



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TEMA: “Desarrollo de una bebida a base de harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con fermentación sólida y sumergida”

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTORA: Andrea Vanessa Escobar Razo
TUTOR: Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía

AMBATO – ECUADOR

Enero -2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 10 de Diciembre del 2018



.....
Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 1804148086

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Andrea Vanessa Escobar Razo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

Andrea Escobar

.....

Srta. Andrea Vanessa Escobar Razo

C.I. 1725489320

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para consistencia firman:



.....

Presidente del Tribunal



.....

Lic. David Andrés Terán Mera Ph.D.

C.I. 1716569726



.....

Lic. Mg. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

Ambato, 20 de Diciembre del 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública; además, apruebo la reproducción de este proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Andrea Escobar

.....

Srta. Andrea Vanessa Escobar Razo

C.I. 1725489320

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios, mis padres, mi hija, hermano y familia

Todo lo que puedo en Cristo que me fortalece.

Filipenses 4:13

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme guiado toda mi vida, por ser mi refugio, fortaleza y sabiduría en todo momento, por brindarme una vida llena de aprendizaje y experiencias que solamente se aprenden una sola vez en la vida.

A mis padres Víctor Hugo y María Augusta por haberme dado la vida, por su paciencia, amor, ejemplo de perseverancia, apoyo incondicional y sacrificio en todos estos años de estudio, por brindarme una segunda oportunidad y enseñarme que a pesar de las dificultades la vida continúa.

A mi querida hija Danna Abigail por ser el motivo del cual cada día decidí seguir adelante convirtiéndose en una de mis mejores decisiones y por hacerme sentir muy afortunada de tenerla en mi vida.

A mi hermano Víctor gracias por ser mi compañía, por los juegos, risas, llantos. Yo sé que vas a llegar lejos solo confía en Dios.

A mi familia por ser uno de los pilares fundamentales en mi vida, por su amor, consejos, apoyo económico, sentimental y por brindarme una familia única y especial. ¡Vamos por más aventuras en familia!

A mis dos ángeles hermosos: A mi tía Adriana y mi tío Klever, que, aunque no estén físicamente, sé que siempre tuve su apoyo.

A mi tutora, Inge Lily mil gracias por su ayuda incondicional y creer en mi en este proyecto ya que gracias a usted cumplí esta meta, gracias por estar ahí, por sus palabras que definitivamente nunca las voy a olvidar.

A mi tutor Ing. David Terán, mil gracias por su valiosa asesoría, tiempo compartido, gracias por la confianza en mí, por ser mi jefe y nunca olvidaré que siempre me preguntaba como estoy pese que en mi cara se notaba todo y por esas palmaditas en la espalda para que siguiera adelante. Muchas gracias por su amistad, Dios les bendiga siempre.

Al Grupo de investigación DTLC por su apoyo, amistad, momentos compartidos, Abigail, Shimabel, Jorge, Ronald y Jonatan.

A mi calificadora Lic. Danae Fernández por sus consejos, colaboración, comprensión y tiempo brindado para culminar el presente trabajo.

Saber que hay amistades que valen la pena, que me han apoyado, que han estado conmigo en la buenas y en las malas, gracias Brayan.

Con amor Andre ☺

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 General	3
1.2.2 Específicos.....	3
1.3 HIPÓTESIS	3
1.3.1 Hipótesis nula	3
1.3.2 Hipótesis alternativa	3
1.4 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS	3
1.4.1 Variable Independiente.....	3
1.4.2 Variable Dependiente	3

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES	4
2.1.1 Materia Prima	4
2.2 MÉTODOS.....	4
2.2.1 Elaboración de la bebida	4
2.2.1.1 Activación del microorganismo	4
2.2.1.2 Crecimiento del microorganismo en el sustrato	4
2.2.1.3 Fermentación en medio sólido (FMS).....	4
2.2.1.4 Fermentación en medio liquido (FML)	4
2.2.2 Evaluación Sensorial	5

2.2.3 Estimación del tiempo de vida útil	6
2.2.3.1 Determinación de pH.....	6
2.2.3.2 Determinación de acidez titulable	6
2.2.3.3 Determinación de la concentración de proteína	7
2.2.3.4 Análisis microbiológicos	7
2.2.4 Análisis Proximal	8
2.2.4.1 Determinación de humedad	8
3.2.4.2 Determinación de proteína	9
2.2.4.3 Determinación de grasa	9
2.2.4.4 Determinación de fibra	10
2.2.5 Calidad proteica.....	11
2.2.5.1 Análisis de Aminoácidos	11
2.2.6 Determinación de perfil de ácidos grasos.....	12
2.2.7 Diseño experimental.....	12
2.2.8 Análisis estadístico	13

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados	14
3.1.1 Crecimiento del microorganismo en el sustrato	14
3.1.2 Evaluación Sensorial	16
3.1.3 Vida útil del mejor tratamiento.....	18
3.1.3.1 pH y acidez	18
3.1.3.2 Concentración de la proteína	20
3.1.3.3 Análisis microbiológico.....	21
3.1.4 Análisis Proximal	22
3.1.5 Análisis de Perfil de Aminoácidos	23
3.1.6 Análisis de perfil de ácidos grasos	25
3.2 Verificación de la Hipótesis	26

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES.....	27
MATERIAL DE REFERENCIA	28
ANEXOS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Productos, procesos o descubrimientos a partir de la fermentación	1
Tabla 2: Consumo individual de algunos fermentados alimentos: promedio por persona por año	2
Tabla 3: Parámetros sensoriales	5
Tabla 4: Factores y niveles del diseño experimental.....	13
Tabla 5: Combinaciones experimentales.....	13
Tabla 6: Selección del mejor tratamiento mediante análisis sensorial de los diferentes tratamientos	17
Tabla 7: Tiempo de vida útil para el parámetro de pH.....	19
Tabla 8: Tiempo de vida útil para el parámetro de acidez	20
Tabla 9: Resultado de los análisis microbiológicos para la bebida fermentada	21
Tabla 10: Descripción del perfil cromatográfico de ácidos grasos para la muestra control	34
Tabla 11: Descripción del perfil cromatográfico de ácidos grasos para la muestra de la bebida	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Prueba de Tukey al 95% de confianza para la variación de proporciones de sustratos, (20% de harina de amaranto – 80% de salvado de arroz; 50% de harina de amaranto – 50% de salvado de arroz; 80% de harina de amaranto – 20% de salvado de arroz).....	14
Figura 2: Prueba de Tukey al 95% de confianza para la variación de microorganismo utilizado en la fermentación sólida para la bebida de harina de amaranto y salvado de arroz (<i>Aspergillus orizae</i> tipo light ; <i>Aspergillus orizae</i> tipo red).....	15
Figura 3: Prueba de Tukey al 95% de confianza para la variación de característica de salvado de arroz (entero; molido).....	16
Figura 4: Perfil sensorial del control, T4 ($a_0b_1c_1$) (proporción 50-50; salvado molido; <i>Aspergillus orizae</i> red) y T8 ($a_1b_1c_1$) (proporción 80-20; salvado molido; <i>Aspergillus orizae</i> red).....	17
Figura 5: Evolución del pH para determinación de vida útil a temperatura ambiente y refrigeración.....	18
Figura 6: Evolución de la acidez para determinación de vida útil a temperatura ambiente y refrigeración.....	19
Figura 7: Curva de calibración para concentración de proteína.....	20
Figura 8: Concentración de la proteína ($\mu\text{g/ml}$) a temperatura ambiente y refrigeración.....	21
Figura 9: Recuento de aerobio mesófilos para el T4.....	22
Figura 10: Resultados del análisis proximal del T4.....	23
Figura 11: Perfil de aminoácidos relacionados a la bebida fermentada.....	24
Figura 12: Perfil de ácidos grasos saturados del control y muestra de bebida fermentada.....	25
Figura 13: Perfil de ácido graso monoinsaturado del control y muestra de bebida fermentada.....	26
Figura 14: Perfil cromatográfico de ácidos grasos (muestras control no posee ninguna fermentación).....	34
Figura 15: Perfil cromatográfico de ácidos grasos de la bebida fermentada T4.....	35

RESUMEN

Se presenta una alternativa para bebidas fermentadas a base de harina de amaranto y salvado de arroz con fermentación en medio sólido (FMS), en el cual se determinó la mejor proporción, la característica del sustrato y el mejor microorganismo para esta fermentación y para la fermentación en medio líquido (FML) y se utilizó suero de leche con una combinación de especies bacterianas como: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

Los ingredientes de la formulación tuvieron influencia sobre el análisis sensorial, el cual tuvo una aceptabilidad de 35.5% el tratamiento 4 (T4) con una proporción de 50 % de harina de amaranto y 50 % de salvado de arroz molido y con microorganismo *Aspergillus orizae*.

Las determinaciones analíticas realizadas fueron: parámetros físico químicos (pH, acidez y concentración de la proteína), en la parte microbiológica se realizó un recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E.coli* y *Listeria monocytogenes* como lo señala NTE INEN 2564, a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración por 21 días.

Con respecto al análisis proximal se puede apreciar ciertas diferencias con los datos bibliográficos. Además, se efectuó un perfil de aminoácidos encontrándose un total de 17 aminoácidos con una concentración de 18.13 g /100 g para la bebida. Y finalmente se realizó un perfil de ácidos grasos para la muestra control y el mejor tratamiento T4 encontrándose ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

Palabras claves: bebidas fermentadas, harina de amaranto, salvado de arroz, suero de leche, fermentación sólida.

ABSTRACT

One presents an alternative for drinks fermented based on flour of amaranth and bran of rice with fermentation in way solid (FMS), in which the best proportion decided, the characteristic of the substratum and the best microorganism for this fermentation and for the fermentation in way I liquidate (FML) and whey of milk was in use with a combination of bacterial species as: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. Bulgaricus*.

The ingredients of the formulation had influence on the sensory analysis, which had an acceptability of 35.5 % the treatment 4 (T4) with a proportion of 50 % of flour of amaranth and 50 % of bran of ground rice and with microrganismo *Aspergillus orizae*.

The analytical determinations carried out were: chemical physical parameters (pH, acidity and protein concentration), microbiological microbes, microbes of mesophiles, aerobes, total coliforms and *E.coli*, *Listeria monocytogenes* as indicated, NTE INEN 2564, at room temperature and temperature. Refrigeration for 21 days.

The bibliographic data. A total of 17 amino acids were found with a concentration of 18.13 g / 100 g for the fermented beverage. And finally, a fatty acid profile was made for the control of the sample and the best T4 treatment, finding saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.

Key words: fermented drinks, flour of amaranth, bran of rice, whey of milk, solid fermentation.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública, por lo cual ocupa una de las primeras causas de consulta médica a nivel mundial (**Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006**), afectando principalmente a niños y adultos mayores, por ser grupos muy vulnerable, las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar a 50 %, ya que depende de varios factores como el nivel socio económico y nutricionales (**Kusters et al., 2006**).

Por lo tanto, es necesario el consumo de prebióticos ya que permite cambios específicos en la composición y/o actividad de la microflora intestinal responsable del bienestar y de la salud de su hospedador (**Dominguez, Moreno, & Ramos, 2009**). Estos compuestos no son digeridos por el humano y por tanto llegan intactos hasta el colon donde sirven de alimento para aquellas bacterias que expresan enzimas, los prebióticos deben inducir indirectamente cambios benéficos sistémicos en el hospedador (**Dominguez et al., 2009**). Esto puede ser posible por dos fuentes de carbohidratos; la harina de amaranto y el salvado de arroz. Se destacan aspectos nutricionales como el contenido de calcio del amaranto que es de aproximadamente 1300 mg (**Ferreira et al, 2010**) y el contenido de calcio en el salvado de arroz que es de aproximadamente 52.1 mg (**Bhosale et al, 2015**). El beneficio del consumo de estos carbohidratos es que tienen la capacidad de prevenir enfermedades gastrointestinales, el cáncer de colon y el colesterol LDL (**Aune, 2011**).

