspersión utilizando coadyuvantes del secado. Las condiciones con las que se realizó el proceso fueron: temperatura de entrada 140 °C y temperatura de salida 80 °C. Las concentraciones de coadyuvantes: maltodextrina 82 % y almidón soluble 76 %. De acuerdo a las concentraciones el rendimiento de producto en polvo fue de 78,58 % con maltodextrina y de 20,68 % con almidón soluble. Físico-químicamente el tratamiento de mayor rendimiento presentó un producto con humedad promedio de 2,5 % y pH 4,7 estos dos valores son obtenidos después de cinco semanas, solubilidad 70,28 % y contenido de carbohidratos totales de 52,55 %. Las características presentadas identifican un producto más estable permitiendo prolongar su vida útil y que además podrá ser utilizado como producto final o intermedio para el uso en otros productos como bebidas para deportistas.

Palabras clave: coadyuvantes del secado, maltodextrina y almidón soluble

ABSTRACT

The purpose of this research was to obtain and characterize coconut water (*Cocos nucifera*) powder by spray drying using drying aids. The conditions with which the process was carried out were: inlet temperature 140 °C and outlet temperature 80 °C. Adjuvant concentrations: maltodextrin 82% and soluble starch 76%. According to the concentrations the yield of powdered product was 78.58% with maltodextrin and 20.68% with soluble starch. Physico-chemically the highest yielding treatment presented a product with an average moisture of 2.5% and pH 4.7, these two values are obtained after five weeks, solubility 70.28% and total carbohydrate content of 52.55%. The characteristics presented identify a more stable product allowing prolong its useful life and that can also be used as a final or intermediate product for use in other products such as sports drinks.

Keywords: drying aids, maltodextrin and starch soluble.

¹ Autor de correspondencia: Zoila Riofrío. E-mail: zoyrioerio30@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

El agua de coco es una solución isotónica natural que contiene electrolitos entre ellos sodio, potasio, cloro y fósforo (Adams y Bratt, 1992). Los componentes principales son los azúcares con 1,4 y 5 % según la variedad de coco y el grado de madurez de la nuez. El agua de coco también contiene pequeñas cantidades de proteínas 0,7 % y grasas 0,2 % y vitaminas A, B₁, B₂, B₅ y C (Rolle, 2007).

Esta bebida almacenada dentro del coco es estéril, pero una vez extraído de su recipiente de almacenamiento natural, esta esterilidad se pierde y a su vez por el contacto con el aire, comienza a fermentarse por la oxidación de pequeñas cantidades de grasa que contiene el líquido afectando a casi todas sus propiedades organolépticas y nutritivas (Rodny, 2010; Rolle, 2007).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Rolle, 2007) anunció la tecnología de conservación del agua de coco mediante su embotellamiento, la misma que podrá almacenarse aproximadamente por 10 días, sin embargo para este método es esencial mantener el agua de coco a una temperatura de 0 ° a 4 °C durante el transporte, cualquier cambio de temperatura afectaría su calidad y su duración. Por lo que en esta investigación se realizará mediante el secado por aspersión para obtener agua de coco en polvo siendo ideal para la protección de sus componentes naturales ante factores como el calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad (Parra Huertas, 2010).

El secado por aspersión es el método más empleado para la conservación de las características originales del producto como son alimentos sensibles al calor debido a que llegan a estar en contacto por un corto tiempo a altas temperaturas eliminando gran parte de agua del alimento impidiendo cualquier actividad microbiana o enzimática que ocasione su degradación o desnaturalización (Botero, 2015; Mondragón et al., 2013; Wisniewski, 2015).

Tomando en cuenta todas las características y beneficios que ofrece este procesamiento para la conservación del agua de coco, la presente investigación tiene como objetivo la obtención y caracterización de agua de coco (*Cocos nucifera*) en polvo mediante secado por aspersión utilizando coadyuvantes del secado, para la conservación de las características originales, prolongación de su vida útil y para una mejor facilidad de transporte del producto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

La materia prima recolectada es originaria de la provincia de Manabí, la misma que se expende en la avenida Atahualpa y Río Guayllabamba, en la ciudad de Ambato.

