

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**"ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE UN PRODUCTO DESHIDRATADO  
ELABORADO A BASE DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) , FORTIFICADO  
CON HIERRO Y ÁCIDO ASCÓRBICO".**

Proyecto de graduacion presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos  
como requisito parcial para optar por el grado de  
Licenciatura en Tecnología de Alimentos.

**ARTURO CÓRDOBA SEQUEIRA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

**SAN JOSÉ, COSTA RICA**

**1998**

**Proyecto de graduacion presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos.**

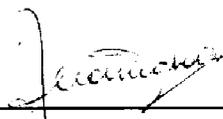
**ARTURO CÓRDOBA SEQUEIRA**

Aprobado por:



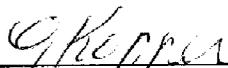
---

**Ana Ruth Bonilla Leiva, Ph. D.  
Directora del Proyecto**



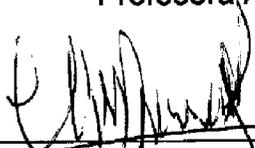
---

**Mónica Lois Martínez, M. Sc.  
Profesora Asesora**



---

**Gisela Kopper Arguedas, M. Sc.  
Profesora Asesora**



---

**Carlos Herrera Ramírez, M.Sc.  
Miembro Invitado**



---

**Ruth De la Asunción Romero, M. Sc.  
Presidenta del Tribunal**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
1998**

## RECONOCIMIENTO

Este proyecto de graduación fue elaborado en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), a través del proyecto de Investigación "Mejoramiento de la digestibilidad del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y desarrollo de un producto infantil ", el cual pertenece al programa "The Bean Cowpea Collaborative Research Support Program (CRSP)", financiado por la Agencia Internacional de Desarrollo (AID) Grant N° DAN-1310-G-SS-6008-00.

## RESUMEN

Se determinó la vida útil de un producto deshidratado elaborado a base de frijol (*Phaseolus vulgaris*), fortificado con hierro y vitamina C.

Se implementaron los métodos para el análisis de lisina disponible y vitamina C, con el fin de lograr su cuantificación en el producto a través del tiempo. Se determinó la isoterma de adsorción del producto a 25 y 37°C para establecer su humedad de monocapa ( $X_m$ ). Se estableció una prueba preliminar de almacenamiento a 45°C en bolsas de polipropileno orientado metalizado (OPP metalizado) con el fin de conocer la estabilidad del producto. De acuerdo con esta prueba, se decidió almacenar el producto en bolsas de polipropileno biaxialmente orientado (BOPP) en cámaras a 30, 37 y 45°C, a un 82% HR con exposición a la luz con el fin de establecer la vida útil del producto.

El producto presentó una isoterma de adsorción Tipo II, un valor de humedad de monocapa que coincide con un  $a_w$  inicial de 0.344, lo que le confirió una gran estabilidad de almacenamiento a 45°C en OPP metalizado. Al utilizar el almacenamiento en BOPP, el deterioro de la vitamina C respecto al tiempo presentó un comportamiento lineal ( $r \geq 0.91$ ) significativo ( $p=0.0001$ ). Además, la interacción entre las variables tiempo y temperatura fue significativa ( $p=0.0001$ ) indicando con ello que las pendientes entre cada temperatura eran diferentes. En el caso del almacenamiento a 30°C la regresión lineal se presentó a partir de los 43 días de almacenamiento ( $p=0.005$ ).

En el caso de la lisina disponible, no existió diferencia significativa ( $p=0.1120$ ) entre la lisina disponible, tiempos de almacenamiento, ni a diferentes temperaturas de almacenamiento ( $p=0.4576$ ). Al no cambiar la lisina disponible, se utilizó el deterioro de la vitamina C como indicador del final de la vida útil del producto.

Al utilizarse un empaque con cierta permeabilidad al vapor de agua, el  $a_w$  del producto aumento con el tiempo, por lo cual no fue posible aplicar la ecuación de Arrhenius para predecir la cinética de pérdida de la vitamina C. En el caso de 30° C la ecuación de regresión utilizada fue %VitC =  $-3.617 \cdot 10e(-4)$  días + 0.07428, para 37°C la ecuación fue %VitC =  $-6.789 \cdot 10e(-4)$  días + 0.06018, y en el caso de 45°C esta fue %VitC =  $-1.567 \cdot 10e(-3)$  días + 0.05830. La vida útil se determinó de acuerdo a un 10% de pérdida de la vitamina C, debido a que su destrucción afecta la biodisponibilidad del hierro, y porque la función del mismo consiste en suministrar el 50% del requerimiento diario de hierro en niños menores de 3 años. La ecuación de la recta de vida útil ( $\theta$ ) contra temperatura;  $\text{Ln } \theta = -0.1771T + 9.3349$ , tiene un  $r = 0.9945$ .

Se estimó una vida útil de 9 meses, según la degradación de la vitamina C, para el producto elaborado a base de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), fortificado con hierro y vitamina C, empacado en bolsas de BOPP a 21°C, bajo un 82% HR, y con exposición a la luz.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
RECONOCIMIENTO.....	ii
RESUMEN.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1 Producto.....	11
3.2 Materiales de empaque.....	12
3.3 Determinación de la actividad del agua ( $a_w$ ).....	13
3.4 Determinación de la isoterma de adsorción.....	13
3.5 Determinación del valor de humedad de monocapa.....	14
3.6 Prueba preliminar de almacenamiento.....	15
3.7 Almacenamiento.....	15
3.8 Determinación de vitamina C por HPLC.....	16
3.8.1 Preparación de la muestra.....	17
3.8.2 Condiciones cromatográficas.....	18
3.8.3 Verificación de la linealidad.....	18
3.9 Determinación de lisina disponible por HPLC.....	19
3.9.1 Tratamiento de la muestra.....	19
3.9.2 Condiciones cromatográficas.....	20
3.9.3 Curva de calibración.....	21
3.10 Estimación de la vida útil.....	22
3.11 Análisis estadístico.....	22

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
V. CONCLUSIONES.....	33
VI. RECOMENDACIONES.....	35
VII. REFERENCIAS.....	36
APÉNDICE I.....	39
Implementación del método de determinación de vitamina C para HPLC.....	40
Verificación de la linealidad en la determinación de la lisina como DNP-lisina.....	50

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO I Permeabilidad de diferentes gases en diversos materiales de empaque con un grosor de 25.4 micras.....	9
CUADRO II Formulación del producto a base de frijol.....	11
CUADRO III Composición química del producto a base de frijol.....	12
CUADRO IV Soluciones salinas utilizadas en la obtención de la curva de adsorción, con su respectivo $a_w$ .....	14
CUADRO V Muestreo utilizado para obtener la vida útil, de acuerdo a los días y temperatura de almacenamiento.....	16
CUADRO A.1 Volúmenes y concentración de $HPO_3$ utilizados para extraer la vitamina C.....	41
CUADRO A.2 Recuperación obtenida (%) en las diferentes extracciones de vitamina C.....	43
CUADRO A.3 Resultado de los diferentes tipos de filtrado.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Isoterma de adsorción a 25°C y 37°C para el producto hecho a base de frijol.....	24
Figura 2	Contenido de vitamina C presente en el producto almacenado a 45°C, en OPP metalizado y BOPP con un $a_w = 0.810$ .....	26
Figura 3	Vitamina C presente en el producto almacenado a 30, 37 y 45°C a un $a_w$ de 0.810 con luz fluorescente.....	28
Figura 4	Variación de la humedad del producto al empacarse en bolsas de polipropileno biaxialmente orientado (BOPP), según la temperatura de almacenamiento a un 82 % HR..	29
Figura 5	Lisina disponible en el producto al almacenarse en BOPP a 30°C a un $a_w$ de 0.810, en cámaras con luz fluorescente.	30
Figura 6	Lisina disponible en el producto al almacenarse en BOPP a 37°C a un $a_w$ de 0.810, en cámaras con luz fluorescente.	30
Figura 7	Lisina disponible en el producto al almacenarse en BOPP a 45°C a un $a_w$ de 0.810, en cámaras con luz fluorescente.	31
Figura 8	Vida útil del producto de frijol empacado en BOPP a 82% HR, de acuerdo a una pérdida mínima del 10% de la Vitamina C.....	32
Figura A.1	Integración del área de la vitamina C (RT de 6.57 min), utilizando la línea base como punto de referencia.....	47
Figura A.2	Integración del área que representa a la vitamina C (RT 6.57 min) utilizando la integración en base a una línea base inclinada según los cambios de pendiente que se presentan en la línea del cromatograma.....	48

## I. INTRODUCCIÓN

En el mundo se estima que entre 50 millones a 1 billón de personas sufren problemas de anemia (Blot y Vovor, 1989). La mayoría de estos son niños que, dependiendo de la región, la prevalencia varía desde un 15 a un 20% en América Latina e Indonesia, y entre un 70 y 80% en África, al sur del desierto del Sahara y en la India (Blot y Vovor, 1989). En 1995 América Latina presentaba 94 millones de personas sufriendo problemas de anemia por deficiencia de hierro (OMS, 1995).

En Costa Rica entre los años 1993 y 1994, se reportaron deficiencias dietéticas de hierro entre 70 y 80% de la población de niños menores de 3 años de familias de bajo nivel socioeconómico del área urbana y rural del Valle Central (Muñoz y Ulate, 1994). Según la Encuesta Nacional de Nutrición del año 1996, la prevalencia de anemia en los niños de 1-6 años de edad fue de 26% a nivel nacional. Según la edad se encontró que los niños más afectados fueron los de 1 año (36.5%), seguidos por los de 5 años (35.6%), 6 años (33.5%) y los de 2 años (24.0%). En relación con las reservas de hierro, se encontró que el 24.2% de los niños menores de 7 años tenían agotadas las reservas de hierro (ferritina <12 ng/dL), y de acuerdo a la edad, se observó que el agotamiento de hierro fue significativamente mayor en los niños de 1 a 2 años (39.7%).

En el combate de la deficiencia del hierro la Organización Panamericana de la Salud (OPS) está promoviendo una estrategia que identifica una serie de

intervenciones que deben ser realizadas simultáneamente, debido a que su impacto y fácil ejecución difieren mucho en el tiempo. Estas incluyen:

- Fortificación de un producto alimenticio de fácil acceso, bajo costo y que tenga un consumo universal para asegurar que toda la población tenga un adecuado y continuo suministro de hierro. En este sentido, se estimula la fortificación de una harina de trigo u otro alimento de primera necesidad de bajo costo.
- Suplementos de hierro para mujeres embarazadas, madres lactantes, y niños menores de 3 años para controlar la anemia e incrementar las reservas de hierro en niños y madres.
- Educación y promoción de una dieta que contenga agentes que incrementen la absorción del hierro.

En el CITA se desarrolló un producto a base de frijol deshidratado y fortificado con hierro y ácido ascórbico para suministrar el 50% del requerimiento diario de hierro en niños menores de 3 años (Sánchez, 1996). Este producto por ser fortificado y elaborado a base de una leguminosa, se diseñó para ser una fuente valiosa de proteína y hierro. De acuerdo a sus características, este producto puede eventualmente ser utilizado en América Latina para poder llevar a cabo el Programa de Alimentación y Nutrición promocionado por la OPS, por lo cual es muy importante desarrollar un estudio de vida útil que permita establecer el tiempo de almacenamiento al cual puede ser sometido.