Para la bebida propuesta en este estudio se utilizará suero de leche que es un subproducto y que durante muchos años fue sido considerado como un residuo no utilizable, pero que actualmente es utilizado por sus múltiples nutrientes y propiedades funcionales (**Dominguez et al., 2009**). Este suero posee un alto valor nutricional debido a su capacidad de proporcionar aminoácidos esenciales, también todas las proteínas del suero de leche tienen diferentes funciones biológicas tales como la α -Lactoalbúmina previene el cáncer mamá, colon y próstata además de actividades antimicrobianas, antivirales y prebióticos (**Hernández & Vélez, 2014**).

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Cuando el ser humano se volvió sedentario desarrolló el cultivo de plantas y el cuidado de animales para alimentarse, se vio entonces en la necesidad de conservarlos y descubrió que en algunos casos los alimentos se modificaban transformándose en productos que no sólo resultaban estables, sino que además eran agradables al gusto y no los enfermaban. Se piensa que así empezaron a “domesticarse” los procesos para producir alimentos fermentados. Estos alimentos vinieron a dar una importante variedad nutrimental a la dieta, al tiempo que se incorporaban de manera empírica a las levaduras, los hongos y las bacterias a la tarea de producción de alimentos **(Wacher, 2014)**.

Las fermentaciones de los alimentos es una práctica muy antigua presente en todas las culturas del mundo. Algunos alimentos fermentados han trascendido sus fronteras de origen para convertirse en productos cotidianos en más de un continente. En general, los alimentos fermentados son aquellos cuyo procedimiento involucra el crecimiento de microorganismos. Históricamente, han existido y existen una gran variedad de alimentos fermentados (Tabla 1). Entre estos alimentos se encuentran la cerveza, el vino, el vinagre, los quesos y el pan, los cuales han sido extensamente estudiados. Como resultado de estos extensos estudios se han aislado microorganismos que producen cambios específicos y deseados en sus materias primas con mayor eficiencia en la producción **(Quintero & López, 1993)**.

Tabla 1: Productos, procesos o descubrimientos a partir de la fermentación

Año	Productos, proceso o descubrimiento
2000 aC	Bebidas alcohólicas por fermentación de diferentes zumos de frutas en pueblos primitivos
6000 aC	Cerveza y pan en Mesopotamia, Egipto y China Cultivo de viña en el sur de Cáucaso
3000 aC	Leches fermentadas y queso en oriente medio Vinagre a partir de zumos fermentados
2600 aC	Tecnología de vinos fermentados en Egipto

79 dC	Quesos azules
1070	Quesos hechos con <i>Penicillium</i> Roquefort
1133	Cerveza con lúpulo en Santa Hildegarda
1300	Vinagre industrial en Orleans
1650	Cultivo de champiñones en Francia

Fuente: (Yenizey & Alvarez, 2015)

Un claro ejemplo de la fermentación líquida es el yogurt, este tiene origen en las Balcanes y antes de 1950 era desconocido en el mundo occidental, actualmente las leches fermentadas son las más estudiadas y un ejemplo de la fermentación sólida es la salsa de soya, que es un condimento componente de la dieta en el mundo occidental durante miles de años, ya que su elaboración consta de dos etapas: una en sustrato sólido y la segunda etapa, la adición de salmuera para su aroma y color característico (Quintero & López, 1993)

Los alimentos fermentados en la actualidad comprenden aproximadamente un tercio del consumo mundial de alimentos y 20 a 40% (en peso) de las dietas individuales.

Tabla 2: Consumo individual de algunos fermentados alimentos: promedio por persona por año

Alimento	Ciudad	Consumo Anual
Cerveza (L)	Alemania	130
Vino (L)	Italia, Portugal, Argentina	90
Yogurt	Finlandia	40
Kimchi (Kg)	Corea	22
Tempeh (Kg)	Indonesia	18
Salsa de Soya (L)	Japón	10
Queso (Kg)	E.E.U.U.	10
Miso (Kg)	Japón	7

Fuente: (Greco, 2010)

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 General

Desarrollar una bebida láctea a base de harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con fermentación en dos fases sólida y sumergida.

1.2.2 Específicos

- Determinar la proporción adecuada de los cereales utilizados.
- Evaluar las características sensoriales de los mejores tratamientos.
- Evaluar la calidad del producto mediante análisis proximal, perfil de ácidos grasos y perfil de aminoácidos del mejor tratamiento.
- Efectuar pruebas preliminares del producto terminado.

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 Hipótesis nula

H₀: La harina de amaranto y el salvado de arroz como ingredientes no influyen en la calidad de la bebida láctea fermentada

1.3.2 Hipótesis alternativa

H₁: La harina de amaranto y el salvado de arroz como ingredientes influyen en la calidad de la bebida láctea fermentada

1.4 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

1.4.1 Variable Independiente

- Harina de amaranto
- Salvado de arroz

1.4.2 Variable Dependiente

- Propiedades Sensoriales
- Análisis proximal

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materia Prima

La harina de amaranto fue adquirida en un supermercado de la ciudad de Ambato, el salvado de arroz es proveniente de la provincia de Santo Domingo, cultivado de manera artesanal, después de ser seleccionado y limpiado de impurezas, se lleva a moler en partículas muy finas y se reserva para su posterior utilización, las harinas se colocan en fundas de celofán para esterilizar en la autoclave (HIRAYAM, modelo HV-85) a 121 °C por 15 minutos, se deja enfriar por 24 horas en la estufa.

El suero de leche liofilizado fue obtenido en la empresa EL ORDEÑO S.A. (Machachi-Ecuador).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Elaboración de la bebida

2.2.1.1 Activación del microorganismo

Se utilizó *Aspergillus orizae*, que es una cepa comercial liofilizada del tipo light y red que fue adquirida en Gemcultures USA. Los liofilizados se activaron en tubos de ensayo con 10 mL de caldo de papa dextrosa y 1 g de microorganismo liofilizado, se inoculó 200 µl del caldo en agar PDA (Agar papa dextrosa), a 30°C por 5 días.

2.2.1.2 Crecimiento del microorganismo en el sustrato

Como sustrato para la fermentación se utilizó harina de amaranto, y salvado de arroz en las proporciones 50 % - 50 %; 80 % - 20 % y 20 % - 80 % respectivamente y se evaluó si el salvado de arroz es mejor utilizarlo entero o molido.

2.2.1.3 Fermentación en medio sólido (FMS)

Se inoculó el microorganismo activado en las diferentes proporciones del sustrato a 30°C por 48 horas, en fundas de celofán.

2.2.1.4 Fermentación en medio líquido (FML)

Después de realizada la FMS, se llevó a cabo esta fermentación en frascos de vidrios de 300 mL previamente esterilizados. Se realizó una relación entre el sustrato y el

suero de leche en donde se inoculó 200 UFC /ml por 5 horas, de una combinación de especies bacterianas como: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. Bulgaricus* que fueron adquiridos liofilizados de la colección alemana de cultivos, estas cepas bacterianas son consideradas como probióticos, las mismas fueron propagadas en agar MRS a 37 °C durante 48 horas.

2.2.2 Evaluación Sensorial

Se realizó un análisis sensorial para la evaluación correspondiente de propiedades organolépticas del producto final, siguiendo parámetros específicos para determinar su aceptación con la participación de 10 catadores semi-entrenados, de los cuales se utilizó una hoja de cataciones aplicando la prueba de aceptabilidad con una escala hedónica de cinco puntos para los atributos de olor, color, sabor, acidez aceptabilidad. Los resultados son designados a un arreglo factorial por bloques incompletos de acuerdo a (Saltos, 2010), para determinar el mejor tratamiento según los parámetros establecidos.

Las muestras que se entregaron a evaluar fueron 2 tratamientos más un blanco (sin ninguna fermentación), tuvieron designadas a cada evaluador de forma aleatoria para disminuir la subjetividad en los resultados (Cordero, Malegori, Grassi, & Arroyo, 2017), de los cuales dos muestras son entregadas a cada catador.

Los parámetros evaluados se ordenan de la siguiente forma:

Tabla 3: Parámetros sensoriales

Atributos	Alternativas
Olor	1. No tiene
	2. Ligero
	3. Agradable
	4. Intenso
	5. Muy intenso
Color	1. No tiene
	2. Amarillento
	3. Cremoso pálido
	4. Cremoso
	5. Cremoso intenso
Sabor	1. Desagradable

	2. Insípido
	3. Débil
	4. Bueno
	5. Muy bueno
Acidez	1. Nada ácida
	2. Poco ácida
	3. Ácida
	4. Muy ácida
	5. Extremadamente acida
Aceptabilidad	1. Desagradable
	2. No me gusta
	3. No me gusta ni me disgusta
	4. Gusta poco
	5. Gusta mucho

2.2.3 Estimación del tiempo de vida útil

La estimación del tiempo de vida útil, fue realizada al mejor tratamiento obtenido mediante un análisis sensorial, para efecto de la bebida obtenida fue almacenada a dos diferentes temperaturas (refrigeración 4°C, ambiente 20°C), en frascos de vidrio con tapa metálica y un cierre twist off, con capacidad de 300 ml, las pruebas fisicoquímicas se llevarán a cabo por un tiempo de 21 días, en diferentes frecuencias tanto para el pH, acidez, como la parte microbiológica.

2.2.3.1 Determinación de pH

El pH se determinó utilizando un potenciómetro (OAKTON, modelo WD-35610-10) previamente calibrado con soluciones buffer 4.0 y buffer 7.0 siguiendo la metodología descrita por la Normativa ecuatoriana (NTE INEN 0973, 1983). Para ello se determinó en 20ml y se midió el pH por triplicado.

2.2.3.2 Determinación de acidez titulable

La acidez titulable se determinó mediante la técnica oficial de (NTE INEN 0013, 1984), homogenizando 9 ml de muestra en 1 ml de agua y 3 gotas de fenolftaleína como indicador y se tituló con solución valorada de NaOH 0,1 N. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{V (\text{NaOH}) * N (\text{NaOH}) * \text{Meq} (\text{ac. láctico})}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

Donde:

V (NaOH)= volumen gastado en la titulación

N (NaOH)= normalidad del NaOH

Meq (ac.láctico)= mili equivalentes del ácido láctico = 0.09

2.2.3.3 Determinación de la concentración de proteína**Soluciones patrones**

Se presenta los estándares de albumina de suero bovino (BSA), utilizados para la curva de calibración y a diferentes concentraciones blanco, 5 µg /mL, 10 µg /mL, 20 µg /mL y 30 µg /mL.

Extracción de proteína

Se recolectó 17 muestras de la bebida fermentada en 21 días a temperatura ambiente y refrigeración en tubos falcon y se las congela a -80°C, después se las descongelo totalmente y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL y se llevó a centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C y utilizando el sobrenadante.

Método analítico

Para poder cuantificar las proteínas se utilizó el método de Hartree-Lowry, el cual consiste en relazar una solución mix basada con la adición 1.5 mL del reactivo A (hidróxido de sodio 0.5 N, carbonato de sodio anhidro 10 % y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0.2%), seguido de 1.5 del reactivo B (hidróxido de sodio 0.1 N, carbonato de sodio anhidro 10% y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 0.2%), además de 0.06ml del sulfato de cobre. En el cual en el lector de placas para los estándares se adiciona 300 µL del mix seguido de 10 µL y para las muestras se adiciona 300 µL del mix y 10 µL del sobrenadante de la extracción de la proteína, lo cual se deja reposar por 60°C por 1 hora. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO) a una longitud de onda de 590 nm.