2.2 Métodos

Determinación de sólidos totales

Se colocó 5 ml de agua de coco en la balanza infrarroja marca KERN modelo MS50-3, y se determinaron los sólidos totales de la diferencia del 100 % y el porcentaje de humedad de la muestra.

$$\%ST = 100 - \%H \quad \text{Ec. 1}$$

Determinación de contenido de carbohidratos en el agua de coco pura y obtenida en el secado

Se determinó el contenido de carbohidratos totales en el agua de coco pura mediante el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1951). Para el método se elaboró una curva de calibración de glucosa como estándar, se preparó una solución de glucosa al 1% (p/v), de esta solución se realizaron diluciones al 0,02 mg/l, 0,04 mg/l, 0,06 mg/l, 0,08mg/l y 0,1 mg/l, se tomó 0,5 ml de cada solución y se colocó en tubos de ensayo con tapa rosca se les añadió 0,5 ml de solución de fenol al 5 % y 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado al 98 %, se agitaron durante un minuto en un vórtex (Mixer, Reino Unido), se dejó reaccionar por unos segundos y se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Hach, U.S.A), una vez obtenidos los datos se elaboró la curva de calibración.

Con las muestras de agua de coco pura y en polvo, se realizó una dilución al 1 % (p/v), en el agua de coco pura se obtuvieron diluciones de 5 mg/l, 10 mg/l y 15 mg/l, mientras que en la muestra en polvo se realizaron diluciones al 0,10 mg/l, 0,25 mg/l y 0,50 mg/l, se efectuó el mismo procedimiento realizado para la curva de calibración de glucosa, con los resultados obtenidos se calculó el contenido de carbohidratos totales por cada 100 g.

Determinación de las concentraciones de coadyuvantes del secado por aspersión y las temperaturas de entrada y salida en el secador.

La determinación de las concentraciones de coadyuvantes del secado por aspersión y las temperaturas de entrada y salida del secador, se realizó según la metodología empleada por López Hernández y Martínez Álvarez (2010).

Determinación de la temperatura de transición vítrea del producto (Tg₁).

La temperatura de transición vítrea de la mezcla se determinó por calorimetría diferencial de barrido DSC en un calorímetro (Mettler Toledo, Switzerland) efectuando el barrido a una velocidad de 10 °C/min en un intervalo de 40 -140 °C. Con los resultados obtenidos por DSC, se calculó la temperatura de transición vítrea (Tg₁), mediante el despeje de la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{Tg} = \frac{w_1}{Tg_1} + \frac{w_2}{Tg_2} \quad \text{Ec. 2}$$

Tg: Temperatura de transición de la mezcla determinada en el DSC, Tg₁: al agua de coco que se calculará y Tg₂ a la maltodextrina y almidón soluble utilizados como aditivo o coadyuvante del secado, w₁ y w₂ es la fracción en peso del agua de coco pura y del coadyuvante del secado.

Determinación del índice individual de secado de la muestra.

El índice individual de secado se calculó mediante el despeje de la siguiente ecuación:

$$Y = \sum_{i=1}^n a_i x_i \quad \text{Ec. 3}$$

a_i: índice individual de secado de cada componente (sustrato y coadyuvante), coadyuvante de secado maltodextrina de a_i: 1.60 y almidón soluble de a_i: 2.08, x_i: fracción en peso de cada componente, Y: índice total de secado.

Considerando cuando Y=1 indica posibilidad de secar y si Y> 1,3 perfectamente posible de secar.

$$Y = (a_{\text{agua coco}} * x_{\text{agua coco}}) + (a_{\text{aditivo}} * x_{\text{aditivo}}) \quad \text{Ec. 4}$$

Con el valor del índice individual de secado se determinó la nueva concentración del aditivo para un secado exitoso.

$$x_{\text{aditivo}} = \frac{Y - (a_{\text{agua coco}} * x_{\text{agua coco}})}{a_{\text{aditivo}}} \quad \text{Ec. 5}$$

Con la nueva concentración del aditivo x_{aditivo} = w₂ se recalculó la Tg de la nueva mezcla en la ecuación Ec.2.