En un estudio de almacenamiento, es importante evaluar las propiedades nutricionales que se vean más afectadas, así como la existencia de deterioro microbiológico o químico. Este producto, con bajo contenido en grasa (0.4%) y muy baja humedad (7%), almacenado en un empaque poco permeable, no presentará un deterioro importante debido a la oxidación lipídica ni al crecimiento microbiano.

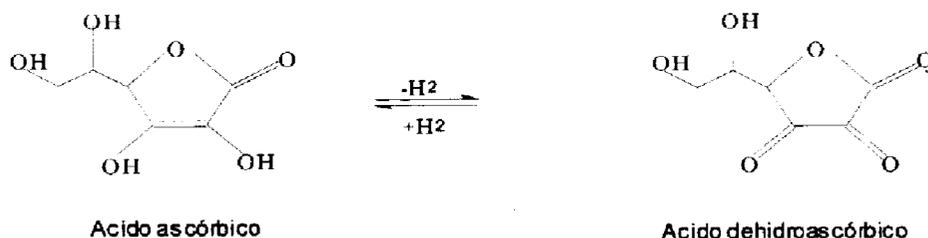
El producto se fortificó con vitamina C siguiendo lo señalado por diversos autores, en el sentido de que dicho ácido actúa como un agente que incrementa la absorción del hierro no-hemínico (Cook, 1983; Fergus, 1983; Hallberg, 1981; Hallberg, 1986; Derman *et al*, 1980; Lynch y Cook, 1980). Lynch y Cook (1980) afirman lo anterior al señalar una relación lineal entre el aumento de la absorción de hierro y la cantidad de ácido ascórbico añadido a comidas a base de vegetales. Derman *et al* (1980), agregan a esto, que la absorción de hierro presente en cereales o en proteínas, con suplementos vitamínicos y minerales, es mucho menor cuando no está presente el ácido ascórbico.

Clydeslade y Nadeau (1985) realizaron un estudio en hojuelas de cereal de trigo probando diferentes relaciones molares entre el hierro y el ácido ascórbico, encontrando que la solubilización óptima del hierro se lograba con una relación molar de 1:1,25 (1:4 m/m) (hierro:ácido ascórbico). Costa *et al* (1998), lograron evaluar lo anterior en este producto por medio de un estudio *in vivo* donde la biodisponibilidad del hierro alcanzó un nivel del 75%, indicando con esto

el gran potencial del producto para aumentar la disponibilidad del hierro con la presencia del ácido ascórbico.

Al ser el ácido ascórbico una de las vitaminas hidrosolubles más inestables, su deterioro implicará una disminución de la calidad nutricional del producto porque disminuirá la absorción del hierro presente en el producto.

El ácido ascórbico, es la forma enólica de la 3-ceto-1-gulofuranolactona, y su estructura, se muestra en la Ecuación 1.1. En el grupo endiol los átomos del segundo y tercer carbono son sensibles a la oxidación, y pueden ser convertidos a un grupo diceto (ácido dehidro-ascórbico). Ambas formas, se encuentran en los fluidos corporales, y son fisiológicamente activas en los tejidos (Marks, 1975), (Badui, 1981), y (Nielsen, 1994).



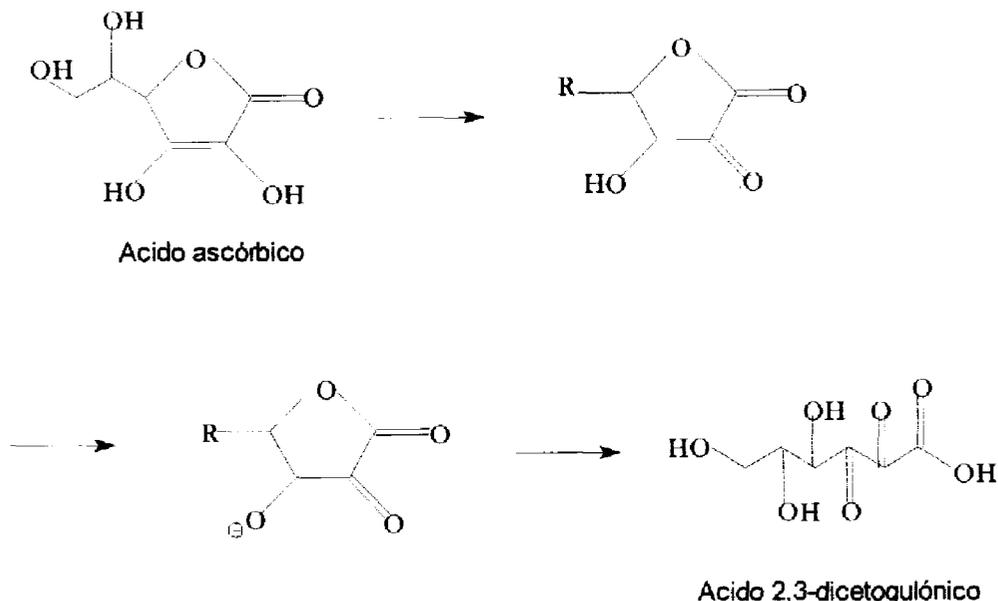
Ecuación 1.1. Estructura de la vitamina C (ácido ascórbico)

Esta vitamina se destruye rápidamente por el calor, la luz, y la oxidación. De acuerdo con Labuza (1973), dicho deterioro tiene una alta relación con el contenido de humedad del producto. Este autor señala que a un bajo contenido de humedad, la pérdida de la vitamina C se debe a la oxidación, mientras que a

contenidos altos de humedad lo causa el pardeamiento no-enzimático, por la participación del ascorbato en dicha reacción.

La actividad biológica de la vitamina se pierde cuando el anillo de lactona del ácido dehidroascórbico, se abre irreversiblemente produciéndose el ácido 2,3-dicetogulónico (Belitz y Grosch, 1988). La oxidación del ácido ascórbico, a dehidroascórbico, y de los productos subsiguientes depende de una serie de factores. Entre estos están la presión parcial del oxígeno, pH, temperatura, y la presencia de metales pesados. Trazas de iones metálicos pesados como  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  producen altas pérdidas de la vitamina por actuar como agentes catalíticos.

La tasa de degradación anaeróbica que pueda presentar este producto, es sustancialmente menor que la oxidación no-catalítica, y presenta un máximo a un pH de 4 y un mínimo a un pH de 2. Esta probablemente procede a través de una forma ceto del ascorbato, luego vía la forma ceto-aniónica resultando en el ácido dicetogulónico (Belitz y Grosch, 1988):



La biodisponibilidad del hierro no será estable por la disminución vitamínica señalada, haciendo necesaria entonces, una evaluación de la tasa de destrucción de la misma con respecto a la temperatura,  $a_w$ , y las características propias del producto.

La proteína presente no escapa de esta problemática. Varios autores señalan a la reacción de Maillard (pardeamiento no-enzimático) como la principal causante de la pérdida del valor biológico de la proteína durante el almacenamiento (Belitz y Grosch, 1988; Labuza, 1973 y 1982). La reacción de Maillard produce un oscurecimiento en el producto, debido a una serie de reacciones complejas cuya reacción clave se encuentra en la formación de un complejo amino-carbonílico entre grupos carbonílicos generalmente provenientes de azúcares reductores y los grupos amino libres de las cadenas de proteína o aminoácidos (Ringe y Love, 1988; Belitz y Grosch, 1988).

Al igual que la destrucción de la vitamina C, la reacción de Maillard depende de factores externos que, en este caso son la temperatura, el pH y el  $a_w$ . La tasa de oscurecimiento aumenta al aumentar el pH o la temperatura. Tiene el nivel de reacción más elevado en un rango de actividad de agua ( $a_w$ ) entre 0.6 - 0.8, y decrece a valores mayores que 0.8 (Ringe y Love, 1988; Labuza y Saltmarch, 1981). En alimentos secos, un aumento de  $10^\circ$  en la temperatura de almacenamiento produce un incremento de la tasa de oscurecimiento entre 400 y 800% (Labuza, 1982). El mejor control que se ejerce sobre este oscurecimiento se

logra con el control de la cantidad de agua disponible en el alimento donde puede ocurrir la reacción. Al disminuir dicho contenido, se disminuye la velocidad de la reacción (Labuza, 1982; Labuza *et al.*, 1970).

El mayor problema, desde el punto de vista nutricional, que presenta esta reacción radica en la pérdida de la lisina que contiene el producto, la cual reacciona con su grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> libre (Labuza, 1973; Ringe y Love, 1988). Al perderse este grupo, la calidad nutricional se verá disminuida por cuanto se reduce la disponibilidad del aminoácido para ser utilizado posteriormente (Nielsen, 1994). Esto lo confirman los estudios mencionados por Ringe y Love (1988), donde se encontraron disminuciones significativas tanto en la razón de eficiencia protéica (PER) como en la biodisponibilidad de lisina durante el secado de leche en tambores, donde ocurren éstas reacciones.

Como punto de partida en un estudio de este tipo, se debe conocer el parámetro que más afecta la estabilidad del producto, para lo cual no solamente se debe medir el  $a_w$ , sino que también debe calcularse el valor de "humedad de monocapa" o "capa monomolecular", que es el valor donde se minimizan las reacciones de deterioro y por tanto se obtiene la mayor vida útil del producto (Labuza y Contreras-Medellin, 1981). Por ejemplo, en el caso del pardeamiento no-enzimático, la velocidad de la reacción se duplica o triplica por cada incremento de 0.1 en el  $a_w$  por encima de 0.4 (Labuza y Contreras-Medellin, 1981).

La variación en el valor del  $a_w$  del producto y el intercambio de gases del medio ambiente con el alimento depende de la integridad del empaque (incluyendo sus sellos y cierres), y de la permeabilidad propiamente de los materiales con que estos se construyen. Existen dos procesos por los cuales tanto los vapores como los gases pueden pasar a través de los materiales poliméricos:

- por efecto de los poros, en el cual los gases y vapores fluyen a través de poros microscópicos, microorificios y grietas en los materiales, y
- por efecto de solubilidad-difusión, en el cual los gases y vapores se disuelven en una superficie del polímero, luego hay una difusión a través del polímero por virtud del gradiente de concentración, y se evaporan finalmente en la otra superficie del polímero. Este proceso de "solubilidad-difusión" también conocido como "difusión activa" es lo que se conoce realmente como la permeabilidad (Robertson, 1993).

Los diferentes valores de permeabilidad que presentan los empaques, se pueden observar en el Cuadro I. El tipo de material que se escoja dependerá de la protección que requiere el alimento.

Cuadro I. Permeabilidad de diferentes gases en diversos materiales de empaque con un grosor de 25,4 micras ) ( 1 mil)\*

Polímero	Permeabilidad del vapor de agua (g/m <sup>2</sup> /día) a 100 °F (38°C) y 90 % HR	Permeabilidad al O <sub>2</sub> (cc/m <sup>2</sup> /día atm) a 77°F (25°C) y 0 % HR	% Transmisión a la luz	Temperatura de uso (°C)
Poliétileno de alta densidad (HDPE)	6.20	1550-3100	—	-40 a 121.11
Poliétileno de baja densidad (LDPE)	15.5-31.0	7750	65	-56.7 a 82.22
Polipropileno biaxialmente orientado (BOPP)	6.20	1550-2480	80	4.44 a 121.11
Cloruro de polivinilideno (PVDC)	0.78-4.65	1.55-15.50	90	-17.78 a 135
Alcohol etilenvinílico (EVOH)	46.5-93.0	0.16-0.31	90	-17.78 a 149

Fuente: Jenkins y Harrington (1991).