2.2.3.4 Análisis microbiológicos

Para determinar el contenido microbiano de la bebida fermentada se basó en la norma (NTE INEN 2564, 2011), se pesó asépticamente 10 mL de bebida y se trasfirió a bolsas estériles (Sterilin, Stone, Staffordshire, Reino Unido) con 90 mL de agua de

peptona (Difco, Le Pont de Claix, France) 0,1 %. Las muestras se agitaron vigorosamente durante 1 minuto en un homogeneizador Stomacher (400C, Seward, Londres, Reino Unido).

Posteriormente se prepararon diluciones apropiadas para las siguientes determinaciones de microorganismos, (i) recuento de aerobios mesófilos, se utilizó agar PCA (Difco, Le Pont de Claix, France) y se inoculó 100 µL, incubadas a 30 °C durante 24 h, (ii) recuento de coliformes totales y Ecoli, se empleó compact dry y se inoculo 1000 ul incubados por 24 h a 37 °C, (iii) *Listeria monocytogenes* se empleó el medio BD Listeria Agar (Agar para Listeria) con la técnica vertido en placa, que se incubaron por 24 h a 37 °C.

Todos los recuentos se expresaron como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log UFC /ml). Todos los análisis se realizaron por duplicado. El ensayo se llevará a cabo durante 8 días a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración de 18 días.

2.2.4 Análisis Proximal

2.2.4.1 Determinación de humedad

Se determinó la humedad de acuerdo a la norma (AOAC 934.01, 1934). Se pesaron 3 g de muestra de la bebida en una cápsula vacía y tarada, y se secó en la estufa a 105 ± 1 °C durante 24 h hasta obtener un peso constante. Posteriormente, se enfrió en un desecador y se procedió a su pesaje. Los ensayos se realizaron por duplicado. El contenido de materia seca y humedad se calculó con las siguientes ecuaciones:

$$\%materia\ seca = \frac{(m3 - m1)}{(m2 - m1)} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

m1= peso de la capsula (g)

m2= Peso de la muestra + cápsula (g)

m3= Peso de la muestra seca + cápsula (g)

$$\% humedad = 100 - \% materia\ seca \quad \text{Ecuación 3}$$

3.2.4.2 Determinación de proteína

Para determinar el contenido de proteína en bebidas fermentadas se siguió la metodología de la norma (AOAC 2001.11, 2001). Para lo cual se pesaron 3 g de muestra y se añadieron 2 tabletas Kjendahl y 15 mL de H₂SO₄. La muestra se llevó a ebullición por 1 h hasta dar lugar al cambio de color de marrón a verde esmeralda. Posteriormente, la muestra se enfrió y se adicionaron 70 ml de agua destilada; una vez fría la muestra se añadieron 50 mL de NaOH 40 % (p /v), el contenido se introdujo en el destilador de proteína Vapodest Gerhardt (TT625, España) junto con 30 mL de H₃BO₃ 1 N contenido en un matraz para ser filtrado. El filtrado contenido se tituló con HCl 0,1 M hasta un cambio de color a rosa. El contenido de proteína se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Kjeldahl\ nitrógeno\ \% = \frac{(V_S * V_B) * M * 14,01}{W * 10} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$Proteína\ cruda,\ \% = \% Kjeldahl\ N * F \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

VS = volumen (ml) de ácido estandarizado usado para valorar una prueba

VB = volumen (ml) de ácido estandarizado usado para valorar el blanco de reactivo

M = molaridad de HCl estándar

14,01 = peso atómico de N;

W = peso (g) de la porción o estándar de prueba;

10 = factor para convertir mg / g en porcentaje;

F = factor para convertir N en proteína 6.25

2.2.4.3 Determinación de grasa

El contenido de grasa se determinó de acuerdo a lo descrito por la (NTE INEN 0012, 1973). Se pesaron 5 g de bebida previamente deshidratada en un capuchón, luego se tapó la parte superior del capuchón con algodón, después se conectó al extractor de grasa (SER 148 Velp® Scientifical), se agregaron 90 mL de éter dietílico en un vaso y finalmente se colocó en el equipo. La grasa de la muestra se extrajo durante 4 horas por proceso de ebullición y lavado. Finalmente, se recuperó el disolvente y se pesó la

grasa presente en el vaso. Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$\% \textit{grasa cruda} = \frac{m2 - m1}{m} * 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

m = peso de la muestra

m1 = peso del vaso

m2 = peso vaso con grasa

2.2.4.4 Determinación de fibra

La fibra dietética total se determinó por el método enzimático – gravimétrico de acuerdo a la (FAO, 1993) en el cual detalla que se pesó por duplicado 1 g de la muestra y se colocó en un vaso de precipitación al cual se le añadirá 50 mL de tampón fosfato pH 6,0. Adicionar 0,1 mL de la solución de a amilasa.

Se colocó en baño María y dejarlo hervir por 15 minutos con agitación continua a intervalos de 5 minutos a temperatura entre 95 - 100°C. Se ajustó el pH a $7,5 \pm 0,2$ con aproximadamente 10 mL NaOH 0,275 N. A lo que se le añadió 5 mg de proteasa y se incubará por 30 minutos a 60°C con agitación continua.

Se dejó enfriar y se añadió 10 ml de HCl 0,325 N. El pH final debe estar entre 4,0 - 4,6. Se adicionó 0,3 ml amiloglucosidasa y se incubó por 30 minutos a 60°C con agitación continua, a esto se adicionó 280 mL de etanol al 95 % precalentado a 60°C.

La muestra se dejó precipitar por 60 minutos. El crisol que contendrá celite se deberá humedecer y se redistribuirá el celite en el crisol usando etanol al 78 % y se aplicó succión. Se lavó el residuo sucesivamente con tres porciones de 20 mL de etanol al 78 %, dos porciones de 10 ml de etanol al 95 % y dos porciones de 10 mL de acetona. El tiempo de filtración y lavado variará de 1 a 6 horas con un promedio de 1 1/2 hora por muestra.

Se secó el crisol que contiene el residuo durante la noche en estufa (Lab Incubator Model: IN-0.10) a 70°C, se dejó enfriar y se registró su peso. Se calcinó el residuo de la segunda muestra del duplicado durante 5 horas a 525°C, se enfrió y se registró su peso para determinar cenizas. Finalmente se analizó proteínas usando N x 6,25 como factor de conversión en el residuo de una de las muestras de los duplicados.

Efectuar la determinación del blanco mediante la siguiente ecuación

$$B = \text{blanco, mg} = \text{masa del residuo} - Pb - Cb \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

Masa del residuo = promedio de masa del residuo (mg) para la determinación blanco.
PB y CB = masa (mg) de proteína y cenizas, respectivamente en los residuos de los blancos.

El cálculo del porcentaje de fibra dietética total se determina mediante la siguiente ecuación.

$$\% FDT = \frac{(m1 - P - C - B)}{m} * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

m = masa de la muestra = promedio de la masa de 2 muestras (mg).

m1 = masa del residuo = promedio de las masas de las muestras determinadas duplicado (mg).

P y C = masa (mg) de proteína y cenizas, respectivamente en los residuos de las muestras.

B = blanco

2.2.5 Calidad proteica

2.2.5.1 Análisis de Aminoácidos

Para este análisis la muestra fue hidrolizaron a 110°C durante 22 horas en ácido clorhídrico (HCl) 6 N, neutralizadas y su pH ajustado a 2,2 con buffer citrato 0,02 N. Luego se aforó el volumen a 100 mL con el mismo buffer; una alícuota de 10 mL fue filtrada a través de un filtro Millipore. Los hidrolizados fueron derivatizados usando orto-ftaladehido (OPA), siguiendo la metodología de Torres, Gómez, & Márquez, (1994).

Para el análisis se utilizó un Cromatógrafo Líquido Shimadzu®, integrado por dos bombas LC6A, una columna Alltex Ultrasphere ODS de 12,5 cm partículas de sílica de 5 m de diámetro, y un detector de fluorescencia FLC-6A. El flujo fue constante a 1 mL/min. La preparación de solventes, así como el gradiente, fue una modificación del método propuesto por Umagat, realizada por (Torres et al., 1994) La identificación y cuantificación de los aminoácidos se realizó por comparación con los tiempos de retención del estándar AA Sigma®.

2.2.6 Determinación de perfil de ácidos grasos

Después de extraer y cuantificar grasa por el método (NTE INEN 0012, 1973), se debe de obtener ésteres metílicos de las muestras a determinar, en un tubo de tapa rosca de 20 mL, se pesó aproximadamente 0.020 a 0.025 g de grasa extraída de la bebida. Se adicionó 2 mL de solución metanólica de KOH 0.5 M, dejando en ebullición durante 10 minutos y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 1 mL de solución metanólica de HCl colocando el tubo a baño maría a 50°C durante 25 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 3 mL de agua destilada ultra pura, Se colocó 10 mL de hexano grado cromatográfico y se agitó por 10 segundo, dejando reposar por 24 horas. Se extrajo aproximadamente 1.5 ml del extracto de hexano y se colocó en un vial cromatográfico, para su posterior separación en el cromatógrafo de gases (AOAC 996.06, 1996).

Las condiciones cromatográficas para la determinación de ácidos grasos en la bebida es la siguiente: Cromatógrafo de Agilent Technologies 7890^a GC System, equipado con un inyector Split-splitless Inlet, con una columna capilar de sílica fundida Omegawax Supelco 320 (60 m - 250 μ m - 0.2 μ m) y un detecto de ionización a la llama. El volumen de inyección fue de 0.2 μ L, por triplicado. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del puesto de inyección 80°C, temperatura del detector 260°C, temperatura inicial del horno 250°C durante 3 minutos, aumentados progresivamente hasta 240°C (10°C/min). Se utilizó el nitrógeno como gas transportador a un flujo lineal de aproximadamente 25 cm /seg. Los tiempos de retención y áreas de los picos se procesaron utilizando el software NIST MS 2.2 2.014. Para la identificación de los ácidos grasos se compararon los tiempos de retención y áreas de las muestras con la mezcla de estándares de referencia, Los ácidos grasos se cuantificaron a través de una relación porcentual de las áreas de los picos con el área total.

2.2.7 Diseño experimental

El presente trabajo comprendió dos secciones experimentales. En la primera sección, es a partir de la evaluación sensorial en olor, color, sabor, acidez y aceptabilidad se seleccionaron 2 tratamientos de un total de 12. Para ello se utilizó un diseño de bloques incompleto con b (bloques) =5, c (catadores) =10, según lo descrito por Cordero et al., (2017). Mientras que para la segunda sección se utilizó un diseño de tres factores

evaluando la proporción del sustrato, característica del salvado de arroz y el microorganismo utilizado. Con dos réplicas para obtener una interpretación eficaz de los resultados obtenidos con los factores de estudio.

A continuación, se detalla los diferentes factores y niveles que se evaluaron en la segunda sección.

