



UNIVERSIDAD  
TÉCNICA DE AMBATO

Vol. 26-1  
Julio 2018



# ALIMENTOS

Ciencia e ingeniería

Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

ISSN 1390 - 2180



# ALIMENTOS

CIENCIA E INGENIERÍA

Revista de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
Vol. 26-1 2018



# EDITORIAL

Estimados lectores, reciban un cordial saludo del equipo que colabora con este medio de difusión académica, la Revista Alimentos, Ciencia e Ingeniería. En el volumen 26-1, se ha seleccionado artículos relacionados al campo de la alimentación, biotecnología y ambiente.

En este número, se presenta una investigación que busca evaluar las antocianinas y micronutrientes de una variedad de papa nativa. Los resultados permitirán que la industria alimenticia y los consumidores aprovechen este potencial para dar valor agregado a esta materia prima y se incremente el consumo de variedades nativas del Ecuador. Además, se publica un interesante trabajo, en el cual se establece un análisis de los cambios reológicos y panificables que sufre el almidón de maíz, mediante la fermentación; estos resultados permitirán optimizar el manejo de masas para la producción de derivados del maíz.

En el ámbito de la biotecnología se presenta un tema de mucha actualidad en donde se plantea la inmovilización de activos antioxidantes para el uso en la industria cosmética para ello los investigadores proponen lograr la estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100. Por otra parte, se expone un trabajo que tiene una importante proyección ambiental, a través del empleo de microalgas psicrófilas en la producción de lípidos que serán usados para la síntesis de biodiesel, de especies presentes en la Antártida.

En el área ambiental se presenta una investigación que realiza el análisis aerobiológico del relleno sanitario perteneciente al Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Salcedo, identificándose un potencial riesgo para la salud de las personas que están en el perímetro cercano a este lugar. Además, se publican resultados de un trabajo sobre la medición del efecto invernadero en el terminal del cantón Salcedo (provincia de Cotopaxi), lo cual se constituye en un aporte no solo científico, que se cumple en la praxis para mejorar la calidad de vida de los pobladores de este sector del país.

Consideramos oportuno mencionar que los trabajos científicos presentados se basan en el trabajo desarrollado por Docentes que son parte de la Facultad de Ciencia de Alimentos, así como de investigadores que han contribuido con los resultados de sus trabajos para la realización de este número. Sin duda serán importantes, como un especial aporte para el conocimiento de nuestros lectores. Finalmente, queremos expresar nuestra gratitud a los investigadores que han contribuido con este número, y comunicamos que mantenemos abierta la invitación para que publiquen con nosotros, hasta el próximo número.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>DESCRIPCIÓN</b>	Pag. 03
<b>AUDIENCIA</b>	Pag. 03
<b>INDEXACIÓN</b>	Pag. 03
<b>DIRECTORIO</b>	Pag. 03
<b>COMITÉ EDITORIAL</b>	Pag. 03
<b>ISSN</b>	Pag. 04
<b>TIRAJE</b>	Pag. 04
<b>CONVOCATORIA PRÓXIMO NÚMERO</b>	Pag. 04
<b>ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN</b>	Pag. 07
<b>GUÍA PARA AUTORES</b>	Pag. 77

*Tipos de publicaciones*

*Principios generales*

*Proceso editorial*

*Formato*

*Contenido de los artículos de investigación*

*Contenido de los trabajos diferentes a los artículos de investigación*

## **DESCRIPCIÓN**

---

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

## **AUDIENCIA**

---

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

## **INDEXACIÓN**

---

Latindex (en Catálogo desde Diciembre 2014)

## **DIRECTORIO**

---

**Dr. Galo Naranjo López**, Rector, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dra. Adriana Reinoso Núñez**, Vicerrectora Académica, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Ing. Jorge León Mantilla**, Vicerrector Administrativo, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dra. Jacqueline Ortiz Escobar**, Decana FCIAL, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dra. Mayra Paredes Escobar**, Subdecana FCIAL, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dr. Freddy del Pozo**, Director DIDE, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

## **COMITÉ EDITORIAL**

---

### *Editor*

**Dr. David Terán Mera**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

### *Revisores estilo*

**Dra. Verónica García Ibarra**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dr. Christian Franco Crespo**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

### ***Revisores internos***

**Dra. Liliana Cerda**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dra. Cristina Arteaga**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dr. Orestes López**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dr. Milton Ramos**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