\* (1 mil = 1/1000 in =25.4 micras=2.54x10<sup>-3</sup>cm )

En el presente estudio, se estimó la vida útil de un producto elaborado a base de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), fortificado con hierro y ácido ascórbico según la degradación de la lisina y el ácido ascórbico.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la vida útil de un producto deshidratado elaborado a base de frijol (*Phaseolus vulgaris*), fortificado con hierro y ácido ascórbico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar los métodos para el análisis de lisina disponible y vitamina C.
2. Obtener la isoterma de adsorción para calcular el valor de humedad de monocapa del producto.
3. Determinar la velocidad de descomposición de la vitamina C a través del tiempo.
4. Establecer la tasa de pérdida de calidad nutricional de la proteína en el producto de frijol, determinando la pérdida de lisina disponible.
5. Determinar la vida útil del producto con base en la pérdida de la vitamina C y la lisina disponible.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Producto

El producto se elaboró según la metodología descrita por Sánchez (1996), utilizando exclusivamente la formulación que utiliza como base frijol cocido, molido y secado (Cuadro II). Se utilizó como materia prima frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) variedad Talamanca, procedente de la estación experimental Fabio Baudrit, hierro electrolítico grado A-131 (SMC Metal Products, Inc.), ácido ascórbico USP-FCC (Roche), culantro y ajo en polvo (Baltimore Spice), sal y azúcar comerciales. Los componentes químicos principales, se muestran en el Cuadro III.

Cuadro II. Formulación del producto a base de frijol

Componente	% (m/m)
Frijol cocido, molido y secado	92.6
Azúcar	4.3
Sal	2.4
Ajo	0.3
Culantro	0.3
Acido ascórbico	0.08
Hierro	0.02

Cuadro III. Composición química del producto a base de frijol.\*\*

Componentes químicos	% (m/m)
Humedad	5.7
Cenizas	5.5
Grasa	1.3
Proteína	21.7
Fibra dietética	17.5
Carbohidratos disponibles	48.3

\*\* Según Reportes de laboratorio de Química, CITA.

### 3.2 Materiales de empaque

Película flexible de polipropileno biaxialmente orientado (BOPP), proporcionado por la empresa Magma, S.A, de 20 micras de espesor (0.80 mil), según las especificaciones de fabricación de la FDA, con una permeabilidad al vapor de agua de 4.80 g/m<sup>2</sup>/24h, a 100°F (38°C) y 90%HR, una permeabilidad al oxígeno de 620 cc/m<sup>2</sup> /24h 1atm, a 23°C, y 0%HR, y un 85 % de transmisión a la luz.

Película de polipropileno orientado metalizado (OPP metalizado), proporcionado por la empresa Polyplasticos S.A., con un calibre nominal de 18 micras, una permeabilidad al vapor de agua de 0.31 g/m<sup>2</sup>/24hr, a 100°F (38°C) a 90%HR, impermeable al oxígeno y con un 0.4% de transmisión a la luz.

### **3.3 Determinación de la actividad del agua ( $a_w$ ).**

Esta determinación se realizó de forma directa, colocando la muestra en cápsulas plásticas especiales del equipo AquaLab modelo CX-2 (Decagon Devices, Inc), el cual mide el  $a_w$  hasta una temperatura máxima de 40°C.

### **3.4. Determinación de la isoterma de adsorción.**

Se utilizó el método de los desecadores con sales saturadas para isotermas de adsorción a 25 y 37°C definido por Labuza (1983). La muestra, se secó a niveles cercanos a un  $a_w$  cercano a 0, en horno al vacío (26 in Hg), a 55°C durante 48-62 horas. Una vez que la muestra estuvo seca, se colocó dentro de los recipientes sellados conteniendo las siguientes sales saturadas; LiCl, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOK, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaBr, NaNO<sub>2</sub>, NaCl, KCl, y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Véase Cuadro IV). Al llegar la muestra a un equilibrio con el medio en un período de 5 a 6 semanas (variación en  $a_w$  de  $\pm 0.003$ ), se determinó el contenido de humedad por medio del método de estufa de vacío a 60°C. Para la prevención del crecimiento de hongos a niveles de humedad relativa del 70% y mayores, se utilizó una pequeña botella con tolueno dentro de los recipientes sellados (Palipane, 1992).

Cuadro IV. Soluciones salinas utilizadas en la obtención de la curva de adsorción, con su respectivo  $a_w$

Sal	Actividad de agua ( $a_w$ )
LiCl	0.112 **
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOK	0.205 **
MgCl <sub>2</sub>	0.322 **
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.439 *
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.545 *
NaBr	0.532 **
NaNO <sub>2</sub>	0.660 *
NaCl	0.757 *
KCl	0.823 **
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.972 **

Según lecturas efectuadas en equipo AquaLab a 25°C (\*) y a 37°C (\*\*)

### 3.5 Determinación del valor de humedad de monocapa.

El valor de humedad de monocapa se calculó a partir de la isoterma de adsorción mediante la ecuación de BET ( Brünauer-Emmett-Teller, 1938):

$$\frac{a_w}{X(1-a_w)} = \frac{1}{X_m C} + \frac{C-1}{X_m C} a_w \quad (1)$$

Donde;

X: contenido de humedad (base seca)

$X_m$  : fracción de masa de agua en el material equivalente a una capa unimolecular de agua que cubre la superficie de cada partícula.

C : constante a temperatura T constante ( proporcional al calor de adsorción de agua en partículas).

Al graficar  $a_w / X (1 - a_w)$  contra  $a_w$  se obtiene la línea BET donde la pendiente y la intersección se utilizan para determinar C y  $X_m$ .

### **3.6. Prueba preliminar de almacenamiento.**

Esta prueba consistió en almacenar el producto a 45°C en polipropileno orientado y metalizado (OPP metalizado) durante un mes tomando muestras por triplicado cada semana. Con esto, se determinó el comportamiento general respecto a la pérdida de ácido ascórbico y lisina disponible. A partir de esta prueba, se estableció el plan de muestreo a utilizar en el almacenamiento acelerado que a continuación se describe.

### **3.7. Almacenamiento**

El almacenamiento acelerado se llevó a cabo en diferentes cámaras con iluminación fluorescente de 20 V donde se mantuvo el producto a temperaturas de 30, 37 y 45 °C. Se realizó un muestreo por duplicado, y los análisis se realizaron

por duplicado cada intervalo de tiempo según se muestra en el Cuadro IV. Se utilizaron bolsas de 50 g de producto con una dimensión promedio de 8 x 13,5 cm, y se almacenaron dentro de las cámaras a una humedad relativa del 82%, utilizando solución saturada de KCl en tres diferentes desecadores.

Cuadro V. Muestreo utilizado para obtener la vida útil, de acuerdo a los días y temperatura de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento (días)		
30°C	37°C	45°C
0	0	0
26	14	7
43	37	14
69	50	23
83	58	29
103	77	36

### 3.8. Determinación de vitamina C por HPLC.

La determinación se realizó de acuerdo a los métodos descritos por Ulate y Bonilla (1993), y Vázquez Oderiz *et al* (1994). El método descrito por Ulate y Bonilla (1993), se ha aplicado a jugos de frutas tropicales como mandarina (*Citrus cinensis*), naranja (*Citrus aurantium*), carambola (*Averrhoa carambola*) y otros. Vázquez Oderiz *et al* (1994), han utilizado el método para analizar vainicas (*Phaseolus vulgaris* L. var Helda). La muestra analizada en este estudio, era un

producto con un alto contenido de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), sometido a un proceso de cocción, molienda y secado, por lo que fue necesario realizar una implementación del análisis de la vitamina C en dicha muestra con base en los métodos señalados. De acuerdo a esta implementación (Apéndice I), se definió el siguiente procedimiento:

### **3.8.1 Preparación de la muestra**

Se pesó 20,00 g de la muestra homogenizada, se extrajo la vitamina con 70 mL de una disolución de ácido metafosfórico al 4.5%, y 20 mL de una disolución de EDTA (400 mg/L) con agitación mecánica durante 20 min (200rpm). Una vez obtenida la mezcla, se centrifugó a 8234 xg por 10 minutos a una temperatura de -5°C en la cámara de la centrifuga.

Al residuo sólido se le repitieron 3 extracciones de 50 mL con el ácido metafosfórico, con un último lavado de 30 mL. Los extractos se recogieron en un balón de 500 mL cubierto de papel aluminio para proteger a la vitamina de los rayos UV. Antes de aforar con la disolución de ácido metafosfórico, se añadió 40 mL de una disolución de KOH al 10% para aumentar el pH de 1.60 a 2.5-3.0. Una alícuota del balón de 500mL se filtró a través de filtro Millipore de 0.25µm previo a la inyección de 10 µL en la columna cromatográfica.

Para limpiar la columna de residuos provenientes de la muestra que modifican la línea base de trabajo, fue necesario operar el equipo a las condiciones establecidas durante una hora entre cada muestra.

### **3.8.2 Condiciones cromatográficas**

La fase móvil se compuso de agua desionizada o bidestilada con una concentración de ácido acético al 1.5% para obtener un pH entre 2.5-3.0. El flujo se mantuvo en 0.50 mL/min con una fase móvil de agua:ácido acético 98,5:1,5. La detección se realizó a  $\lambda = 245$  nm, en un detector UV-Visible de longitud de onda variable, a 0.16 AUFS.

La columna utilizada fue una Econosphere C18 (Alltech) de 5U de 4.6 mm de I.D. y 250 mm de largo. Se utilizó en un rango de pH entre 2.5 y 3.0, a temperatura ambiente (aprox. 21°C).

En el caso de las muestras, para la identificación y cuantificación del área del pico que representa a la vitamina C, se utilizó como estándar externo vitamina C USP-FCC (Roche) de concentración similar a la de la muestra.

### **3.8.3 Verificación de linealidad**

Se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones de 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, y 60.0 ppm para verificar la linealidad del método. Se inyectó cada patrón por triplicado con un volumen de 10  $\mu$ L.

### **3.9 Determinación de lisina disponible por HPLC**

La determinación de los cambios de la lisina, producidos por el pardeamiento no-enzimático, se realizó de acuerdo al método de Carpenter (1960) modificado para HPLC por Peterson y Warthesen (1979). El principio del método es que al tratar un polipéptido con el 1-fluoro-2,4 dinitrobenceno (DNFB) en una solución ligeramente alcalina, se lleva a cabo una reacción de sustitución aromática electrofílica en el que interviene el grupo amino libre de la lisina. La subsecuente hidrólisis del polipéptido produce una mezcla de aminoácidos en donde la lisina presenta una marca, el grupo 2,4 dinitrofenilo (DNP-Lisina) (Solomons, 1990). Como resultado de ello, es posible mediante la técnica de HPLC, identificar y cuantificar este complejo utilizando un patrón de DNP-Lisina HCl (Sigma Chemical Co).