A partir de la Tg de la nueva mezcla se calculó la temperatura de apelmazamiento de la mezcla según la ecuación:

$$T_A = Tg + 20 \text{ } ^\circ\text{C} \quad \text{Ec. 6}$$

Se seleccionó la temperatura de salida en el secador (Ts), considerando que Ts<T_A. Se determinó la temperatura de entrada en el secador (Te), mediante el diagrama Psicrométrico para el sistema aire vapor de agua, teniendo en cuenta la temperatura de salida en el secador y la humedad deseada del producto final.

Rendimiento

Se evaluó el rendimiento del producto obtenido en relación a la cantidad de sólidos totales, carbohidratos en el agua de coco y la masa de polvo obtenida.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{masa de polvo obtenido (g)}}{\text{masa de sólidos en la alimentación (g)}} * 100 \quad \text{Ec. 7}$$

Evaluación físico-química del producto.

Humedad

Se colocó 3 g de la muestra de agua de coco en polvo en la balanza infrarroja (Kern MLS 50-3), se realizó mediante lectura directa. Las mediciones se efectuaron a las 0, 1, 2, 3 y 5 semanas cada medición se realizó por triplicado (AOAC 1925).

pH

Se disolvió 25 g del agua de coco en polvo en 100 ml de agua destilada, la solución se midió en un pH-metro portátil (Meter), mediante lectura directa se obtuvo el resultado del pH de la muestra, cada medición se realizó por triplicado (INEN 2017).

Solubilidad

La solubilidad se determinó mediante el método de Eastman y Moore (Cano-Chauca et al., 2005). El

método se realizó por duplicado, se colocó 50 ml de agua destilada en un tubo de centrifuga Falcon se adicionaron 0,5 g de agua de coco en polvo, se homogeneizo por 1 min en un vórtex (Mixer, Reino Unido), la solución se colocó en una centrifuga (Hettich EBA 12) a 3000 rpm por 5 min. Se tomó 12,5 ml del sobrenadante y se transfirió en una caja petri anteriormente pesada y se secó en estufa (Memmert) a 105 °C durante 5 h. Se calculó el porcentaje de solubilidad mediante la ecuación:

$$\%S = 100 \frac{\text{peso sólidos en el sobrenadante} \times 4}{\text{peso de la muestra}}$$

Ec. 8

Diseño experimental

Empleando el software Statgraphics Centurion XV.II, se realizó el análisis estadístico de prueba de rangos múltiples de Duncan para evaluar el rendimiento según las concentraciones de los coadyuvantes de secado maltodextrina y almidón soluble en el secado del agua de coco. Los tratamientos se realizaron por triplicado y se evaluaron mediante análisis de varianza ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del contenido de sólidos totales en agua de coco

El contenido de sólidos totales del agua de coco se realizó por triplicado, el resultado promedio fue de $6,09 \pm 0,2$ % por cada 100 ml de agua de coco. Este resultado se utilizó para determinar la concentración de coadyuvante de secado (maltodextrina y almidón soluble de papa) al ser añadida al agua de coco.

Contenido de carbohidratos en el agua de coco pura.

En la curva de calibración de glucosa como estándar se obtuvo la siguiente curva:

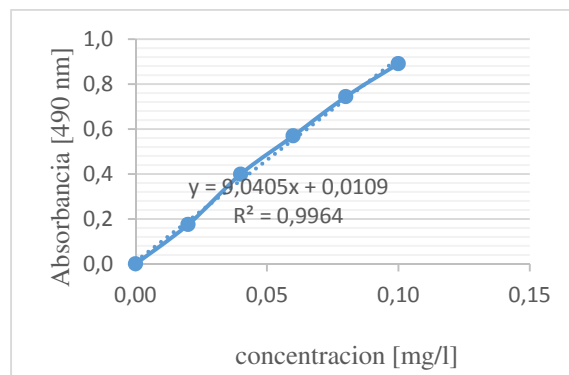


Figura 1. Curva de calibración de glucosa

Las mediciones se realizaron por duplicado a concentraciones de 5, 10 y 15 mg/l en la tabla 1 se puede observar un promedio de las absorbancias obtenidas.