Tabla 4: Factores y niveles del diseño experimental

Factores	Niveles
A: Proporción del sustrato	a0: 50-50
	a1: 80-20
	a2: 20-80
B: tipo salvado de arroz	b0: salvado entero
	b1: salvado molido
C: Microorganismo	c0: <i>Aspergillus orizae</i> light
	c1: <i>Aspergillus orizae</i> red

Tabla 5: Combinaciones experimentales

Tratamientos	Combinaciones	Proporción del sustrato	Tipo de salvado de arroz	Microorganismo
T1	a ₀ b ₀ c ₀	50-50	salvado entero	<i>Aspergillus orizae</i> light
T2	a ₀ b ₀ c ₁	50-50	salvado entero	<i>Aspergillus orizae</i> red
T3	a ₀ b ₁ c ₀	50-50	salvado molido	<i>Aspergillus orizae</i> light
T4	a ₀ b ₁ c ₁	50-50	salvado molido	<i>Aspergillus orizae</i> red
T5	a ₁ b ₀ c ₀	80-20	salvado entero	<i>Aspergillus orizae</i> light
T6	a ₁ b ₀ c ₁	80-20	salvado entero	<i>Aspergillus orizae</i> red
T7	a ₁ b ₁ c ₀	80-20	salvado molido	<i>Aspergillus orizae</i> light
T8	a ₁ b ₁ c ₁	80-20	salvado molido	<i>Aspergillus orizae</i> red
T9	a ₂ b ₀ c ₀	20-80	salvado entero	<i>Aspergillus orizae</i> light
T10	a ₂ b ₀ c ₁	20-80	salvado entero	<i>Aspergillus orizae</i> red
T11	a ₂ b ₁ c ₀	20-80	salvado molido	<i>Aspergillus orizae</i> light
T12	a ₂ b ₁ c ₁	20-80	salvado molido	<i>Aspergillus orizae</i> red

2.2.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se muestran con la media \pm desviación estándar y análisis de varianza (ANOVA) de tres factores de acuerdo a los experimentos. Cuando se detectaron diferencias significativas en los resultados se realizó un análisis de comparación múltiple mediante el test de Tuckey. Las diferencias se consideraron significativas al 95% de confianza. Para el análisis estadístico se emplearon los programas EXCEL®, SPSS® y Statgraphics Centurion®.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Crecimiento del microorganismo en el sustrato

En la Figura 1 se presenta la relación entre las proporciones de los sustratos utilizados (harina de amaranto, el salvado de arroz) y el tiempo (h), resultado de esta evaluación fue la mejor proporción es 50:50 (harina de amaranto, el salvado de arroz) considerada como la mejor, ya que el tiempo de colonización y fermentación es el más corto con respecto a los demás tratamientos; debiéndose principalmente a que la cascarilla de arroz molido, es el sustrato más indicado para el desarrollo de estructuras reproductivas para la generación de conidióforos y conidios (esporas) y la harina de amaranto posee la capacidad de mantener condiciones de humedad durante el ciclo de desarrollo del hongo (Yabid et al., 2008).

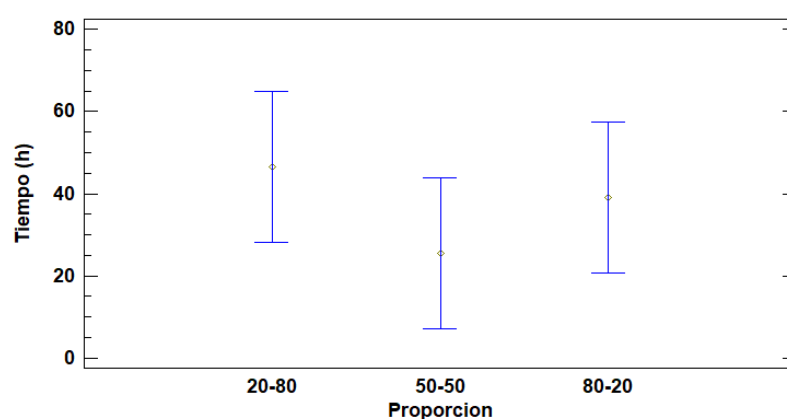


Figura 1: Prueba de Tukey al 95% de confianza para la variación de proporciones de sustratos, (20% de harina de amaranto – 80% de salvado de arroz; 50% de harina de amaranto – 50% de salvado de arroz; 80% de harina de amaranto – 20% de salvado de arroz)

El microorganismo utilizado fue *Aspergillus orizae* del tipo light y red en función del tiempo de fermentación, el que presentó menor tiempo de fermentación y colonización fue el de tipo red señalando diferencia significativa entre tratamientos, puesto que un valor-P es menor que 0,05 (Figura 2).

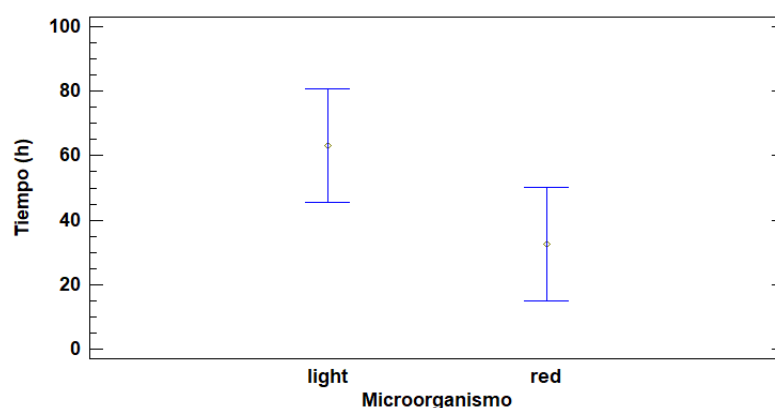


Figura 2: Prueba de Tukey al 95% de confianza para la variación de microorganismo utilizado en la fermentación sólida para la bebida de harina de amaranto y salvado de arroz (*Aspergillus orizae* tipo light ; *Aspergillus orizae* tipo red)

En la Figura 3, se observa que el tiempo de colonización del salvado es menor cuando al mismo se le ha sometido a un proceso de molienda, en la que se obtiene un menor tamaño de partícula, lo que beneficia al crecimiento del hongo. Se evaluó si el salvado de arroz es mejor entero o molido basándonos en el menor tiempo de fermentación, el cual fue el salvado molido. Los residuos agroindustriales presentan características fisicoquímicas adecuadas para utilizarse como sustratos en procesos de FMS. **(Parzanese, 2014).**

En general tienen un alto contenido de polisacáridos de glucosa, como celulosa y hemicelulosa, esto es de suma importancia para que actúen como fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, la presencia de lignina, en muchos casos es una limitante para el aprovechamiento de esos nutrientes, ya que ese compuesto limita la disponibilidad y el aprovechamiento de las fuentes de carbono por parte de algunos organismos. **(Parzanese, 2014).**

Para superar este obstáculo una alternativa implementada con éxito ha sido disminuir el tamaño de partícula del sustrato sólido, de esa forma se aumenta el área superficial disponible para los microorganismos, facilitando los procesos de degradación mediante el metabolismo enzimático y aumentando, por lo tanto, la disponibilidad de las fuentes de carbono **(Parzanese, 2014).**

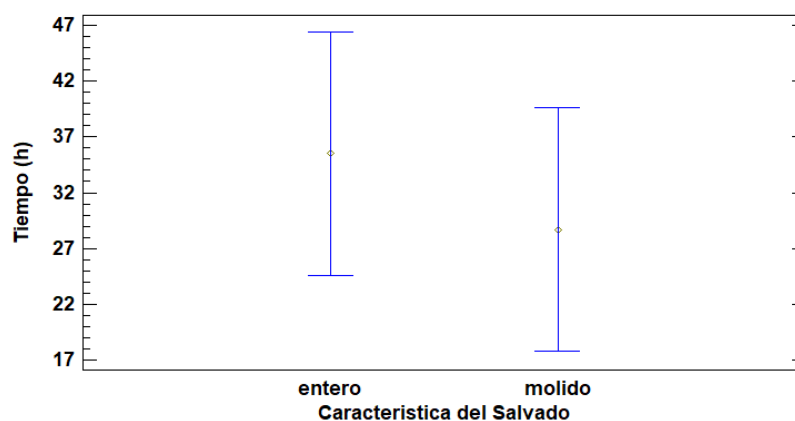


Figura 3: Prueba de Tukey al 95% de confianza para la variación de característica de salvado de arroz (entero; molido)

3.1.2 Evaluación Sensorial

El análisis sensorial se realizó con dos tratamientos T4 ($a_0b_1c_1$) (proporción 50-50; salvado molido; *Aspergillus orizae* red) y T8 ($a_1b_1c_1$) (proporción 80-20; salvado molido; *Aspergillus orizae* red) y una muestra control (sin ningún tipo de fermentación).

En la Tabla 6, se observa el análisis de varianza en el que se muestra que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), en los atributos de olor, color y acidez. Sin embargo, para el atributo de sabor y aceptabilidad, el valor de P evidenció que no existe diferencia significativa entre tratamientos. La diferencia con respecto al olor, se debe a que está relacionada con la acidez de la bebida; en Ecuador las bebidas fermentadas con olores muy fuertes siendo idóneos por el consumidor (**Molero M, Ronnón, Leal, & Zambrano, 2017**); con respecto al color, los resultados obtenidos podrían deberse a que existen diferencias sustanciales en la formulación de las bebidas, basadas en el uso de diferentes tipos de proporciones de sustratos, que en consecuencia se hayan afectado el nivel de agrado en referencia al color, finalmente la acidez, se debe a las bacterias ácido lácticas que producen pequeñas cantidades de acetaldehído y diacetilo por la fermentación de citratos, otorgando sabor agradable (**Parra, 2010**), interviniendo en su elaboración puede variar de acuerdo con la región, el procedimiento de inoculación, la materia prima y aun de las variaciones climática produciendo la acumulación de ácido acético, acetaldehído, ácido fórmico y ácido láctico (**Ramírez, Ulloa, Velázquez, & Romero, 2011**).

Tabla 6: Selección del mejor tratamiento mediante análisis sensorial de los diferentes tratamientos

Combinaciones	Tratamientos	Atributos				
		Olor	Color	Sabor	Acidez	Aceptabilidad
Control		2,1 ±0,30 ^a	3,9 ±0,75 ^b	3,0 ±0,66 ^a	1,2 ±0,23 ^a	3,4 ±1,01 ^a
a ₀ b ₁ c ₁	T4	2,8 ±0,19 ^b	3,6 ±0,19 ^{ab}	3,1 ±0,07 ^a	1,6 ±0,18 ^b	3,4 ±0,18 ^a
a ₁ b ₁ c ₁	T8	3,1 ±0,42 ^b	3,3 ±0,42 ^a	2,9 ±1,62 ^a	1,7 ±0,69 ^b	2,9 ±1,62 ^a

a, b, c Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas al 95% de confianza.

En la Figura 4, se muestra todo el perfil sensorial, en el cual se obtuvo mayores puntuaciones para el T4, siendo los parámetros más puntuados el sabor 34.2%, aceptabilidad 35.5% y olor con 34.7%, esto se debería principalmente por uno de los componentes del sustrato que es el salvado de arroz, que en general tiene un alto contenido de polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y glucosa; estos componentes son de suma importancia, ya que actúan como fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos (**Parzanese, 2014**), esta diferencia se nota en el porcentaje de sustrato utilizado para cada tratamiento, en el T4 se utilizó 50% -50% de harina de amaranto y salvado de arroz y para el T8 se utilizó 80% -20% de harina de amaranto y salvado de arroz. Los siguientes análisis se realizaron con el mejor tratamiento que fue en este caso el tratamiento 4 (T4).