#### **3.9.1 Tratamiento de la muestra**

Se pesó 1,0000 g de muestra, y se colocó en balones de ebullición de 250 mL. Se añadió 12.5 mL de una disolución de bicarbonato de sodio al 8% en agua. Después que la muestra se hidrató con la disolución de bicarbonato de sodio, se añadió 15 mL de una disolución de etanol al 95% que contenía 0.4 mL de DNFB. La muestra se tapó, y se agitó mecánicamente (200rpm) (Rotary Shaker, Fermentation Design Inc.) a temperatura ambiente por un período mayor a 3 h, de acuerdo con el método 975.44 AOAC, 1990.

Al finalizar la agitación, se colocaron núcleos de ebullición, y se evaporó el etanol en un rotavapor a vacío a 40°C hasta obtener una pérdida de peso de 12.5 g.

Se añadió 30 mL de una disolución de HCl 8.1 mol/L, liberando todo el CO<sub>2</sub> formado. La muestra se calentó en reflujo con vacío durante 16 h.

Al terminar la hidrólisis, la muestra se filtró en caliente en papel Whatman # 41 o similar en un balón de 250 mL, aforado a temperatura ambiente con agua.

La separación y cuantificación del complejo DNP-lisina se realizó utilizando la técnica de HPLC.

### **3.9.2 Condiciones cromatográficas**

La separación se realizó con una columna Econosphere C18 (Alltech) de 5U de 4.6 mm de I.D. y 250 mm de largo. Se utilizó una fase móvil de 20% acetonitrilo grado cromatográfico y 80% de disolución amortiguadora de acetato 0.01 M, pH 4.0 con un flujo de 1.4 mL/min. La detección del complejo DNP-lisina, se realizó en visible a  $\lambda = 436$  nm.

Para la identificación y cuantificación del área del pico que representa al complejo DNP-Lisina, se utilizó como estándar externo DNP-Lisina HCl (Sigma Chemical Co). Este mismo compuesto se adicionó a las muestras en cantidad exactamente conocida, para lograr una mayor concentración, puesto que la muestra contenía niveles inferiores al nivel mínimo cuantificable. Se preparó una

solución madre ( $1.003 \pm 0.002$  mg/mL) mantenida en un congelador InBIO a  $-78^{\circ}\text{C}$ , de la cual se tomaba una alícuota de 2.00 mL para enriquecer 5.00 mL de muestra y realizar un aforo a 10.0 mL con agua desionizada o bidestilada.

Finalmente, se filtró a través de una membrana de  $0.25\ \mu\text{m}$  para inyectar  $10\ \mu\text{L}$  de la muestra marcada al equipo.

### **3.9.3 Curva de calibración.**

Se realizó una curva de calibración inyectando por triplicado, concentraciones de 0.050, 0.100, 0.201, 0.301, y  $0.401\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de patrón de DNP-Lisina HCl (Sigma Chemical Co).

La lisina disponible se calculó de acuerdo a la concentración de DNP-lisina encontrado en el balón de 10.0 mL. Se aplicó un factor de  $10/5$  para obtener la cantidad de DNP-lisina en la alícuota de 5.00 mL de la muestra, y se multiplicó por 250 mL para conocer el contenido de mg de DNP-lisina en dicho volumen. Lo anterior se multiplicó por un factor de  $1/1000$  para tener la masa (g) de DNP-lisina, luego se utilizó la relación molar entre la lisina y el DNP-lisina para conocer la masa (g) de lisina. Esta masa (g) de lisina se divide entre el contenido de nitrógeno presente en la muestra seca multiplicado por 16.

### **3.10. Estimación de la vida útil.**

Debido a que se utilizó un empaque con cierta permeabilidad al vapor de agua, se presentó una variación en el contenido de humedad del producto, por lo cual no fue posible aplicar la ecuación de Arrhenius para predecir la cinética de pérdida de nutrientes en el alimento, de acuerdo con Labuza (1982). En su lugar, se utilizó el comportamiento de deterioro más importante, el cual lo presentó la vitamina C. Dicha vitamina al descomponerse de acuerdo a una regresión lineal, permitió calcular la vida útil ( $\theta$ ) para cada temperatura de almacenamiento y construir así una gráfica de  $\log \theta$  contra T para el producto empacado en bolsas de BOPP.

### **3.11. Análisis estadístico.**

El estudio de vida útil, se realizó con un diseño experimental por bloques incompletos y a los resultados obtenidos, se aplicó un análisis de covarianza para valorar la significancia de las variables T, tiempo y su interacción. Para ello, se utilizó el procedimiento del modelo lineal general (GLM, siglas en inglés) del programa SAS, utilizando a la temperatura como una variable tipo Clase.

Se utilizó la razón F tipo III para probar las siguientes hipótesis:

- $H_0 : \tau_1 = 0$ , donde  $H_0$  ; No hay interacción entre la temperatura y el tiempo ( $T \cdot t$ ).

- $H_0 : \beta = 0$ , donde  $H_0$  ; No hay relación lineal entre el tiempo y la variable respuesta (%vitamina C y contenido de lisina disponible).

En el caso que correspondiera, se aplicó un modelo de regresión lineal para la determinación de la vida útil.

En el caso del cálculo de la “humedad de monocapa”, se utilizó un modelo de regresión lineal para obtener la ecuación de BET.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La isoterma de adsorción para el producto a base de frijol se muestra en la Figura 1. Dicha curva, en forma sigmoïdal, es característica de isoterms Tipo II. Presentan dos puntos de inflexión, uno entre un  $a_w$  0.2 a 0.4, y otro a 0.6-0.7. Este tipo de productos son porosos, con un alto contenido de proteína y almidón (Labuza, 1984).

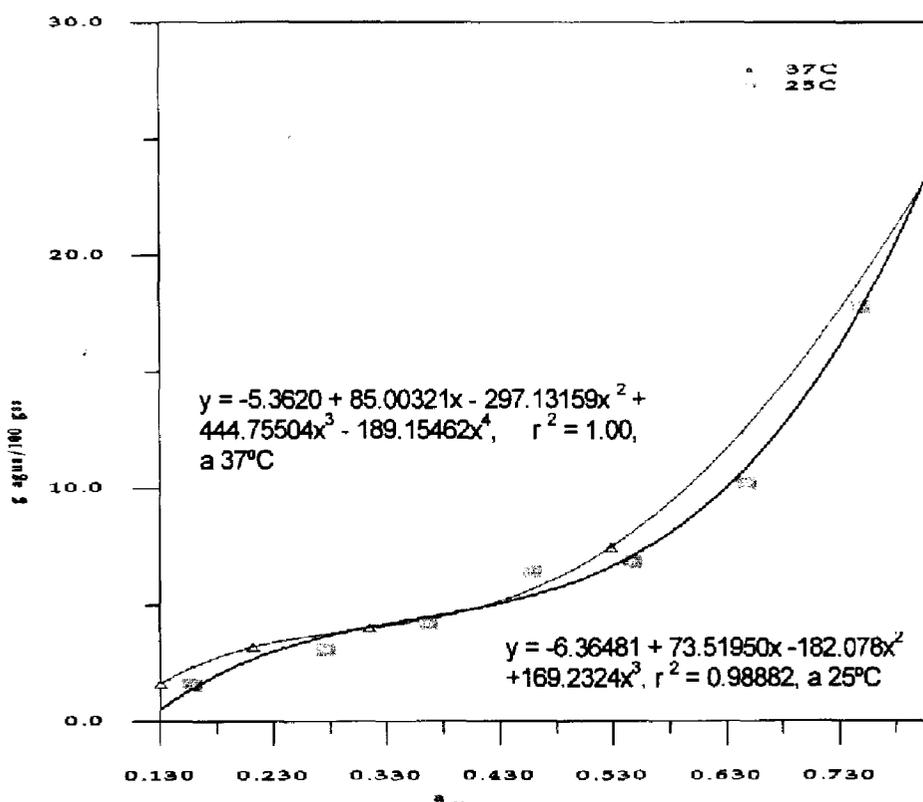


Figura 1. Isotherma de adsorción a 25 y 37°C para el producto hecho a base de frijol

El contenido de humedad de monocapa ( $X_m$ ) para el producto, varió de 4.62 a 25°C a 4.47 g agua/100 g sólidos secos a 37°C. De acuerdo a la relación establecida por Iglesias y Chirife (1984),  $\ln X_m = \beta + \alpha T$ , se observa como la

humedad de monocapa disminuye al aumentar la temperatura al sustituir los valores obtenidos de  $\alpha$  de -0.0029 y de  $\beta$  de 1.60. Estos valores son comparables a los reportados en almidón de trigo y huevo deshidratado. Esta variación en el valor de BET( $X_m$ ) de un 3.5%, es muy similar a la que presenta el huevo deshidratado (3%), indicando que en este tipo de productos, existe una mínima reducción en la cantidad de agua adsorbida en sitios específicos, tales como las cadenas helicoidales del almidón y estructuras proteínicas, como resultado de cambios físicos y/o químicos inducidos por la temperatura (Iglesias y Chirife, 1976).

De acuerdo a los valores de BET obtenidos, el  $a_w$  de monocapa es de 0.374 a 25°C y de 0.326 a 37°C. Tomando en consideración que el  $a_w$  inicial del producto es de 0.344, y de acuerdo con Labuza (1984), se puede esperar que este producto posea una gran estabilidad debido a la ausencia de agua que sirva como medio para que se lleven a cabo las reacciones de deterioro.

Sin embargo, de acuerdo con la isoterma de adsorción discutida, es necesario utilizar una protección por medio de un empaque, para evitar un aumento en la humedad del producto. Para la elección del empaque, se realizó una prueba preliminar de la estabilidad del producto con el polipropileno orientado (OPP) metalizado. Con este material, el producto presentó una gran estabilidad (según contenido de vitamina C) durante casi un mes de almacenamiento a 45°C (Figura 2), lo que hubiera implicado de un estudio de vida útil de al menos unos 2 años.

Por ello, se decidió utilizar el empaque de polipropileno biaxialmente orientado (BOPP) sin metalizar, con el fin de acelerar el estudio de vida útil, y así, obtener resultados en un plazo de 6 meses. Además, se utilizó este empaque por su gran uso en la industria de alimentos de productos secos y su relativo bajo costo. El efecto del cambio del empaque, se puede notar en la Figura 2. Al asumir una pérdida del 25% de la vitamina C como parámetro de calidad, a 45°C se logra observar que en el caso del BOPP la vida útil sería de 10 días, y en el del OPP metalizado, de más de 100 días.

Con este material de empaque (BOPP), se determinaron las tasas de destrucción de los componentes más críticos que afectarían la calidad del producto: la vitamina C y la lisina disponible.