Tabla 1. Absorbancia del agua de coco pura

Concentración [mg/l]	Absorbancia (490 nm)
5	0,156 ± 0,012
10	0,326 ± 0,018
15	0,464 ± 0,015

Mediante la ecuación de la curva de calibración de la glucosa se calculó el contenido de carbohidratos en el agua de coco pura:

$$Y = 9,0405x + 0,0109$$

Ec. 9

$$Abs = 9,0405 (\text{concentración}) + 0,0109$$

El valor que se encontró dentro de la curva de calibración de la glucosa a la concentración de 10 mg/l fue de $0,326 \pm 0,018$, con lo cual se calculó un contenido de carbohidratos de $3,48 \pm 0,16$ %. Este resultado se corrobora con Ovalles et al. (2002) que obtuvieron 4,1 % de carbohidratos y con Infoagro (2017) que registró un valor de 3,7 %. El valor determinado de carbohidratos en el agua de coco se consideró en relación a los sólidos totales, para el cálculo de la concentración de coadyuvante del secado.

Determinación de las concentraciones de coadyuvantes del secado y las temperaturas de entrada y salida en el secador.

Las concentraciones de coadyuvantes de secado (maltodextrina y almidón soluble de papa) se

calcularon según el contenido de sólidos totales y contenido de carbohidratos totales en el agua de coco.

En la figura 2 se presenta el termograma de la mezcla obtenido por DSC,

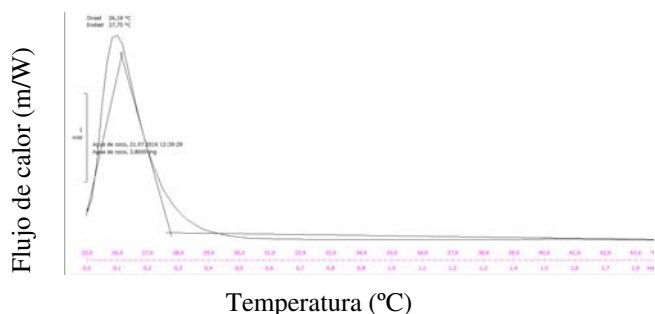


Figura 2. Termograma de la mezcla

Como se observa la temperatura de transición vítrea (Tg) de la mezcla fue de 26,48 °C iniciando con 26,19 °C y finalizando en 27,75 °C. La temperatura de transición vítrea registrada por el DSC es muy baja por lo tanto es necesario el uso de coadyuvantes ya que presentan temperaturas de transición vítrea altas que garanticen las condiciones de secado.

A continuación, se registran los cálculos para un secado exitoso al añadir coadyuvantes de secado considerando que la fracción en peso w_1 del agua de coco pura fue de 0,57 y w_2 del coadyuvante 0,43

Cálculo de la concentración de Maltodextrina y temperaturas en el secador

- **Cálculo de la temperatura de transición vítrea del producto (Tgi).**

El índice individual de secado de la maltodextrina es 1,6 con temperatura de transición vítrea de 160 °C (López Hernández y Martínez Álvarez, 2010).

Ec.2

$$\frac{1}{26,48^{\circ}\text{C}} = \frac{0,57}{T_{g1}} + \frac{0,43}{160}$$

$$T_{g1} = 16,25^{\circ}\text{C}$$

- **Cálculo del índice individual de secado de la muestra**

Considerando cuando $Y=1$ indica posibilidad de secar Ec. 4

$$1 = (a_{\text{agua coco}} * 0,57) + (1,6 * 0,43)$$

$$a_{\text{agua de coco}} = 0,55$$

- **Cálculo de la nueva concentración del aditivo**

Considerando $Y=1,3$ para un secado exitoso. Ec. 5

$$x_{\text{aditivo}} = \frac{1,3 - (0,55 * 0,57)}{1,6}$$

$$x_{\text{aditivo}} = \frac{1,3 - (0,55 * 0,57)}{1,6}$$

$$x_{\text{aditivo}} = 0,62$$

- **Cálculo de Tg de la nueva mezcla**

$$\frac{1}{T_g} = \frac{0,11}{10,99^{\circ}\text{C}} + \frac{0,89}{160^{\circ}\text{C}}$$

$$T_g = 64,21^{\circ}\text{C}$$

Según las fracciones en peso determinadas y la cantidad de carbohidratos en relación a los sólitos totales en el agua de coco se calculó la cantidad de maltodextrina a añadir de 28,2 g.