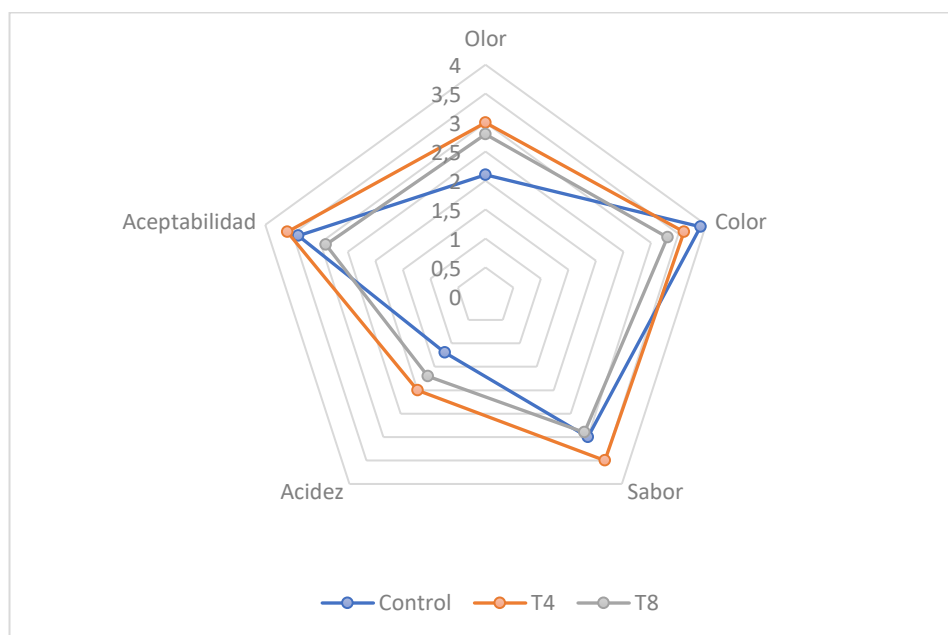


Figura 4: Perfil sensorial del control, T4 (a₀b₁c₁) (proporción 50-50; salvado molido; *Aspergillus orizae* red) y T8 (a₁b₁c₁) (proporción 80-20; salvado molido; *Aspergillus orizae* red)

3.1.3 Vida útil del mejor tratamiento

3.1.3.1 pH y acidez

Durante el período de almacenamiento (21 días) la acidez aumentó y el pH disminuyó en el tratamiento evaluado. En la Figura 5 se observa que el pH inicial del mejor tratamiento T4 (a₀b₁c₁) (proporción 50-50; salvado molido; *Aspergillus oryzae* red) a temperatura ambiente y refrigeración es de 6.10, paulatinamente el pH a temperatura ambiente va descendiendo hasta llegar a un pH de 4.01, la norma menciona que, el pH para bebidas fermentadas debe de ser menor a 4.55 (**Agencia de Seguridad Alimentaria, 2010**); mientras el pH para temperatura de refrigeración llega a un máximo de 4.95, dicho valor se encuentra dentro de la norma, por lo tanto esta condición de almacenamiento, cumple con este parámetro.

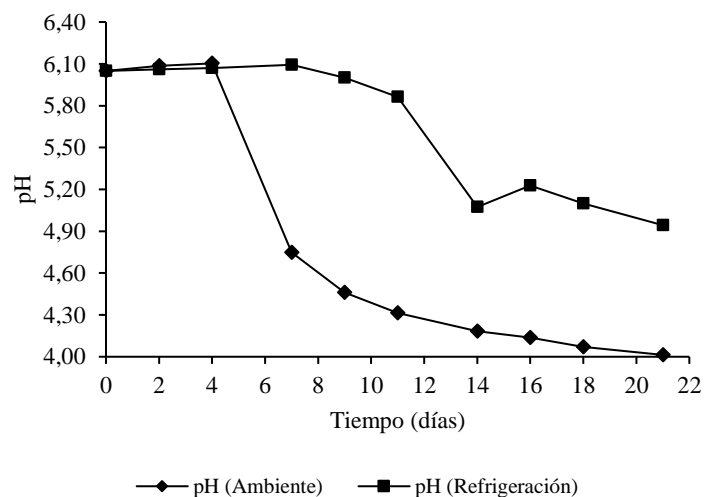


Figura 5: Evolución del pH para determinación de vida útil a temperatura ambiente y refrigeración

El análisis del pH se realizó durante 21 días de almacenamiento, estos presentaron una tendencia descendente a las dos temperaturas de estudio (20°C y 4°C), para el almacenamiento a temperatura ambiente se ajustó a una cinética de deterioro de orden 2. Sin embargo, durante el tiempo de experimentación de la bebida, cada día disminuía el pH, a esta temperatura se dilucido que la vida útil se encuentra en 15 días, el tiempo obtenido es similar a bebidas fermentadas de marcas comerciales (10 días). A temperatura de refrigeración (4 ± 1) el tiempo de vida útil se prolongó hasta 25 días

con un orden de reacción 1, porque se conservó por debajo del pH de 4.55 (**Agencia de Seguridad Alimentaria, 2010**), a esta temperatura de almacenamiento el producto presentó una relación inversa, es decir a menor temperatura mayor tiempo de vida útil (Tabla 7).

Tabla 7: Tiempo de vida útil para el parámetro de pH

Temperatura (°C)	Orden de reacción (n)	Tiempo (días)
Ambiente (20 ± 1)	2	15
Refrigeración (-4 ± 1)	1	25

El parámetro de la acidez inició con 0.14% de ácido láctico a las dos temperaturas de almacenamiento, posteriormente a temperatura ambiente (20 ± 1 °C) la acidez aumentó hasta llegar a 0.62% de ácido láctico, según la normativa del Codex Alimentarius las bebidas fermentadas deben encontrarse hasta 0.3% (**CODEX STAN 243, 2003**); con respecto a la acidez de la bebida almacenada en temperatura de refrigeración llega a un máximo de 0.22 %, encontrándose está dentro de la norma.

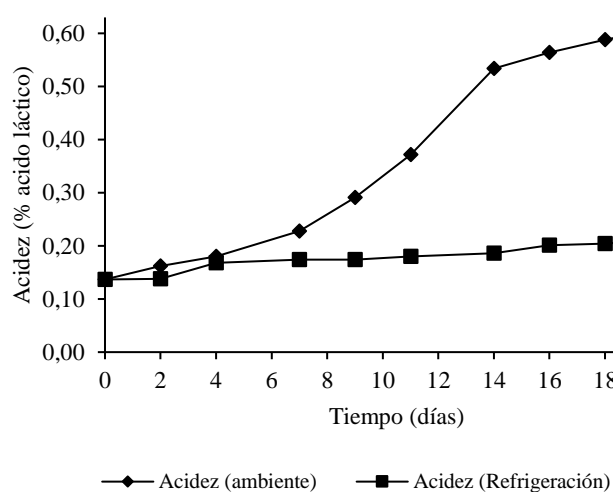


Figura 6: Evolución de la acidez para determinación de vida útil a temperatura ambiente y refrigeración

El análisis de la acidez se realizó durante 21 días de almacenamiento, cada uno de los tratamientos presentó una tendencia ascendente a las dos temperaturas de estudio (20°C y 4°C); al mantener la bebida a temperatura ambiente se ajustó a una cinética de deterioro de orden 1, por lo tanto, la muestra a esta temperatura presentó una vida útil de 10 días similares a bebidas fermentadas de marcas comerciales (10 días). A temperatura de refrigeración (4 ± 1) el tiempo de vida útil incrementó hasta 28 días

con un orden de reacción 0, porque se conservó por debajo de la acidez que es 0.3 % (CODEX STAN 243, 2003).

Tabla 8: Tiempo de vida útil para el parámetro de acidez

Temperatura (°C)	Orden de reacción (n)	Tiempo (días)
Ambiente (20 ± 1)	1	10
Refrigeración (-4 ± 1)	0	28

3.1.3.2 Concentración de la proteína

Se construyó la curva de calibración en el rango de concentración de 0-30 µL/ML usando 5 niveles (0, 5, 10, 20, 30 µl/ml) se obtuvieron de los valores de la pendiente y del intercepto de la curva de calibración de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Absorbancia} = 0.001x + 0.1503$$

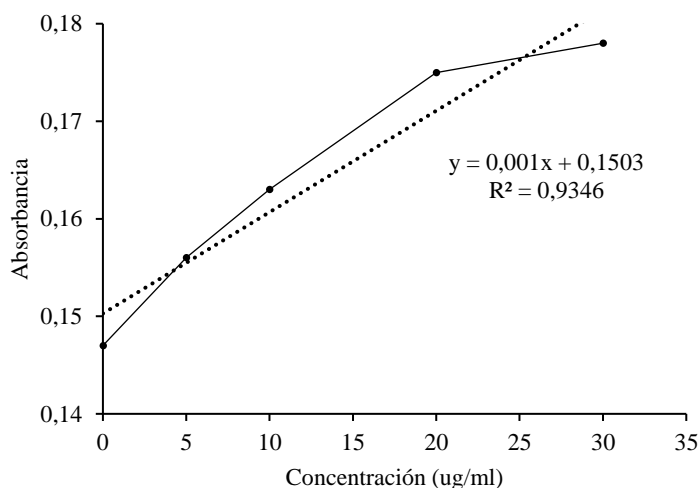


Figura 7: Curva de calibración para concentración de proteína

En la Figura 8 muestra que, existe descenso en las concentraciones durante el tiempo; está pérdida de proteína no está asociado a la estabilidad del producto, ya que mantiene su comportamiento dentro del rango, por lo que podemos asumir que el producto mantiene su estabilidad durante los estudios realizados. El promedio de las concentraciones en la proteína a temperatura ambiente, se distribuyen alrededor del valor medio con una ligera tendencia a la disminución de hasta 36.77 %; esto puede estar causado por el proceso de hidrólisis de las proteínas, que tiene lugar en dos etapas: la desnaturalización y la degradación, esta última implica la pérdida total de la actividad de la proteína (Falcón et al., 2014). A esto se debe a que las proteínas generalmente son inestables cuando son conservados a temperatura ambiente

(aproximadamente 25°C) en medios líquidos, así en pocas horas comienzan a aparecer estos fenómenos (Ramirez & Alvarez, 2009). A comparación de la temperatura de refrigeración que disminuyó hasta un 22.48 % el cual no afecto la estabilidad de la proteína.

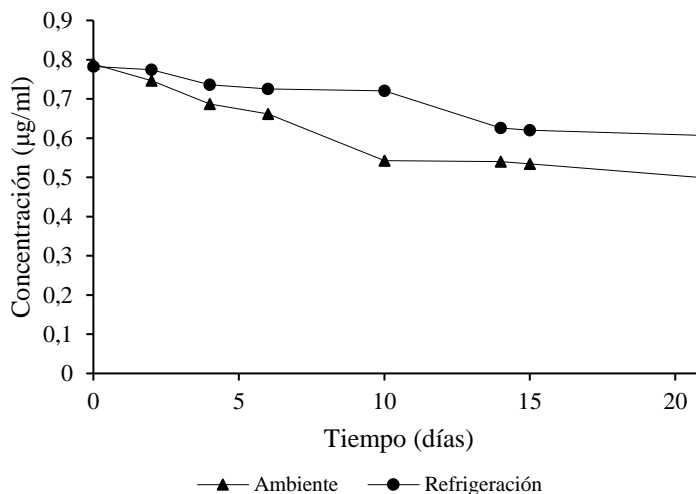


Figura 8: Concentración de la proteína (µg/ml) a temperatura ambiente y refrigeración

3.1.3.3 Análisis microbiológico

Los resultados reportados se realizaron solo para el tratamiento 4 (T4; proporción 50-50; salvado molido; *Aspergillus orizae*), por duplicado y a diferentes temperaturas de almacenamiento. En la Tabla 9 se observa que la bebida a base de harina de amaranto y salvado de arroz con doble fermentación cumple con los parámetros microbiológicos de acuerdo a la NTE INEN 2564, (2011), porque existe una ausencia en el recuento de dichos microorganismos.