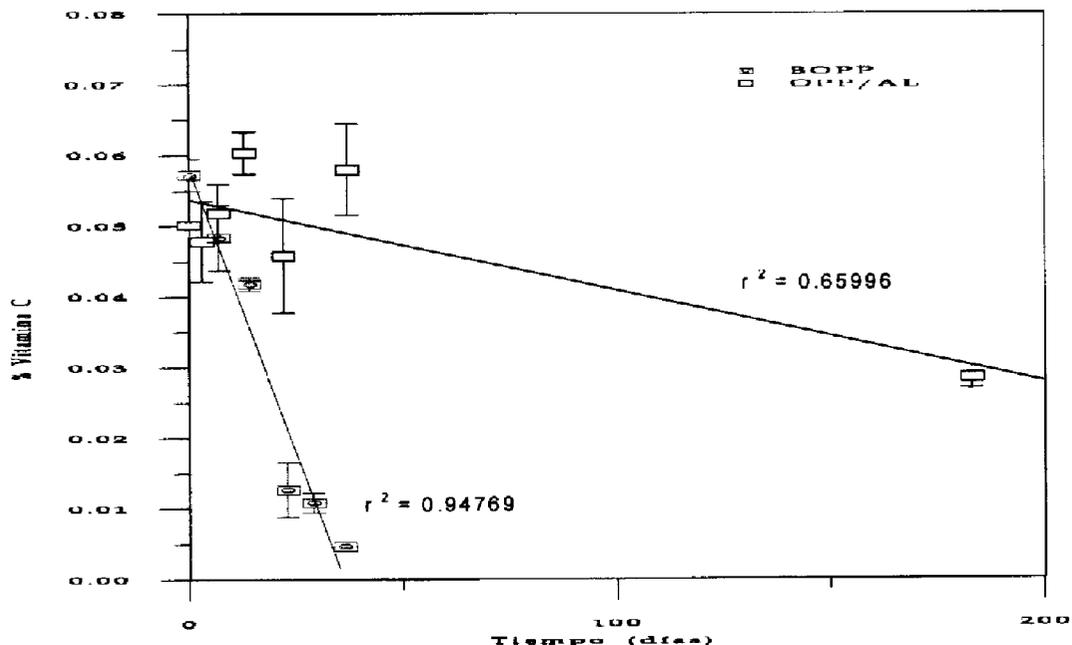


Figura 2. Contenido de vitamina C presente en el producto almacenado a 45°C, en OPP metalizado y BOPP con un  $a_w=0.810$ .

Para la vitamina C, se observó que la reacción tiene un comportamiento lineal con coeficientes de correlación  $\geq 0.91$  (Figura 3). En un inicio, para el caso de almacenamiento a 30°C, el contenido de vitamina C se mantiene constante hasta cierto tiempo (43 días), a partir del cual la pérdida de vitamina C sigue una regresión lineal ( $\% \text{ vitamina C} = -3.617 \cdot 10^{-4} \text{ días} + 0.07428$ ). Lo anterior, lo confirma el análisis de ANDEVA, donde no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.005$ ) entre los tres primeros valores. En el intervalo de 43 a 103 días existe una alta diferencia significativa entre los valores ( $p \leq 0.005$ ). En el caso de 37 y 45°C, se notó una pérdida de vitamina C de acuerdo a una regresión lineal donde el  $\% \text{ vitamina C} = -6.789 \cdot 10^{-4} \text{ días} + 0.06018$  a 37°C, y  $\% \text{ vitamina C} = -1.567 \cdot 10^{-3} \text{ días} + 0.05830$  a 45°C. En estas dos temperaturas, se presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.005$ ) de la pérdida de vitamina C desde un inicio, provocado probablemente por la variación de la permeabilidad del empaque según la temperatura (Labuza, T.P., y Contreras-Medellin, R., 1981).

Debido a que la permeabilidad al agua del empaque es de 4.80 g/m<sup>2</sup>/24h a 38°C y 90% HR, el producto fue aumentando su contenido de humedad y por tanto su  $a_w$ . La temperatura es un factor crítico en la permeabilidad del material de empaque, el aumento en la temperatura es directamente proporcional al aumento de la permeabilidad. Este efecto se notó en la variación de la humedad del producto con la temperatura durante el almacenamiento (Figura 4). Es notoria la diferencia de comportamiento entre 45 y 30°C, ya que en el primer caso la curva

tiene una mayor pendiente, y en el segundo, incluso existe un intervalo de tiempo (aproximadamente 20 días) donde la humedad permanece constante.

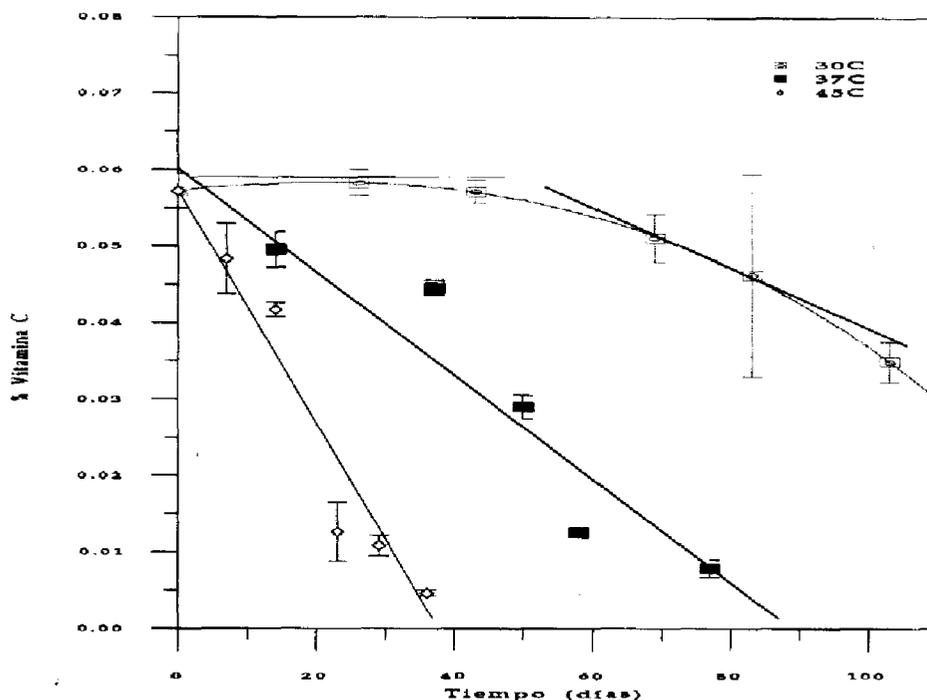


Figura 3. Vitamina C presente en el producto almacenado a 30, 37 y 45°C a un  $a_w$  de 0.820 con luz fluorescente.

La destrucción de la vitamina C se debió probablemente a la combinación de factores como la temperatura, la luz, y la oxidación a que fue expuesta durante el almacenamiento. De acuerdo con Labuza (1973), el deterioro de la vitamina también tiene una alta relación con el contenido de humedad del producto. En el caso de bajos contenidos de humedad, éste es provocado por la oxidación. Es importante, por lo anterior, observar en conjunto las Figuras 3 y 4. En la primera, se detallan las tendencias de deterioro significativas ( $p=0.0001$ ) de la vitamina con

respecto al tiempo, y se nota cómo la interacción entre las variables tiempo y temperatura fue significativa ( $p=0.0001$ ) indicando con ello que las pendientes entre cada temperatura eran diferentes. Complementándose con la Figura 4, donde se evalúa el efecto que pudo causar el empaque en la humedad del producto, y por consiguiente, en su estabilidad. Esto, está de acuerdo con la gran estabilidad verificada en las pruebas preliminares con el empaque metalizado que posee un factor de protección mayor contra la luz y la humedad.

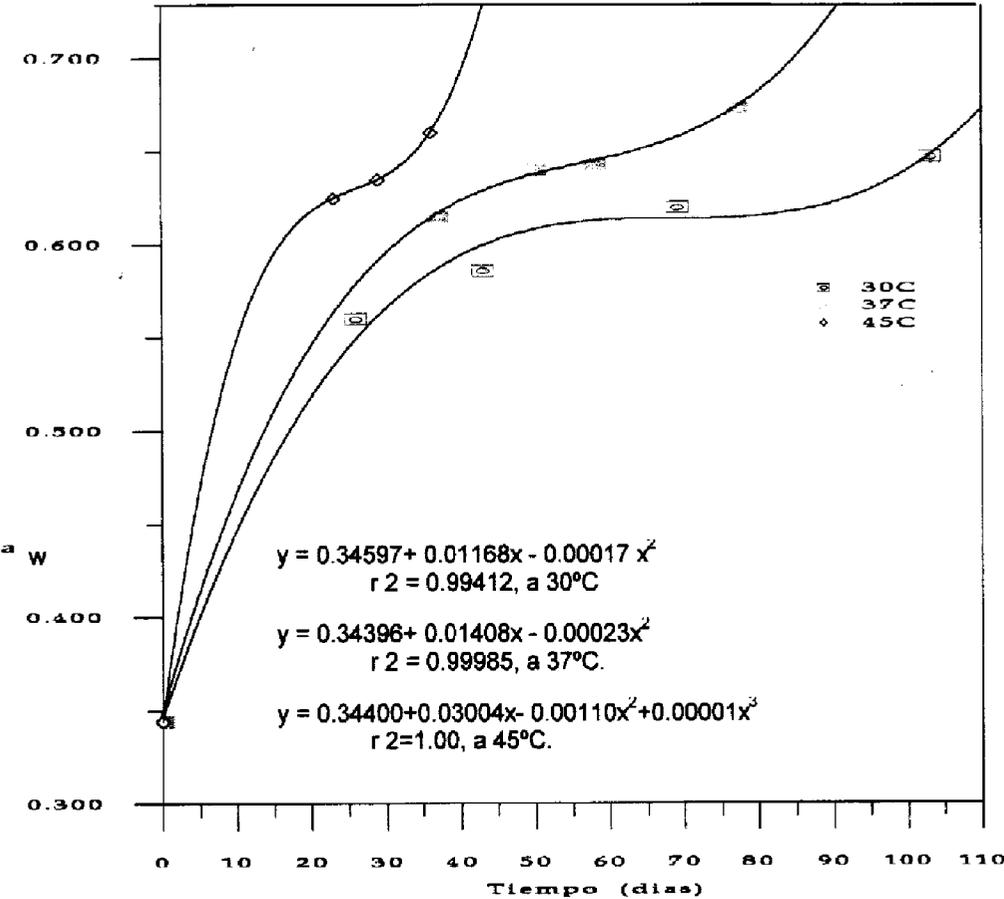


Figura 4. Variación de la humedad del producto al empacarse en bolsas de polipropileno biaxialmente orientado (BOPP), según la temperatura de almacenamiento a un 82% de HR.

En el caso de la lisina disponible, no se observó diferencia significativa ( $p=0.1120$ ) entre la lisina disponible y el tiempo de almacenamiento, ni entre las temperaturas de almacenamiento ( $p=0.4576$ ). Esto se muestra en las Figuras 5 a la 7. La alta estabilidad proteínica del producto puede deberse a la existencia de las globulinas como las proteínas mayoritarias de las semillas de *Phaseolus* (Shridhar, K *et al*, 1984). Además, la mayor proteína (proteína 7S) presente en el frijol de *Phaseolus* tiene una naturaleza compacta que le brinda cierta "rigidez" natural, que le permite resistir en cierta medida el ataque digestivo enzimático (Shridhar, K *et al*, 1984), haciéndoles menos disponibles para el pardeamiento no-enzimático.