- **Cálculo de la temperatura de apelmazamiento de la mezcla Ec 6.**

$$T_A = 64,21^{\circ}\text{C} + 20^{\circ}\text{C}$$

$$T_A = 84,21^{\circ}\text{C}$$

Cálculo de la concentración de almidón soluble y temperaturas en el secador

- **Cálculo de la temperatura de transición vítrea del producto (Tgi).**

El índice individual de secado del almidón soluble es 2,08 con temperatura de transición vítrea de 243 °C (López Hernández y Martínez Álvarez, 2010). Ec. 2

$$\frac{1}{26,48^{\circ}\text{C}} = \frac{0,57}{T_{g1}} + \frac{0,43}{243}$$

$$T_{g1} = 15,83^{\circ}\text{C}$$

- **Cálculo del índice individual de secado de la muestra**

Considerando cuando $Y=1$ indica posibilidad de secar Ec. 4

$$1 = (a_{\text{agua coco}} * 0,57) + (2,08 * 0,43)$$

$$a_{\text{agua de coco}} = 0,19$$

- **Cálculo de la nueva concentración del aditivo**

Considerando $Y=1,3$ para un secado exitoso. Ec.5.

$$x_{aditivo} = \frac{1,3 - (0,19 * 0,57)}{2,08}$$

$$x_{aditivo} = 0,57$$

• **Cálculo de Tg de la nueva mezcla**

$$\frac{1}{Tg} = \frac{0,15}{12,14^{\circ}C} + \frac{0,85}{243^{\circ}C}$$

$$Tg = 63,07^{\circ}C$$

Según las fracciones en peso determinadas y la cantidad de carbohidratos en relación a los sólitos totales en el agua de coco se calculó la cantidad de almidón soluble a añadir de 19,74 g

• **Cálculo de la temperatura de apelmazamiento de la mezcla Ec. 6**

$$T_A = 63,07^{\circ}C + 20^{\circ}C$$

$$T_A = 83,07^{\circ}C$$

• **Determinación de la temperatura de entrada y salida en el secado para ambos coadyuvantes del secado**

Se seleccionó la temperatura de salida en el secador de 80 °C considerando que Ts<TA, la temperatura de entrada en el secador de 140 °C, se determinó mediante el diagrama psicrométrico con una humedad deseada aproximada del 6 % en el producto. En la tabla 2 se presenta en resumen de los valores calculados.

Tabla 2. Relación de temperaturas e índices determinados para el agua de coco

Material a secar	Tg °C (DSC)	Coadyuvante	Tg °C de la mezcla	Ta °C de la mezcla	ai	Te °C	Ts °C
Agua de coco	26,48	Maltodextrina DE10	64,21	84,21	0,51	140	80
		Almidón soluble de papa	63,07	83,07	0,19	140	80

Tg: temperatura de transición vítrea, Ta: temperatura de apelmazamiento, Te: temperatura de entrada y Ts: temperatura de salida del secador, ai: índice individual de secado.

Como se puede observar en la tabla 2 las temperaturas de transición vítrea de las mezclas calculadas fueron de 64,21 °C y 63,08 °C respectivamente, al añadir los coadyuvantes de secado por lo cual son idóneas para el secado ya que se calculó para un índice total de secado aproximado de Y=1,3.

Shiga et al. (2001), afirman que, la temperatura de entrada en el secador debe ser alta para que permita la formación de una membrana semipermeable, pero no mayores a 210 °C que pueda causar daño térmico al producto, consecuentemente la temperatura de ambos coadyuvantes de secado. Los valores calculados se registran en la tabla 3.

entrada seleccionada para la mezcla con ambos coadyuvantes fue de 140 °C ideal para el secado.