Tabla 9: Resultado de los análisis microbiológicos para la bebida fermentada

Parámetros microbiológicos	Requisitos de la Norma INEN 2564		Resultados del T4
	N	M	
Recuento de coliformes (UFC/ml)	< 1	10	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/ml)	Ausencia	-	Ausencia
Recuento de <i>Escherichia coli</i> , (UFC/ml)	< 1	-	Ausencia

En cuanto al recuento de microorganismos aerobios mesófilos el crecimiento fue evidente en todos los días (Figura 9) a las diferentes temperaturas de almacenamiento, a temperatura ambiente se evidenció un incremento respecto al tiempo de almacenamiento, ya que alimentos fermentados son vehículos importantes de enormes cantidades de bacterias ácido lácticas vivas (Parra, 2010). Además estas bacterias toleran pH de 3.2 a 9.6 permitiendo sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían (Santolaya, 2016).

A temperatura de refrigeración el recuento de aerobios mesófilos solo fue evidente el último día de conteo, esto se debe a que a esta temperatura actúa como una barrera para su desarrollo (Zamora, 2003) y su principal objetivo es incrementar la vida útil de este producto y en consecuencia incrementar sus posibilidades de conservación (Casp & Abril, 2000)

Con base a los resultados obtenidos, el tiempo de vida de anaquel por el método de supervivencia fue de 10 días a temperatura ambiente (20°C) y 21 días a temperatura de refrigeración (4°C).

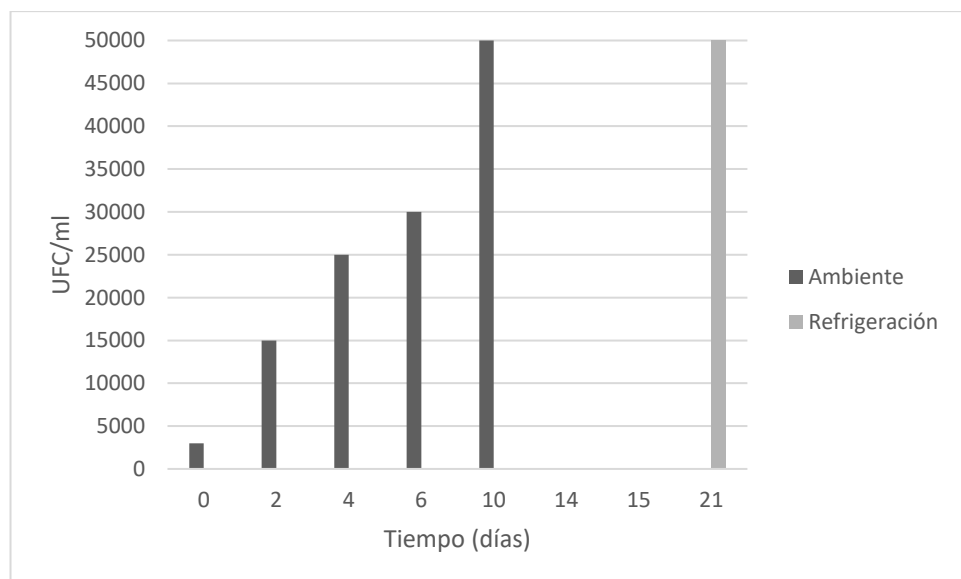


Figura 9: Recuento de aerobio mesófilos para el T4

3.1.4 Análisis Proximal

Los resultados del análisis proximal (Figura 10) realizados para la bebida fermentada T4, donde se puede apreciar ciertas diferencias con los datos bibliográficos, lo que confirma que existe diversidad en cuanto al procedimiento empleado que se realiza durante la elaboración de la bebida. Los efectos en la composición proximal debido a

la fermentación se observa una disminución en el contenido de la proteína de 1.48%, contenido de grasa de 2.28%, el contenido de fibra de 2.07 % y las cenizas 0.73 % como consecuencia del metabolismo celular. El hongo utiliza carbohidratos y fibra, disminuyendo en el contenido de grasas y minerales utilizados por él, produciendo proteína. Las disminuciones en el contenido de proteína y de cenizas coinciden con Almarza, (2007). La degradación puede ser explicada por utilización de biosíntesis y producción de energía requerida para el crecimiento del hongo: los carbohidratos fueron más disponibles para el microorganismo mediante proceso de tostado. La cepa utilizada de *Aspergillus orizae* tiene la capacidad de utilizar los polímeros del salvado de arroz (Casp & Abril, 2000) (Vargas, 1978).

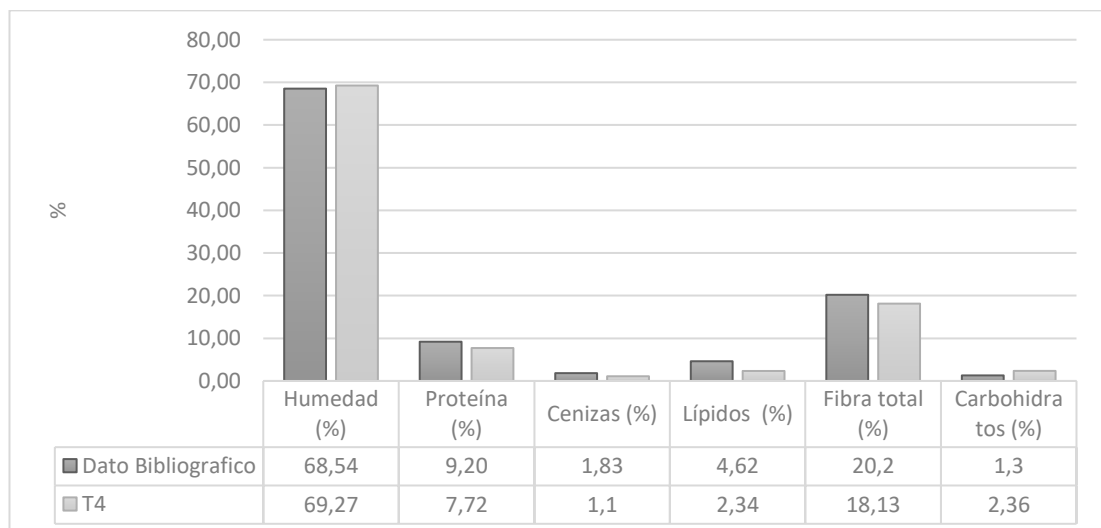


Figura 10: Resultados del análisis proximal del T4

3.1.5 Análisis de Perfil de Aminoácidos

En la Figura 11 se muestra los resultados obtenidos. Se puede establecer que existe 17 aminoácidos con una concentración de 18.13 g/100g para la bebida fermentada el que se encontró con mayor proporción es el ácido Glutámico (Glu) 1.46g/100g, cumple la función de mejorar el rendimiento físico y la reduce la fatiga. Es esencial para la síntesis de ADN y del ARN y ayuda a proteger el organismo y mejora el sistema inmunológico (García, 2015). Con respecto a los aminoácidos esenciales que son provenientes de fuentes alimentarias y que nuestro cuerpo no los produce tenemos: Fenilalanina (Phe), Lisina (Lys), Histadina (His), Valina (Val), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Treonina (The), la fuente de estos aminoácidos proviene principalmente del suero de leche las proteínas del suero se han utilizado

durante muchos años como suplementos alimenticios de alto valor nutritivo (Hernández & Vélez, 2016), debido a su capacidad para proporcionar aminoácidos esenciales. El comportamiento de las proteínas de suero en el intestino es muy distinto a las de la caseína. La caseína micelar forma coágulos dentro del estómago, lo que ralentiza su salida y aumenta su hidrólisis antes de entrar en el intestino delgado. Las proteínas del suero son más rápidas y llegan al yeyuno casi inmediatamente después de entrar en el estómago. Sin embargo, su hidrólisis en el intestino es más lenta que de la caseína. Esto causa que la digestión y la absorción se produzca a través de una mayor longitud del intestino (Jovanovic, Barac, & Macej, 2005). También es posible en gran parte que provengan de la harina de amaranto que contiene principalmente Leucina, Lisina, Treonina, Valina (FAO, 1995).

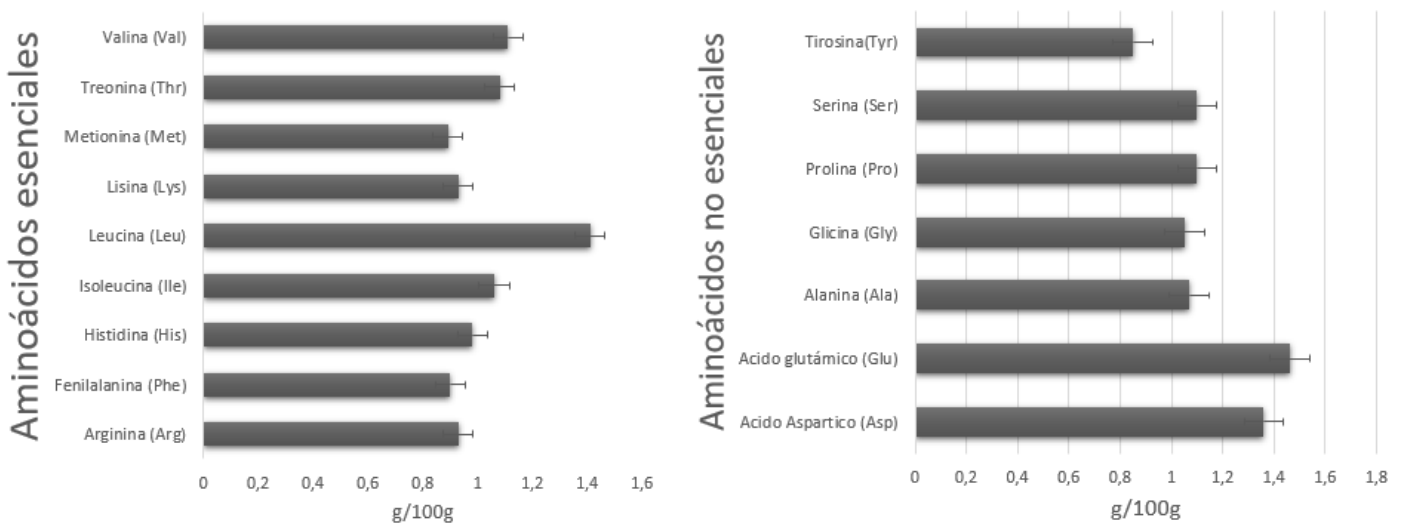


Figura 11: Perfil de aminoácidos relacionados a la bebida fermentada

Principalmente para la bebida se centra en el contenido de Serina, ya que es necesario para el correcto metabolismo de las grasas y ácidos grasos, el crecimiento del músculo y el mantenimiento del sistema inmunológico saludable, cubre las fibras nerviosas. La prolina ayuda a la producción de colágeno y a reducir la pérdida de esta, ayuda a cicatrización de cartílagos y el fortalecimiento de las articulaciones, los tendones y los músculos del corazón, con ayuda de la vitamina C ayuda a mantener sanos los tejidos conectivos. Y finalmente el aminoácido Fenilalanina eleva el estado de ánimo, disminuye el dolor ayuda a la memoria y aprendizaje (Swit, 2010).