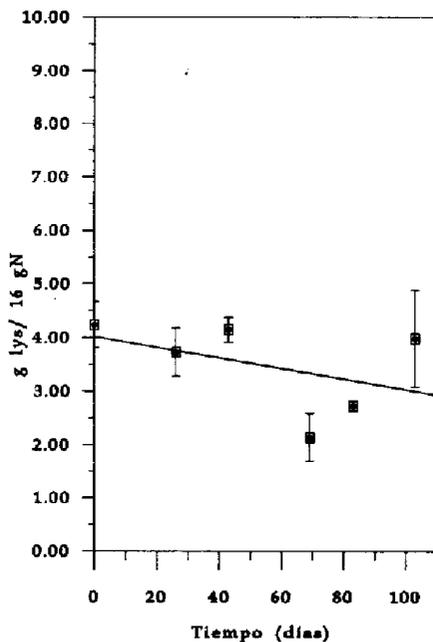


Figura 5. Lisina disponible en el producto al almacenarse en BOPP a 30°C a un  $a_w$  de 0.810, en cámaras con luz fluorescente.

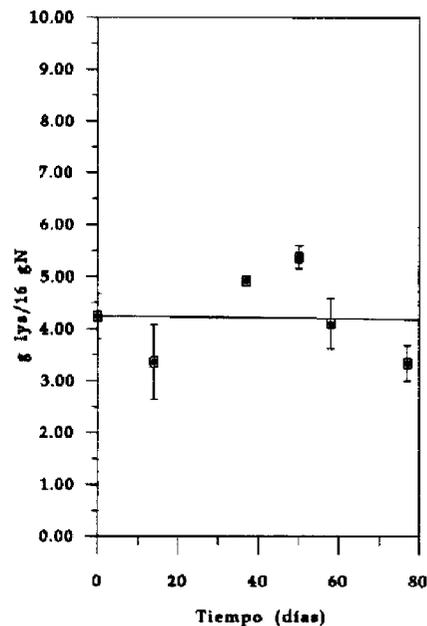


Figura 6. Lisina disponible en el producto al almacenarse en BOPP a 37°C a un  $a_w$  de 0.810, en cámaras con luz fluorescente.

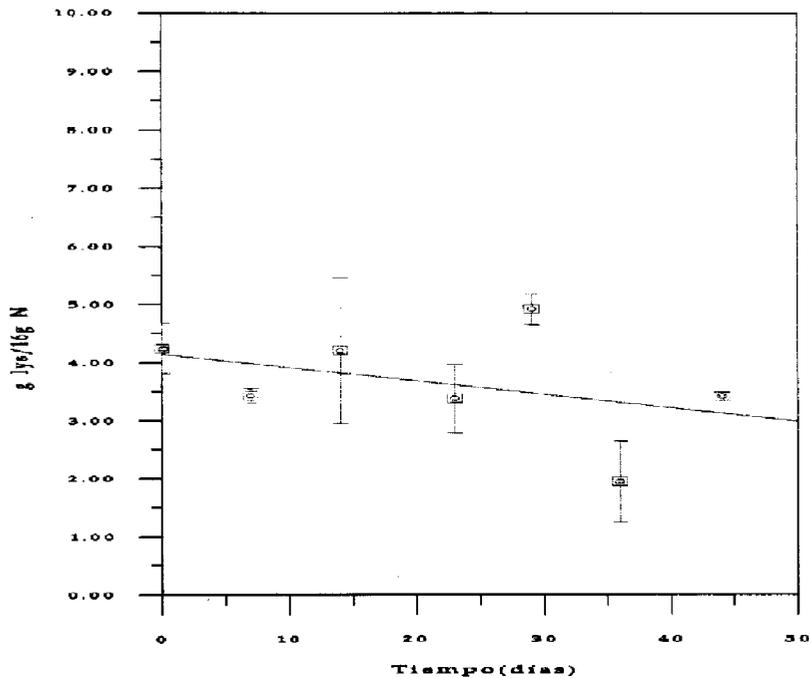


Figura 7. Lisina disponible en el producto al almacenarse en BOPP a 45°C a un  $a_w$  de 0.810, en cámaras con luz fluorescente

Si la lisina disponible no cambia, entonces, el factor predominante de deterioro es la pérdida de vitamina C. Si la vitamina se destruye, la biodisponibilidad del hierro también se ve afectada (Clydeslade y Nadeau, 1985), con lo cual el producto no lograría cubrir el 50% del requerimiento diario de hierro en niños menores de 3 años. A partir de esto, se utilizó como punto final de deterioro una pérdida mínima del 10% de la vitamina (Figura 8). De acuerdo a la ecuación obtenida de vida útil en función de la temperatura, se logró estimar en 9 meses la vida útil del producto. Dicho tiempo se logra si se mantiene el producto a 21°C, expuesto a una fuente de luz fluorescente, a un 82% HR y utilizando BOPP

como material de empaque, lo cual es indicativo de la alta durabilidad que posee el producto.

En la Figura 8 se resalta la gran variación producida en la vida útil por parte de la temperatura causada, entre otras razones, por la alta sensibilidad de la vitamina C al calor. A 45°C, la vida útil es de tan solo 4,5 días mientras que a 30°C dicho valor aumenta a 70 días, indicando que al mantener la temperatura a niveles bajos se puede lograr una mayor durabilidad del producto.

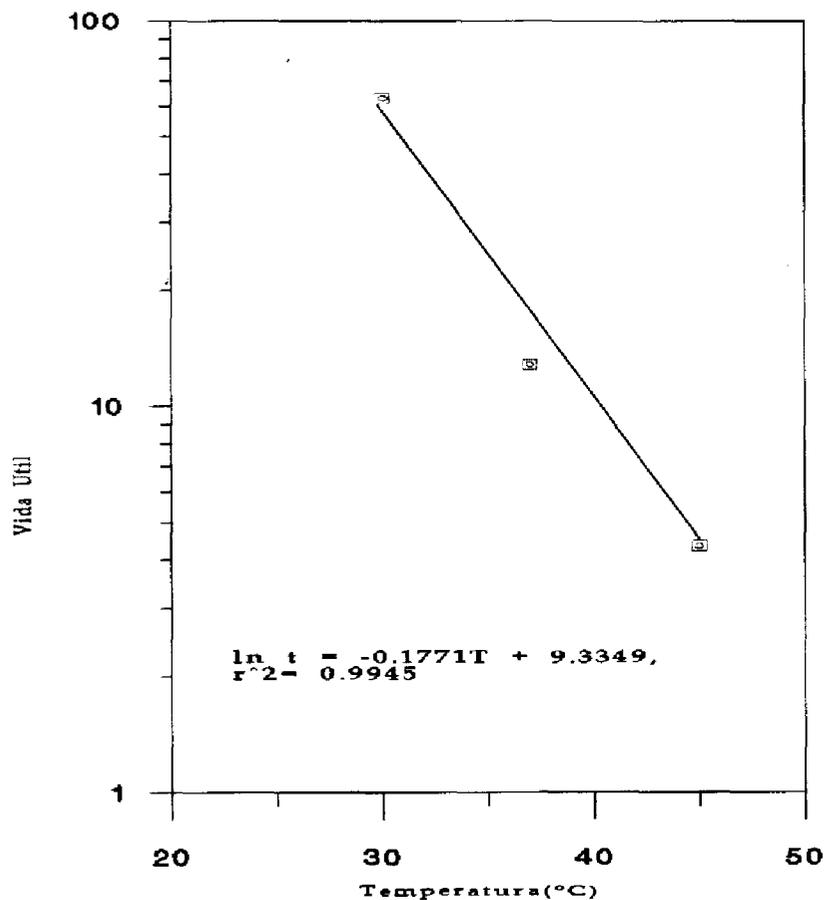


Figura 8. Vida útil del producto de frijol empacado en BOPP a 82% HR, de acuerdo a una pérdida mínima del 10 % de la vitamina C.

## V. CONCLUSIONES

El producto presenta una isoterma de adsorción Tipo II, característico de alimentos porosos.

Este producto posee una gran estabilidad debido a que su  $a_w$  coincide con el valor de humedad de monocapa el cual es 4.62 a 25°C y 4.47 g agua/100 g sólidos secos a 37°C.

El valor de humedad de monocapa se comporta de acuerdo a la ecuación  $\ln X_m = 1.60 - 0.0029T$ .

El deterioro de la vitamina C en el producto empacado en BOPP, se comporta de acuerdo a una regresión lineal con respecto al tiempo de almacenamiento ( $p=0.0001$ ), para las diferentes temperaturas estudiadas. En el caso de 30°C, el comportamiento lineal se da a partir de los 43 días.

No hubo variación significativa ( $p=0.1120$ ) en el contenido de lisina disponible durante el tiempo de almacenamiento, ni entre las temperaturas en estudio ( $p=0.4576$ ).

El componente determinante para estimar la vida útil de este producto, lo constituyó el deterioro de la vitamina C, con una pérdida mínima de un 10% como índice de deterioro.

El producto posee una vida útil de 9 meses a 21°C, empacado en bolsas de BOPP bajo un 82% HR, y con exposición a la luz.

El efecto de la temperatura de almacenamiento y el material de empaque es muy significativo en la estabilidad del producto.

## VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda aumentar la formulación del producto en un 10% de la vitamina C, para asegurar que en un tiempo de 9 meses, al utilizar BOPP como material de empaque, a un 82% HR y 21°C se mantenga la relación de 1:4 (m/m) de vitamina C: hierro.

Se recomienda realizar pruebas biológicas del producto con diferentes relaciones molares entre la vitamina C y el hierro que estén por debajo de la relación de 1:4 (m/m). Con el fin de encontrar el porcentaje de pérdida de vitamina C que provoque una disminución significativa en la biodisponibilidad del hierro.

Se recomienda realizar pruebas con un sistema de empaque que proteja contra la oxidación, como por ejemplo en atmósfera de N<sub>2</sub>, vacío, o utilizar empaques con una mayor barrera al O<sub>2</sub> (PVDC, EVOH, etc).

## VII. REFERENCIAS

- AOAC.1990 Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Badui, D.S., 1981.Química de los alimentos. Editorial Alhambra, S.A. México.
- Belitz, H.D., y Grosch, W. (Ed). 1988 Química de los Alimentos, Editorial Acribia., Zaragoza, España.
- Blot, I., and Vovor, A. 1989. Anemia in Third World children. Rev. Prat. 39(24):2125-2127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Brubacher, G., Müller-M, and Southgate, D.A.T. 1985. Methods for the determination of vitamins in food: Recommended by COST 91. Brubacher, G.(Ed), Elsevier Applied Sci. Pub., New York.
- Costa, N.M., Kannan, S., and Mason, A.C. 1998. Unpublished data. Dept. Foods and Nutrition, Purdue Univ., West Lafayette, I.N.
- Clydesdale, F.M., and Nadeau, D.B. 1985. Effect of acid pretreatment on the stability of ascorbic acid complexes with various iron sources in a wheat flake cereal. J Food Sci. 50: 1342-1347.
- Cook, J.D. 1983. Determinants of nonheme iron absorption in man. Food Technol. 37 (10): 124-126.
- Derman, D.P., Bothwell, T.H., MacPhail, A.P., Torrance., J.D., Bezwoda, W.R., Charlton, R.W., and Mayet, F.G.H. 1980. Importance of ascorbic acid in the absorption of iron from infant foods. Scand J. Haematol. 25, 193-201.
- Fergus, M.C. 1983. Physicochemical determinants of iron bioavailability. Food Technol. 37 (10) : 133-138.
- Hallberg, L., Brune, M., and Rossander, L . 1986. Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of meals. Human Nutrition : Appl. Nutr. 40A, 97-113.
- Hallberg, L. 1981. Effect of vitamin C on the bioavailability of iron from food. Ch.3 in Ascorbic Acid, J.N. Counsell & D. Horning (Ed), p. 49-61. Applied Science Publishers., London.