Como se observa en la tabla 2 la temperatura de salida se calculó por debajo de la Ta, lo que evita el apelmazamiento de la muestra, a esta temperatura se obtiene un producto con menor humedad, haciendo más corto el proceso de secado y el tiempo permanencia del producto en el secador (Reineccius et al., 2003).

Rendimiento del agua de coco secada por aspersión

La determinación del rendimiento se realizó con las mismas condiciones de temperatura de entrada y salida

Tabla 3. Rendimientos del agua de coco en polvo

Tratamientos	Material a secar + coadyuvante	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Rendimiento (%) *
M ₁	Agua de coco + maltodextrina	140	80	78,58 ± 3,86
M ₂	Agua de coco + almidón soluble de papa	140	80	20,68 ± 4,05

*El rendimiento registrado corresponde al promedio de tres réplicas.

Para el rendimiento del producto secado, el peso inicial se estableció en relación a los sólidos totales del agua de coco y a la cantidad de coadyuvante a añadir, ya que en el proceso de secado por aspersión el agua se evaporó.

Como se puede observar en la tabla 3, el tratamiento M₁ fue el de mayor rendimiento con 78,58 % en comparación al M₂ con 20,68 %,

El rendimiento con almidón soluble fue probablemente menor debido a que durante el secado la viscosidad del almidón gelatinizado provocó que se adhiriera a las paredes del equipo, disminuyendo la capacidad de aspersión y por ende afectando el rendimiento (Sandoval Aldana et al., 2005), por otro lado, la maltodextrina al ser producto de la hidrólisis del almidón posee una alta solubilidad y una baja viscosidad (Kenyon, 1995), permitiendo un mejor rendimiento del producto.

Evaluación físico-química de producto

A continuación se presentan las características físico-químicas realizadas a la muestra con el mejor rendimiento y similitud sensorial con el agua de coco natural.

Humedad

El porcentaje de humedad se midió para el mejor tratamiento de agua de coco y maltodextrina en polvo. Las mediciones realizadas a las 0, 1, 2, 3 y 5 semanas, se representan en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de humedad del producto en polvo (agua de coco más maltodextrina)

Semanas	% de Humedad *
0	0,18 ± 0,01
1	1,46 ± 0,01
2	2,96 ± 0,01
3	3,32 ± 0,01
5	4,67 ± 0,02

*El valor del porcentaje de humedad es el promedio de tres réplicas.

Los resultados de la humedad del agua de coco en polvo presentan concordancia con estudio realizado por Gabas et al. (2009) para la pulpa de lulo en polvo los cuales variaron de 4,80 % y 5,44 %, lo que indica un porcentaje de humedad adecuado para el producto obtenido. El porcentaje de humedad evaluada en función del tiempo presentó variación, sin embargo se encuentran dentro de los límites aceptables para el contenido de humedad de los productos en polvo del 10%, permitiendo mayor tiempo de vida útil del producto (Huntington, 2004).

pH

Se analizó el pH del agua de coco en polvo durante cinco semanas, cuyos valores se representan en la figura 3.

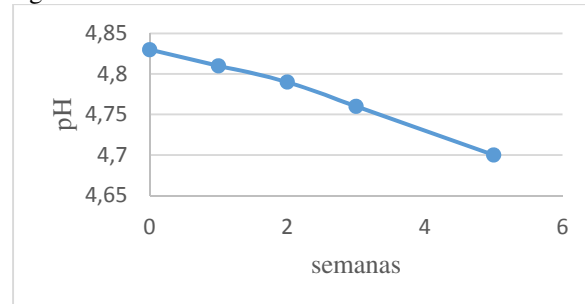


Figura 3. pH del agua de coco medido durante cinco semanas

El pH inicial del agua de coco pura fue de 5,07 que en comparación al del producto de 4,83 no presenta mucha variación después del secado y además según Carvalho (2005) menciona que el pH mínimo del agua de coco es 4,3 por lo tanto el producto obtenido se encuentra dentro de los valores. Por lo que la transformación del agua de coco en polvo indica que es posible mantener por mucho más tiempo sus propiedades químicas al inactivar enzimas, sin causar el pardeamiento no enzimático responsable del cambio de color en el agua de coco.