3.1.6 Análisis de perfil de ácidos grasos

Se representa los ácidos grasos saturados (Figura 12) en la muestra control (sin ningún tipo de fermentación) y en muestra de la bebida fermentada, en donde en ambas muestras existe ácido esteárico (C 18:0) y el ácido palmítico (C 16:0), con contenidos que presentan la mayor concentración de la fracción con valores de 6.62% y de 24.92% respectivamente. Estos valores están dentro del rango encontrados recientemente para bebidas fermentadas, en el caso de ácido esteárico esta entre el 11 y 16% y ácido palmítico esta entre el 19 y 28% (Marlen & Ortiz, 2016). Otros ácidos grasos encontrados en menor proporción para ambas muestras fueron el ácido láurico (C12:0), cáprico (C 10:).

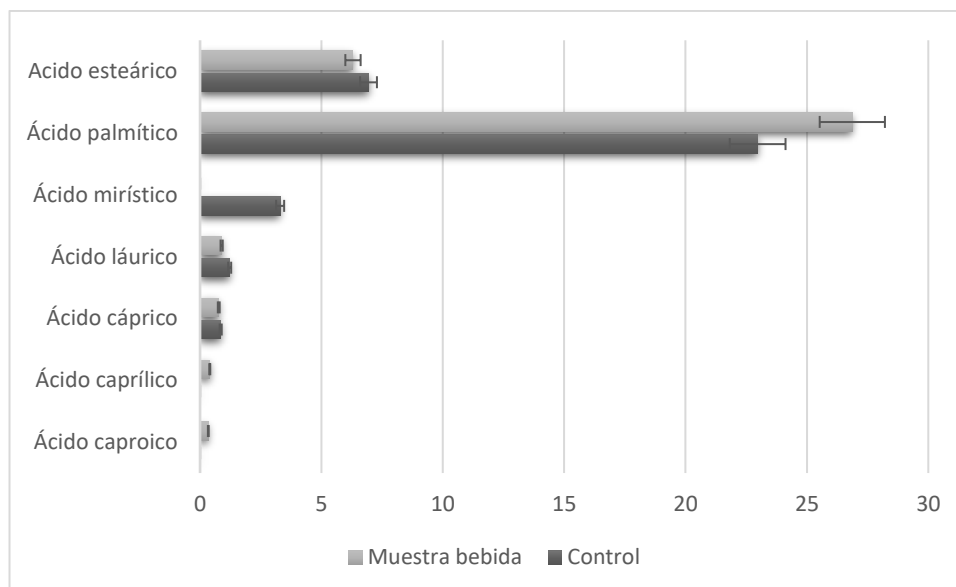


Figura 12: Perfil de ácidos grasos saturados del control y muestra de bebida fermentada

La fracción monoinsaturados (Figura 14) representa el 27.41% siendo el ácido oleico (C 18:1) el predominante en esta matriz alimentaria tanto para la muestra control como para la muestra de la bebida fermentada y el ácido mirístico (C 14:1) para la muestra de la bebida fermentada. Según Marlen & Ortiz, (2016), señala que en bebidas fermentadas existe este ácido oléico entre un 19 y 28% y en menores proporciones el ácido mirístico entre 1.5 y 4%.

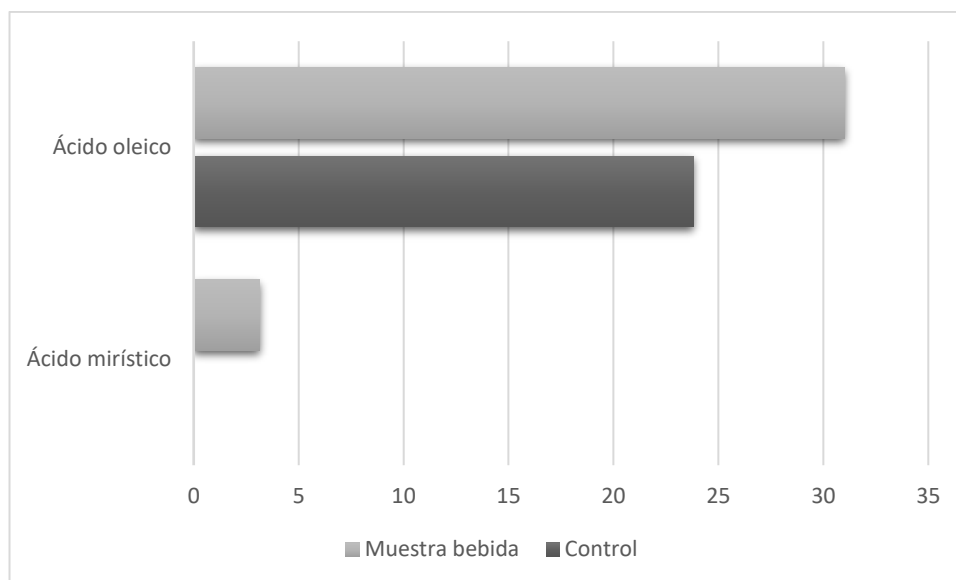


Figura 13: Perfil de ácido graso monoinsaturado del control y muestra de bebida fermentada

Finalmente, la fracción de poliinsaturados constituye el 25 % del total encontrándose en ambas muestras, el ácido graso insaturado es el ácido linoleico (C18:2) que se encontró la mayor proporción en la bebida fermentada con un 28.33 %. Principalmente este ácido graso proviene de la materia prima, porque se encuentra normalmente en tejidos y/o secreciones (leche) de rumiantes y es formado por la isomerización del ácido linoleico (**Fallis, 2013**) y además la principal característica del salvado de arroz es su alto contenido en grasa poliinsaturada (4% de ácido linoleico) (**Fedna, 2015**). El ácido linoleico (18:2, 9c-12c), es un ácido graso esencial omega-6 muy abundante en el reino vegetal y también animal (**Sanhueza, Nieto, & Valenzuela, 2002**). En la actualidad se le considera como un "regulador metabólico", y a continuación, aunque en forma no exhaustiva, se resumen sus principales efectos y/o funciones (**Pariza, 1990**).

3.2 Verificación de la Hipótesis

Mediante el respectivo análisis de datos ANOVA de cada ensayo, considerando un nivel de confianza de 95%, se rechaza la hipótesis nula, concluyéndose que después de realizar todos los estudios correspondiente con respecto al mejor tratamiento T4 de la bebida fermentada, se acepta la hipótesis alternativa, debido a que en los experimentos realizados se muestra que la harina de amaranto y salvado de arroz inciden directamente en el análisis sensorial y proximal, específicamente en los valores de proteína, grasa y fibra.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Se desarrollo una bebida láctea con fermentación sólida a base de harina de amaranto y salvado de arroz por un tiempo de 72 horas y fermentación líquida a base de suero de leche liofilizado por 5 horas.
- Se determinó la proporción adecuada de la de los cereales utilizados que fue de 50:50 % de harina de amaranto y salvado de arroz porque este tuvo un menor tiempo de fermentación.
- Se evaluó las características sensoriales el cual el mayor aceptado fue el T4 (a₀b₁c₁) (proporción 50-50; salvado molido; *Aspergillus orizae* red) con 35.5% de aceptabilidad.
- Se evaluó la calidad del producto final y del mejor tratamiento mediante análisis proximal el cual contiene un 69.27 % de humedad, 7.72 % de proteína, 1.1 % de cenizas, 2.34 % de lípidos, 18.13 % fibra total, y 2.36 % de carbohidratos. Para el perfil de ácidos grasos saturados contiene ácido palmítico (C 16:0) 24.92% y ácido esteárico (C 18:0) 6.62% en mayor proporción, monoinsaturados contiene ácido oleico (C 18:1) y poliinsaturados constituye el 25 % ácido linoleico (C18:2). Y finalmente para el perfil de aminoácidos se 17 aminoácidos con una concentración de 18.13 g/100g se encontró con mayor proporción es el ácido Glutámico (Glu) 1.46g/100g
- Durante 21 días se efectuaron pruebas preliminares como acidez, pH, concentración de la proteína y análisis microbiológico, con base a los resultados obtenidos, el tiempo de vida de anaquel por el método de supervivencia fue de 10 días a temperatura ambiente (20°C) y 21 días a temperatura de refrigeración (4°C).

MATERIAL DE REFERENCIA

- Agencia de Seguridad Alimentaria. (2010). *LECHES FERMENTADAS: ASPECTOS NUTRITIVOS, TECNOLÓGICOS Y PROBIÓTICOS MÁS RELEVANTES*.
- Almarza, M. (2007). *Determinación de la Composición Química y Propiedades Físicas y Químicas del Pulido de Arroz (Oryza sativa L.)*. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/far696d/doc/far696d.pdf>
- AOAC 934.01. (1934). AOAC 934.01. Loss on Drying (Moisture) at 95°-100°C por feeds.
- AOAC 996.06. (1996). Determinación del perfil de ácidos grasos.
- Aune, D. (2011). *El consumo diario de fibra reduce el cáncer colorrectal - BBC Mundo*. EEUU.
- Casp, A., & Abril, J. (2000). *Procesos de conservación de alimentos*. (Mundi-Prensa, Ed.) (AMV). Madrid: Tecnología de alimentos.
- CODEX STAN 243. (2003). NORMA DEL CODEX PARA LECHES FERMENTADAS.
- Cordero, G., Malegori, C., Grassi, S., & Arroyo, T. (2017). *Análisis Sensorial de los Alimentos*. Retrieved from
- Dominguez, A. M., Moreno, L., & Ramos, G. (2009). Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(4), 358–368.
- Falcón, Y., Quesada, L., Sosa, O., Fernández, S., Ruiz, M., & García, L. (2014). *Estabilidad de un suero control para proteínas totales como controlador bioquímico en los laboratorios clínicos*. *Revista Archivo Médico de Camagüey* (Vol. 18). 1996, Editorial Ciencias Médicas Camagüey.
- Fallis, A. . (2013). Leche. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9),

1689–1699.

FAO. (1993). MANUAL DE TECNICAS PARA LABORATORIO DE NUTRICION.

FAO. (1995). Cultivos Andinos FAO - NUTRICION Y COMPOSICION QUIMICA.
Retrieved December 8, 2018,

Fedna. (2015). Salvado de arroz blanco rico en grasa (17% EE) | FEDNA.

García, A. (2015). *Biomoléculas compuestas orgánicas: Proteínas y biocatalizadores*.

Greco, N. (2010). *ESTUDIO SOBRE TENDENCIAS DE CONSUMO DE ALIMENTOS Primera Parte-Generalidades y Casos Datos relevantes para la toma de decisiones en la*. Madrid.

Hernández, M., & Vélez, J. F. (2014a). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13–22. Retrieved from

Hernández, M., & Vélez, J. F. (2014b). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 13–22.

Hernández, M., & Vélez, J. F. (2016).), *la fuente de estos aminoácidos proviene principalmente del suero de leche las proteínas del suero se han utilizado durante muchos años como suplementos alimenticios de alto valor nutritivo*. México.

Jovanovic, S., Barac, M., & Macej, O. (2005). Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljerkarstvo*, 3, 215–233.

Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490.

Marlen, Á., & Ortiz, A. (2016). *Elaboración de una bebida láctea fermentada enriquecida naturalmente con ácidos grasos esenciales*.