- Iglesias, H.A, and Chirife, J. 1976. BET. Monolayer values in dehydrated foods and food components. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*9: 107-113.
- Iglesias, H.A, and Chirife, J. 1984. Technical note: Correlation of BET monolayer moisture content in foods with temperature. *J Food Tech.* 19: 503-506.
- Jenkins, W.A., and Harrington, J.P. 1991.Packing foods with plastics. Technomic Publishing Co., Inc. Massachusets.
- Labuza, T.P.1968. Sorption phenomena in foods. *Food Technol.* 22(263) : 15-17,21-22,24.
- Labuza, T.P, Tannenbaum, S.R., and Karel, M. 1970. Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods. *Food Technol.* 24(543): 35-40.
- Labuza, T.P. 1973. Effects of dehydration and storage. *Food Technol.* 27(1): 20-21, 23,25-26.
- Labuza, T.P., and Contreras-Medellin, R. 1981. Prediction of moisture protection requirements for foods. *Cereal Foods World.* 26 (7): 335-343.
- Labuza, T.P., Saltmarch, M. 1981. Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. *J. Food Sci.* 47: 92-96
- Labuza, T. P. (Ed.).1982 Shelf-life dating of foods Food & Nutrition Press., Westport, Connecticut.
- Labuza, T.P.1983. Standard procedure for isotherm determination. *Food Res.* 28 (4):258.
- Labuza, T.P.1984.Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use. The American Association of Cereal Chemists. Minnesota.
- Lynch, S.R., and Cook, J.D. 1980. Interaction of vitamin C and iron. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 355 : 32-44.
- Marks, J. 1975. A Guide to the Vitamins. Their role in health and disease. MTP, Medical and Technical Pub. Co., Ltd. Lancaster, England.
- Ministerio de Salud. ICIENS.1996. Encuesta Nacional de Nutrición. Fascículo Micronutrientes. San José, Costa Rica.

- Montgomery, D.C. 1991. Análisis de covarianza. Cap. 17 en Diseño y Análisis de Experimentos, N. Grepe (Ed.), p. 511-527. Grupo Editorial Iberoamérica, México.
- Muñoz, L y Ulate, E. 1994. Informe Interno de la Escuela de Nutrición. Univ. Costa Rica.
- Nielsen, S.S. (Ed) 1994. Introduccion to the chemical analysis of foods, Jones and Bartlett Publishers., Boston, MA.
- Palipane, K.B. and Driscoll, R.H. 1992. Moisture sorption characteristics of in-shell macadamia nuts. J .Food Ing. 18 :63-76.
- PAHO-Food and Nutricion Prog. <http://www.paho.org/english/hpp/hpn.htm>
- Robertson, G.L. 1993. Food Packaging: Principles and practice. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ringe, M.L., and Love, M.H. 1988. Kinetics of protein quality change in an extruded cowpea-corn flour blend under varied steady-state storage conditions. J. Food Sci. 53 (2) : 584-588.
- Sánchez, I. 1996. Fortificación con hierro electrolítico de un alimento seco de frijol predigerido. Proyecto de graduación para optar por el grado de licenciatura en Tecnología de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos. U.C.R.
- Sebrell, W.H. and Harris, R.S. 1967.The Vitamins. Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. 2.Ed.Vol I. Academic Press.,New York.
- Shridhar, K.S., Deshpande, S.S., and Salunkhe, D.K. 1984. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 1. Chemical Composition: Proteins. CRC Critical Reviews in Food Sci and Nutr. 20 (1): 1-31.
- Ulate, R.J y Bonilla, L.A. 1993. Método modificado para la determinación de ácido ascórbico en frutas por medio de cromatografía líquida de alta presión. Reviteca, 2(1-2):48-51.
- Vázquez, M.L., Vázquez, M.E., López H.J., Simal, L.J., and Romero, M.A. 1994. Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 77 (4):1056-1059.

## **APENDICE I**

## **Implementación del método de determinación de vitamina C para HPLC**

### **I. MATERIALES Y METODOS**

Se utilizó como base de esta implementación, los métodos descritos por Ulate y Bonilla (1993), y Vázquez Oderiz *et al* (1994).

El fundamento del método consiste en estabilizar la vitamina C extayéndola con ácido meta-fosfórico ( $\text{HPO}_3$ ), el cual es un eficaz donador de protones, pero no oxida a la vitamina. Se evita la acción catalítica que puedan presentar las trazas de metales como el  $\text{Cu}^{+2}$  ó  $\text{Fe}^{+3}$  utilizando un exceso de EDTA en la disolución de extracción. El extracto acuoso se filtra y/o centrifuga, se diluye y se inyecta en la columna cromatográfica, previa filtración en microporo, para su separación y cuantificación por medio de un patrón estándar externo de vitamina C USP-FCC (Roche).

Al ser ambas formas de la vitamina C fisiológicamente activas en los tejidos, se realizó la cuantificación como ácido ascórbico y dehidroascórbico.

#### **1. Extracción de la vitamina.**

Se pesó 20.00 g de muestra, y se evaluaron, los volúmenes y concentraciones de extracción que se presentan en el cuadro A.1

Cuadro A.1. Volúmenes y concentración de  $\text{HPO}_3$  utilizados para extraer la vitamina C.

Volumen de extracción (mL)	% de $\text{HPO}_3$
100.0	6.0
200.0	6.0
200.0	15.0
200.0	4.5
500.0	4.5

## 2. Filtración del homogeneizado

Se evaluó la filtración por gravedad, en algodón y diversos papeles de filtro (Watman No. 4 y 541), y la centrifugación a 3659 xg a 15°C, y a 8234 xg, a -5°C.

## 3. pH de trabajo

Se realizaron pruebas para ajustar el pH de la fase móvil de acuerdo a las condiciones de trabajo de la columna cromatográfica. Dicha fase móvil se componía de ácido acético glacial en agua desionizada.

Los extractos ácidos de la muestra, se modificaron por diversas pruebas con una disolución de KOH al 10%, para lograr un pH de trabajo adecuado para la columna en uso (2.5 - 7.5).

También se realizó ajuste del pH con cada patrón utilizado para la calibración del análisis, para que todas las soluciones inyectadas tuvieran el mismo pH.

#### **4. Integración del área que representa a la vitamina C.**

Se evaluó la utilización de dos tipos de integración; según una línea base horizontal, y otra de acuerdo a una línea trazada desde el punto donde se detecta un cambio de pendiente debido al pico que representa a la vitamina C.

## II. RESULTADOS Y DISCUSION

### 2.1 Extracción

De acuerdo al Cuadro A.2, se puede notar una gran variación en la recuperación de la vitamina al ser extraída en volúmenes de 100 y 200 mL. Dicha variación puede deberse a que al utilizar volúmenes de esta magnitud, no fue posible realizar un suficiente número de lavados, y en consecuencia, no se extrajo toda la vitamina presente en la muestra. Al realizar las extracciones en un balón de 500 mL, se incrementó el número de lavados mejorando así la extracción de la vitamina. Esto se observa al comparar los volúmenes de 200 mL (15 y 4.5% de  $\text{HPO}_3$ ) con el de 500 mL (4.5% de  $\text{HPO}_3$ ), donde se logró aumentar la recuperación de vitamina C desde un 54% en promedio hasta un 110%.

Cuadro A.2. Recuperación obtenido (%) en las diferentes extracciones de vitamina C.

Volumen de extracción (mL)	% de $\text{HPO}_3$	% Recuperación
100.0	6.0	85
200.0	6.0	141
200.0	15.0	58
200.0	4.5	50
500.0	4.5	110

Al hacer la prueba con el volumen de 500.0 mL, se utilizó la recomendación de Vázquez Oderiz *et al* (1993) en el sentido de utilizar 20 g de muestra con 60 mL

de una disolución de  $\text{HPO}_3$  al 4.5% como disolvente de extracción. Además, de acuerdo con Sebrell y Harris (1967), la relación entre la disolución de extracción y la muestra en un tejido suave debe ser de 7:1 o 4:1. En el caso de vegetales deshidratados y con altos contenidos de almidón dicha relación debe aumentar. Por lo anterior la disolución de extracción se cambio de una relación de 3:1 a 4,5:1 utilizando 70 mL de la disolución del ácido y 20 mL de la disolución de EDTA (se añade un exceso de acuerdo al contenido en la muestra de un 0.02% de hierro electrolítico) para 20 g de muestra. Al realizar lo anterior, sumado 3 extracciones de 50 mL y un último lavado de 30 mL, se obtuvo un 110% de recuperación.

## **2.2 Filtración del homogeneizado**

De acuerdo al Cuadro A.3, la filtración por gravedad resultó ser inadecuada por lo lento del proceso. Al centrifugar a 3659x g a 15°C, se mejoró la rapidez de la operación, pero al utilizar la membrana de microporo de 0.25 $\mu\text{m}$  fue necesario aplicar un gran esfuerzo para obtener al menos 0.5 mL del filtrado. Por tal motivo, se probó la recomendación de Brubacher, *et al* (1985), en cuanto a centrifugar a una velocidad cercana a los 10166x g y 14639xg. Debido a que la muestra contenía un alto porcentaje de carbohidratos disponibles (48.3%) entre ellos al almidón, se complementó con lo indicado por Sebrell y Harris (1967), realizando la operación a una temperatura baja.

Al probar, una centrifugación a 8234x g por 10 minutos y a -5°C (temperatura de la cámara de la centrífuga), se eliminaron los problemas de la

filtración por microporo. Además, se mejoró el tiempo de análisis, debido a que era necesario realizar 3 extracciones más de 50 mL y una última de 30 mL.

Cuadro A.3. Resultado de los diferentes tipos de filtrado

Tipo de filtrado	Resultado obtenido
Por gravedad, con algodón y papel No.4 y 541.	Operación muy lenta
3659xg a 15°C	Obstrucción del microporo de 0.25µm
8234xg a -5°C	Filtración ágil y rápida con microporo de 0.25µm

### 2.3 Ajuste del pH.

Si la columna se somete a pH menores a 2.5, los enlaces de los grupos silanos (SiO) con los respectivos hidrocarburos (C18) pueden ser atacados e hidrolizados, lo cual hace que se disminuya la vida útil de la misma.

#### 2.3.1 Fase móvil

De acuerdo a las condiciones de trabajo de la columna, fue necesario modificar la fase móvil utilizada por Ulate y Bonilla (1993). No se utilizó, en este caso, la fase móvil propuesta por Vázquez Oderiz *et al* (1994), debido a que al utilizar al ácido sulfúrico en lugar del ácido acético, la fase sería más corrosiva para el equipo. La fase modificada, se componía de una disolución de agua:ácido acético (88:12) con un pH de 2.2. Disminuyendo la cantidad del ácido, se logró obtener una relación de agua:ácido acético de 98,5:1,5 con un pH de 2.5-3.0.