Solubilidad

La solubilidad es un parámetro confiable para la evaluación de calidad de productos en polvo en una solución acuosa (O'Shea et al., 2012), de acuerdo a lo mencionado el agua de coco en polvo obtuvo una solubilidad del 70,28 % considerándose alta, permitiendo disolver sin necesidad de calentar, contribuyendo la alta solubilidad que presenta la maltodextrina.

Contenido de carbohidratos totales en el producto.

El contenido de carbohidratos en el agua de coco en polvo se midió a 490 nm, a las concentraciones de 0,10 mg/l, 0,25 mg/l y 0,50 mg/l las absorbancias obtenidas se representan en la tabla 5.

Tabla 5. Absorbancias del agua de coco en polvo

Concentración [mg/l]	Absorbancias
0,10	0,486 ± 0,021
0,25	0,925 ± 0,114
0,50	1,390 ± 0,171

Mediante la ecuación 9 de la curva de calibración de glucosa al 1 %, se calculó el contenido de carbohidratos totales con la absorbancia registrada dentro de la curva de calibración de $0,486 \pm 0,021$ a la concentración de 0,10 mg/l obteniendo un contenido de carbohidratos de 52,55 %, ya que la maltodextrina como coadyuvante de secado, tiene un contenido de carbohidratos de 98,5 g (Tecno Productos Ocampo S.A., 2017), por lo que al añadir al agua de coco en un 82% genera un contenido de carbohidratos de 52,55 %.

Estadístico

Aplicando la prueba de rangos múltiples de Duncan se evaluaron los resultados obtenidos del secado del agua de coco, para determinar la influencia de la concentración de los coadyuvantes de secado en el rendimiento del agua de coco en polvo.

Tabla 6. Análisis de varianza para el rendimiento del agua de coco en polvo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3352,99	1	3352,99	42,37	0,0228
Intra grupos	158,28	2	79,1398		
Total (Corr.)	3511,27	3			

El resultado de la tabla ANOVA (tabla 6) para comparar los rendimientos del agua de coco en polvo registran un $p < 0,05$, indicando que existe diferencia significativa.

En la figura 4 se muestra la comparación.

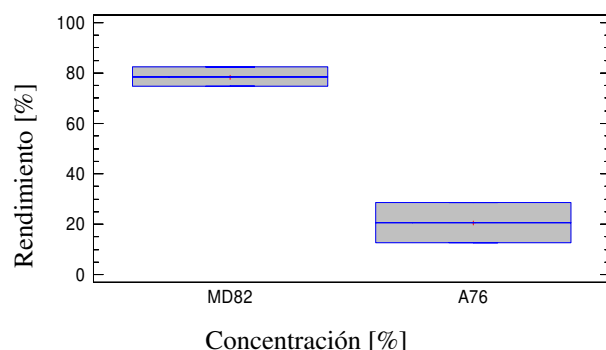


Figura 4. Comparación de los rendimientos obtenidos para el agua de coco en polvo.

MD82: concentración de maltodextrina al 82% y A76: concentración de almidón soluble al 76%.

Se puede observar en la figura 4 la gran diferencia que se obtuvo en el rendimiento del agua de coco con el 82 % de maltodextrina comparado con almidón soluble al 76 %. Este resultado puede deberse a que la solubilidad del almidón no es muy alta por ser una molécula compleja y produce la adherencia del producto en las paredes del equipo (Sandoval Aldana et al., 2005).