- Molero, M., Flores, C., Leal, M., & Briñez, J. (2017). Sensory Evaluation of Probiotic Fermented Beverges Based on Whey. *Universidad Del Zulia*, XXVII, 70–77.
- Molero M, Ronnón, C., Leal, R., & Zambrano, M. (2017). EVALUACIIN SENSORIAL DE BEBIDAS ROBITICAS ERMENTADAS A BASE DE LACTOSUERO, XXVII, 70–77.
- NTE INEN 0012. (1973). NTE INEN 0012: Leche. Determinación del contenido de grasa.
- NTE INEN 0013. (1984). NTE INEN 0013: Leche. Determinación de la acidez titulable.
- NTE INEN 0973. (1983). NTE INEN 0973: Agua potable. Determinación del pH: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- NTE INEN 2564. (2011). NTE INEN 2564: Bebidas lácteas. Requisitos.
- Pariza, H. (1990). Conjugated dienoic derivaties of linoleic acid a new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother, Med Oncol Tumor Pharmacother*.
- Parra, R. (2010). REVIEW LACTIC ACID BACTERIA: FUNTIONAL ROLE IN THE FOODS. *Tecnología de Alimentos*, 8. Retrieved from
- Parzanese, M. (2014). *Tecnologías para la industria de alimentos FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO: APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA FICHA N° 27*.
- Quintero, R., & López, A. (1993). *Biotechnología alimentaria*. Limusa.
- Ramirez, A., & Alvarez, M. (2009). MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE PEPTIDOS O PROTEÍNAS, II, 2.

- Ramírez, J., Ulloa, R., Velázquez, M., & Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Universidad Autónoma de Nayarit, VII*.
- Saltos, A. (2010). Sensometría, Análisis en el Desarrollo de Alimentos Procesados. *Alimentos Procesados*.
- Sanhueza, J., Nieto, S., & Valenzuela, A. (2002). ACIDO LINOLEICO CONJUGADO: UN ACIDO GRASO CON ISOMERIA TRANS POTENCIALMENTE BENEFICIOSO. *Revista Chilena de Nutrición*, 29(2), 98–105.
- Swit, R. (2010). Aminoácidos y sus Funciones. *USF*, 3.
- Torres, O., Gómez, E., & Márquez, E. (1994). Análisis de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución usando un gradiente binario y un sistema temario de solventes.
- Vargas, R. (1978). *COMPOSICION QUIMICA DE SUBPRODUCTOS DE TRIGO Y ARROZ Y DE GRANOS*. *Agron. Costarr* (Vol. 2).
- Wacher, C. (2014). *LA BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA ANTIGUA: LOS ALIMENTOS FERMENTADOS* (Vol. 15). Retrieved from
- Yabid, E., Ramos, A., Ignacio, R., Navarro, Z., Eliécer, L., Zumaqué, O., ... Violeth, B. (2008). *Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de Trichoderma sp. Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing Trichoderma sp. spores*. Bogotá.
- Yenizey, D., & Alvarez, M. (2015). *Historia de la Fermentación*. Retrieved from http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/historia_de_la_fermentacion.pdf
- Zamora, L. (2003). *AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE*

*CULTIVOS DE BACTERIAS LÁCTICAS ANTAGONISTAS DE MICROBIOTA
CONTAMINANTE DE SANGRE DE MATADERO.* Universidad de Girona.

ANEXOS

ANEXO A

Cromatogramas de perfil de ácidos grasos

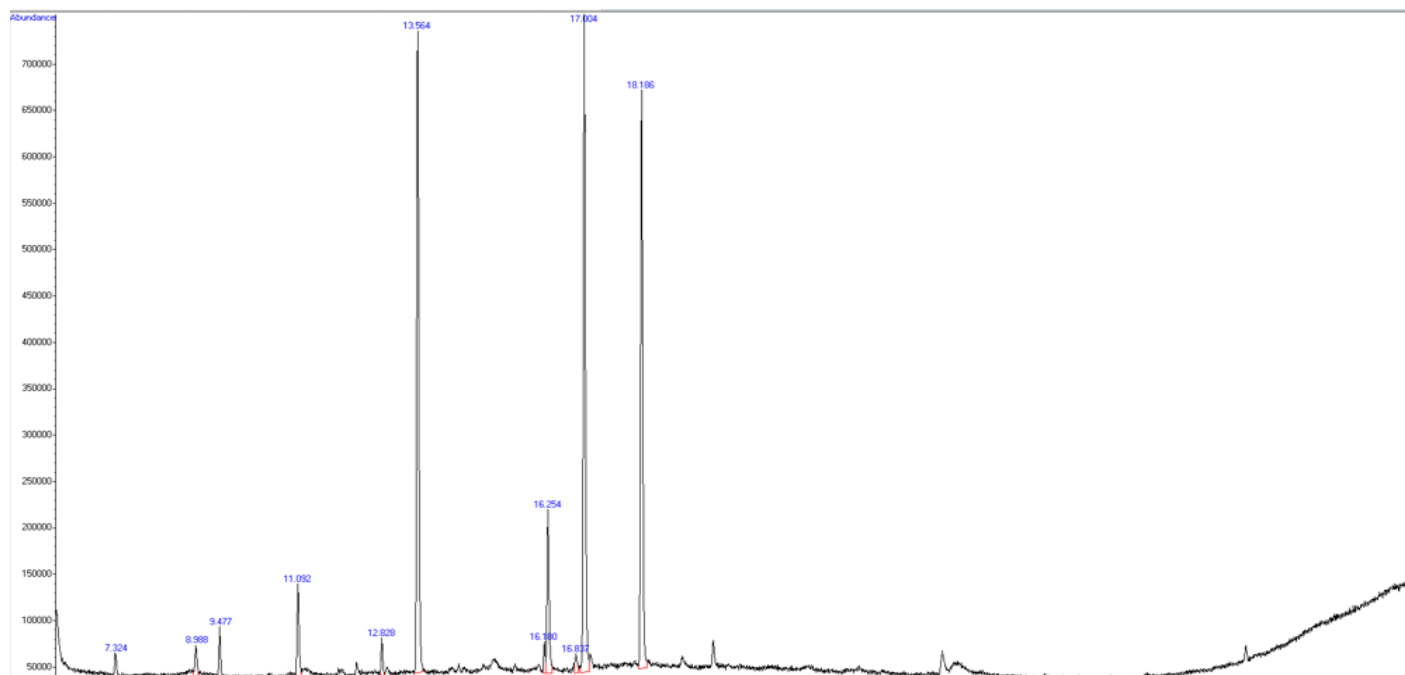


Figura 14: Perfil cromatográfico de ácidos grasos (muestras control no posee ninguna fermentación)

Tabla 10: Descripción del perfil cromatográfico de ácidos grasos para la muestra control

Pk #	Tiempo de Retención (R T)	Librería	Área %	Cas #	Nombre Común	Representación (saturados e insaturados)
1	7.324	Decanoic acid, methyl ester	0.85	000110-42-9	ácido cáprico	C10:0
2	8.988	Dodecanoic acid, methyl ester	1.22	024828-61-3	ácido láurico	C12:0
4	11.092	Methyl tetradecanoate	3.30	000124-10-7	Ácido mirístico	C14:0
6	13.564	Hexadecanoic acid	22.97	000112-39-0	ácido palmítico	C16:0
8	16.254	Methyl stearate	6.94	000112-61-8	Acido esteárico	C18:0
10	17.004	9-Octadecenoic acid, methyl ester	23.82	001937-62-8	ácido oleico	C18:1
18	18.186	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	21.66	000112-63-0	ácido linoleico	C18:2

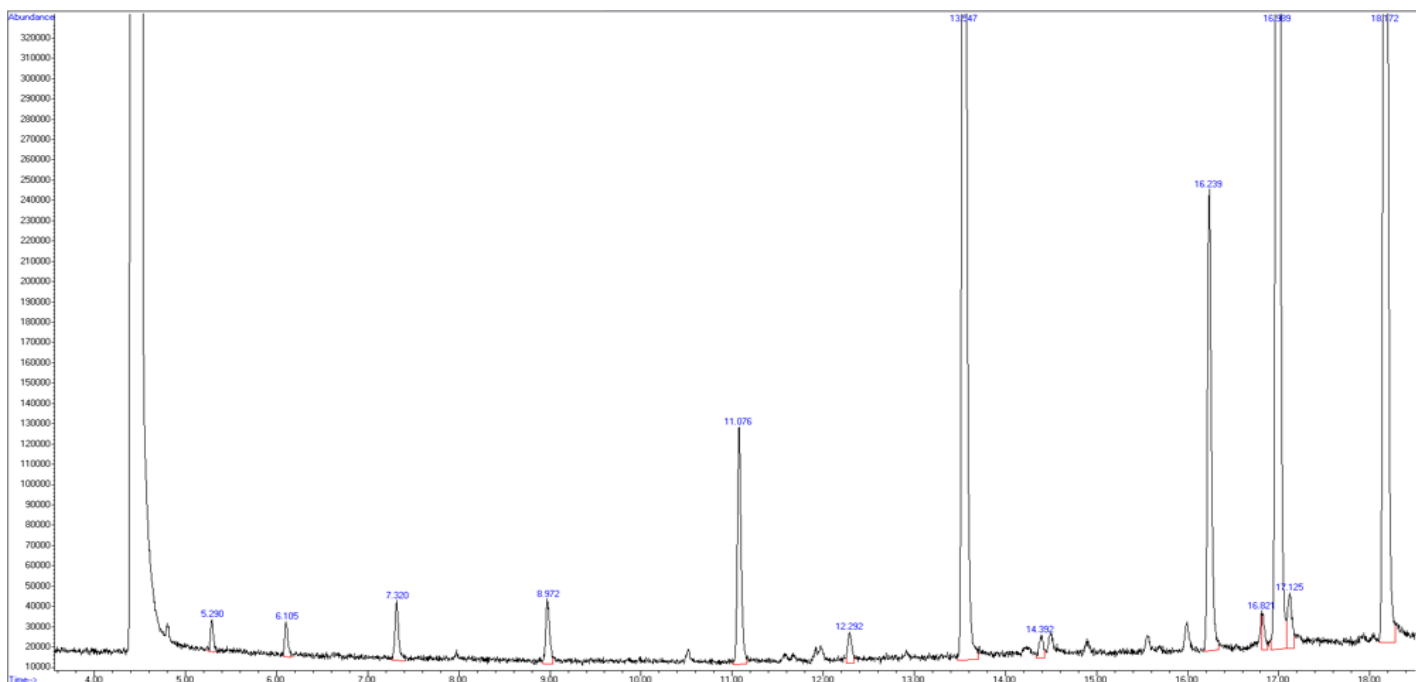


Figura 15: Perfil cromatográfico de ácidos grasos de la bebida fermentada T4

Tabla 11: Descripción del perfil cromatográfico de ácidos grasos para la muestra de la bebida

Pk #	Tiempo de Retención (R T)	Librería	Área %	Cas #	Nombre	Representación (saturados e insaturados)
1	5.290	Hexanoic acid, methyl ester	0.34	000106-70-7	ácido caproico	C6:0
2	6.105	Octanoic acid, methyl ester	0.40	000111-11-5	Ácido caprílico	C8:0
3	7.320	Decanoic acid, methyl ester	0.77	000110-42-9	ácido cáprico	C10:0
4	8.972	Dodecanoic acid, methyl ester	0.89	000111-82-0	ácido láurico	C12:0
5	11.076	Methyl tetradecanoate	3.14	000124-10-7	Ácido mirístico	C14:1
7	13.547	Hexadecanoic acid, methyl ester	26.87	000112-39-0	ácido palmítico	C16:0
9	16.239	Methyl stearate	6.30	112-61-8	Acido esteárico	C18:0
11	16.989	9-Octadecenoic acid	31.00	001937-62-8	ácido oleico	C18:1
13	18.172	9,12-Octadecadienoic acid	28.33	000112-63-0	ácido linoleico	C18:2