### **2.3.2 Muestra**

La muestra, al igual que la fase móvil, debe ser sometida a un ajuste de pH. Pero, en este caso, se tomaron en cuenta dos aspectos; primero, que el máximo de absorción del ácido ascórbico depende del pH, en 2 es a 244nm, y ya a un pH entre 6 y 10 dicho máximo cambia a 266 nm (Belitz y Grosch, 1988). Y, en segundo lugar, dado que la oxidación anaeróbica es mínima a un pH de 2 y máxima a uno de 4, se realizaron diversas pruebas para aumentar el pH de la solución de la muestra de 1,60 a un pH entre 2.5 y 3.0. Esto se logró, utilizando 40 mL de una disolución de KOH al 10% en un volumen de 500 mL. Con este procedimiento, se asegura un máximo de absorción estándar para todas las muestras, un mínimo deterioro oxidativo anaeróbico posible del ácido ascórbico, y una mayor vida útil de la columna cromatográfica.

### **2.4 Curva de calibración**

La recta obtenida tuvo un coeficiente de correlación de 0.99452, denotando una zona de linealidad entre 10.0 y 60.0 ppm . Esta recta tiene un corte con el eje y de  $9.23330e-001$ , y una pendiente de  $6.52383e-006$ . El factor de respuesta (FR) se obtuvo en un rango de  $6.72154e-006$ , con una desviación estándar de  $2.84600e-007$ , lo que significa un coeficiente de variación de 4.23 %.

## 2.5. Integración del área de los cromatogramas.

De acuerdo con las Figuras A.1 y A.2, que se muestran en esta sección, se observan dos tipos de integración del área que representa a la vitamina C.

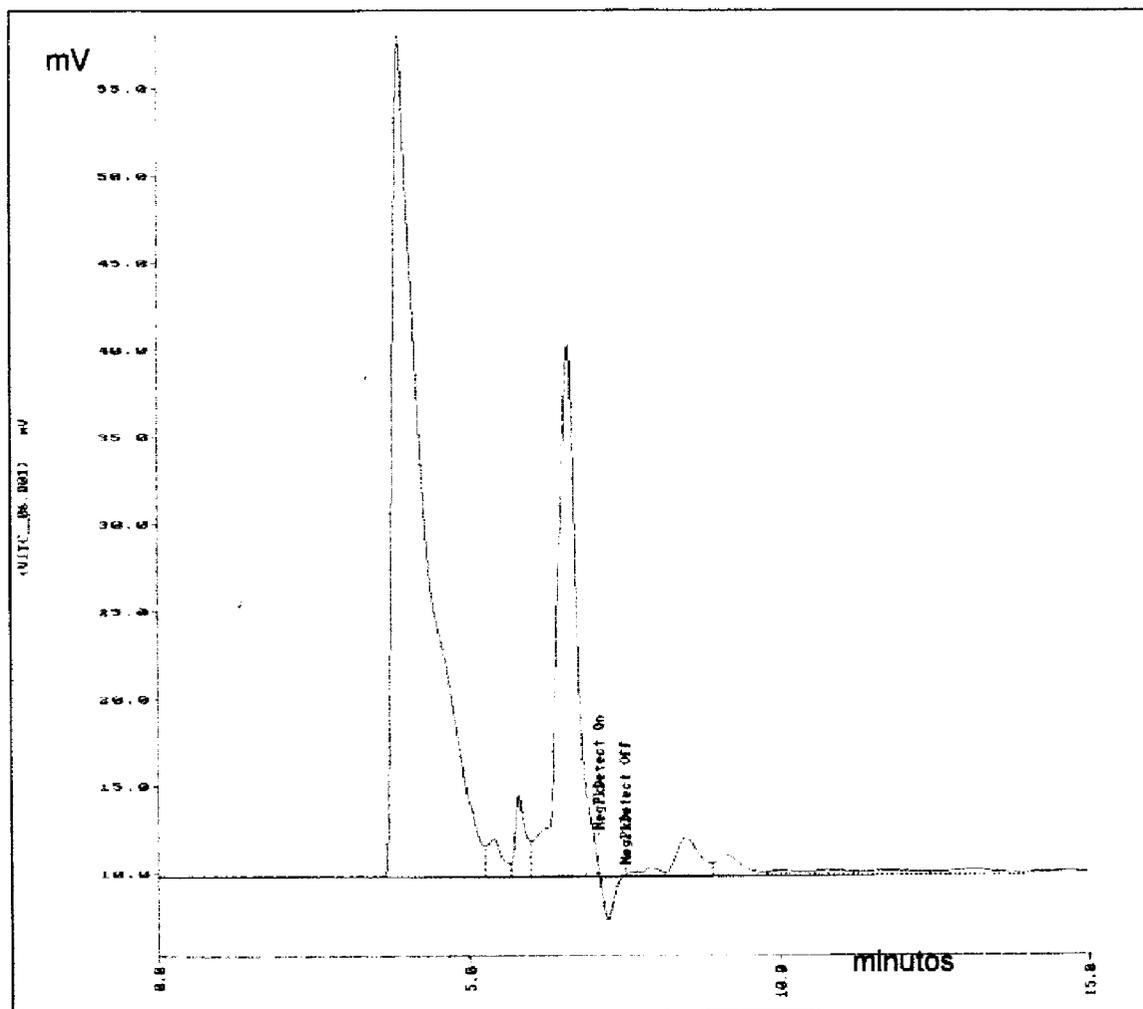


Figura A.1. Integración del área de la vitamina C (RT de 6.57 min), utilizando la línea base como punto de referencia.

En la Figura A.1, al realizar la integración del área que representa a la vitamina, se utilizó el criterio de tomar en cuenta toda el área del pico que resuelve a los 6.57 minutos. De acuerdo a esto, se nota en dicha figura, como la línea base se mantiene como referencia para realizar dicho cálculo. Sin embargo, al

utilizar este tipo de integración, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 158%. Al obtener un valor tan alto, se procedió a cambiar la forma de integración del área, como se muestra en la Figura A.2. Esta integración, consistió en utilizar una línea inclinada en la base del pico que representa a la vitamina, según cambios de pendiente que se presentan en la línea del cromatograma. Al cambiar la forma de la integración, se logró que el porcentaje de recuperación pasase de un 158% a un 110%, considerado este, como un valor más real para trabajar el método de análisis.

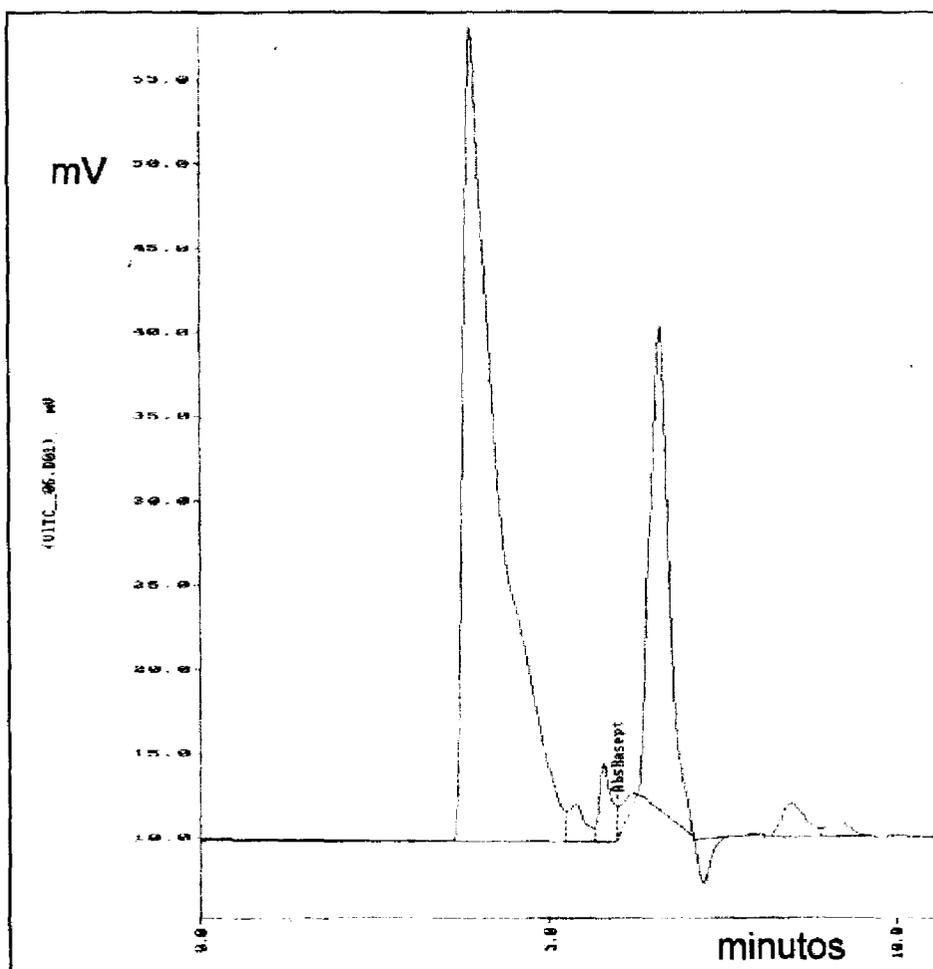


Figura A.2. Integración del área que representa a la vitamina C (TR 6.57 min) utilizando la integración en base a una línea base inclinada según los cambios de pendiente que se presentan en la línea del cromatograma.

En definitiva, las modificaciones probadas fueron :

- La extracción óptima de la vitamina se logra con una relación de 4,5:1 entre el ácido metafosfórico (incluyendo el volumen de EDTA) y la masa de muestra, y utilizando un volumen de 500.0 mL que asegura la posibilidad de realizar 3 extracciones de 50 mL y un lavado final de 30 mL.
- La separación de sólidos y coloides, se logró utilizando una centrifugación a 8234xg a -5°C en la cámara del equipo de centrifugación.
- La fase móvil adecuada para analizar vitamina C, con una columna C<sub>18</sub> se constituye de agua:ácido acético 98,5:1,5, es decir una concentración del 1.5% de ácido.
- El ajuste del pH a un rango entre 2.5 y 3.0 en el caso de la muestra, requiere 40 mL de KOH al 10% en un volumen de extracción de 500.0 mL.
- La integración del área que representa a la vitamina, donde se obtiene un porcentaje de recuperación aceptable, se logra mediante el uso de la línea base inclinada de acuerdo a los cambios de pendiente que se presentan en la línea que describe el cromatograma.

Para futuras pruebas, puede utilizarse el 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) en la disolución de extracción de acuerdo a lo señalado por Brubacher, *et al* (1985), en cuanto que este elimina la oxidación de la vitamina por parte de trazas de metales, y por la protección que brinda a la vitamina durante la extracción y el análisis cromatográfico.

## **Verificación de la linealidad en la determinación de la lisina como DNP-lisina**

Se obtuvo zona de linealidad entre 0.050 y 0.401  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con un coeficiente de correlación de 0.99879. Una recta con pendiente de  $3.08716\text{e-}07$  y un corte con el eje y de  $-3.29024\text{e-}01$ . El factor de respuesta (F.R.) se obtuvo en un rango de  $2.49867\text{e-}07$ , con una desviación estándar de  $3.75851\text{e-}08$ . Lo que significa un 15.04 % de coeficiente de variación.