4. CONCLUSIONES

Se obtuvo agua de coco en polvo mediante secado por aspersión empleando coadyuvantes de secado, logrando un rendimiento del 78,58 % con maltodextrina y del 20,68 % con almidón soluble. Las condiciones óptimas calculadas para un secado exitoso del agua de coco fueron a la temperatura de entrada de 140 °C y temperatura de salida de 80 °C para ambos coadyuvantes. Las pruebas físico – químicas se realizaron para el mejor tratamiento en cuanto a humedad y pH se analizaron por cinco semanas obteniendo 4,67 % y 4,7 respectivamente, una solubilidad del 70,28% y contenido de carbohidratos de 55,22%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, W. y Bratt, D. E. (1992). Young coconut water for home rehydration in children with mild gastroenteritis. *Tropical and geographical medicine.*, 44(1-2), 149-153.
- AOAC (1925). AOAC Official Method 925.10. Solids (Total) and Loss on Drying (Moisture in Flour. Air Oven Method (pp. 1): AOAC INTERNATIONAL.
- Botero, K. (2015). Secado por atomización. (pp. 3-43). Tolima (Colombia): Universidad del Tolima.
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M. y Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 420-428. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- Carvalho, J. M. (2005). *Bebidas à base de água de coco e suco de caju: Processamento e estabilidade*. (Tesis Maestría), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (Brasil).
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167.
- Gabas, A. L., Telis-Romero, J., Giraldo-Gómez, G. I. y Telis, V. R. N. (2009). Propiedades termodinámicas de sorción de agua de la pulpa de lulo en polvo con encapsulantes. *Food Science and Technology*, 29(4), 911-918.
- Huntington, D. H. (2004). The Influence of the Spray Drying Process on Product Properties. *Drying Technology*, 22(6), 1261-1287. doi: 10.1081/DRT-120038730
- INEN (2017). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2304. Refrescos o bebidas carbonatadas. Requisitos (pp. 3): Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.
- Infoagro (2017). Cultivo del Coco. Curso Especialista en Fruticultura. from http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/coco.htm

- Kenyon, M. M. (1995). *Modified Starch, Maltodextrin, and Corn Syrup Solids as Wall Materials for Food Encapsulation* (Vol. 590): American Chemical Society.
- López Hernández, O. D. y Martínez Álvarez, L. O. (2010). Herramientas para el diseño de las condiciones del proceso de secado por aspersión de extractos vegetales para uso farmacéutico. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(3), 152-158.
- Mondragón, R., Julia, J., Barba, A. y Jarque, J. (2013). El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 25(4), 159-168. doi: http://boletines.secv.es/upload/2013083091341_201352159.pdf
- O'Shea, N., Arendt, E. K. y Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.002>
- Ovalles, J. F., León, L. A., Vielma, R. A. y Medina, A. (2002). Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y Revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 44(2), 70-78. doi: https://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23800/1/articulo44_13.pdf
- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684. doi: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/articulo/view/25055/25595>
- Reineccius, G. A., Liardon, R. y Luo, Z. (2003). *The retention of aroma compounds in spray dried matrices during encapsulation and storage*. Paris (Francia): Editions: Tec & Doc.
- Rodny, E. (2010). *Evaluación de la calidad microbiológica del agua de coco envasada en presentación de un litro, registrada y comercializada en el distrito N° 2 área metropolitana de San Salvador*. (Tesis Grado), Universidad de El Salvador, San Salvador (El Salvador). Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/162/1/16102626.pdf>
- Rolle, R. (2007). *Buenas prácticas para la producción en pequeña escala de agua de coco embotellada*. Roma (Italia): FAO. Servicio de tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria. <http://www.fao.org/3/a-a1418s.pdf>.
- Sandoval Aldana, A., Rodríguez Sandoval, E. y Fernández Quintero, A. (2005). Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *DYNA*, 72(146), 45-53. doi: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v72n146/a04v72n146.pdf>
- Shiga, H., Yoshii, H., Nishiyama, T., Furuta, T., Forssele, P., Poutanen, K. y Linko, P. (2001). Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulant of cyclodextrin and gum arabic. *Drying Technology*, 19(7), 1385-1395. doi: 10.1081/DRT-100105295
- Tecno Productos Ocampo S.A. (2017). Ficha Técnica Globe Maltodextrina 10.
- Wisniewski, R. (2015). *Spray drying technology review*. Paper presented at the 45th International Conference on Environmental Systems., Washington (EE.UU.) https://ttu-ir.tdl.org/ttu-ir/bitstream/handle/2346/64598/ICES_2015_submission_68.pdf?sequence=1.

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.orkund.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