**Dr. Rodney Peñafiel**, Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)

### ***Revisores externos***

**Dr. Pedro Gustavo Maldonado**, Escuela Politécnica Nacional (Ecuador)

**Dr. Juan Sebastián Ramírez**, Universidad del Valle (Colombia)

**Dra. Pamela Jaramillo**, Secretaría Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación. (Ecuador)

Dra. Sandra Horvitz Szoichet

### **ISSN**

---

1390-2180 (Edición impresa)

### **TIRAJE**

---

350 ejemplares impresos en papel

### **PERIODICIDAD**

---

Semestral (dos números al año)

### **AÑO DE INICIO DE PUBLICACIÓN**

---

1992 (34 Volúmenes editados hasta la fecha)

### **REVISTA ELECTRÓNICA**

---

Accesible a través de:

- Sitio web FCIAL: [http://fcial.uta.edu.ec/fcial3/index.htm#xl\\_xr\\_page\\_revistaaci](http://fcial.uta.edu.ec/fcial3/index.htm#xl_xr_page_revistaaci)
- Plataforma OJS: <http://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/aci/index>

### **CONVOCATORIA PRÓXIMOS NÚMEROS**

---

Fechas límite (deadlines) para entrega de manuscritos:

- Para publicación en JUNIO 2018: \_\_\_\_\_ Recepción de manuscritos hasta: 15 ABRIL 2018.
- Para publicación en DICIEMBRE 2018: \_\_\_\_\_ Recepción de manuscritos hasta: 15 SEPTIEMBRE 2018

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

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

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





## ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

- Evaluación de antocianinas y micronutrientes en papa nativa (*Solanum andigena*)** Pag. 7-16  
Evaluation of anthocyanins and micronutrients in native potatoes (*Solanum andigena*)  
*V. Balladares, M. Ramos*
- Modificación de las propiedades reológicas y panificables mediante fermentación del almidón de maíz variedad INIAP 122** Pag. 17-25  
Modification of rheological properties and breadmaking by fermentation of corn starch variety INIAP 122  
*P. Acurio, E. Villacrés, M. Paredes*
- Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel** Pag. 26-48  
Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel  
*G. Huilca, L. Licto, R. Flores, F. Proaño*
- Análisis aerobiológico del relleno sanitario del gobierno autónomo descentralizado del cantón Salcedo** Pag. 49-56  
Aerobiological analysis of the sanitary fillage of the decentralized autonomous government of Salcedo's city  
*M. Córdova-Suárez, Nicole-Vásconez, Diego-Solis, E. Garcés-Sánchez, P. Ramos-Córdova*
- Medición de las emisiones de efecto invernadero en el terminal terrestre de Salcedo** Pag. 57-67  
Measurement of greenhouse emissions in the terrestrial terminal of Salcedo  
*M. Córdova-Suárez, A. León-Silva, E. Garcés-Sánchez, D. Borja-Mayorga, D. Córdova-Suárez*
- Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética** Pag. 68-76  
Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation  
*D. Fernández, A. Fernández, Y. Gelabert, C. Pino*

## EVALUACIÓN DE ANTOCIANINAS Y MICRONUTRIENTES EN PAPA NATIVA (*Solanum andigena*)

### EVALUATION OF ANTHOCYANINS AND MICRONUTRIENTS IN NATIVE POTATOES (*Solanum andigena*)

V. Balladares\*, M. Ramos

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

Artículo recibido: 30/11/2018

Artículo aceptado: 28/02/2019

#### RESUMEN

La papa nativa (*Solanum andigena*) se produce y comercializa en la zona andina del Ecuador, y representa la base de la alimentación de gran parte de la población, tanto urbana como rural. Actualmente, existe demanda por productos andinos debido a su alto valor nutritivo y contenido de bioactivos. La finalidad de este proyecto de investigación fue evaluar el contenido de antioxidantes (antocianinas) y micronutrientes (hierro, magnesio y calcio) en las variedades de papa nativa Puca Shungo, Yana Shungo y Yema de huevo, entera y pelada. Se realizaron análisis químicos para caracterizar las variedades de papa nativa, el método de pH diferencial mediante espectrofotometría UV-visible para cuantificar el contenido de antocianinas, y los métodos oficiales de la AOAC mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con Llama para la determinación de micronutrientes. El mayor contenido de antocianinas totales se encontró en la papa Yana Shungo entera con 252,77 mg/100 g de materia seca. De igual manera los contenidos más altos de hierro y magnesio se presentaron en la variedad Yana Shungo entera con valores de 8,38 y 152,64 mg/100 g de materia seca, respectivamente. En cuanto a calcio, el mayor contenido fue de 55,47 mg/100 g de materia seca presente en la variedad Yema de huevo entera.

**Palabras claves:** Tubérculos, antioxidantes, minerales, papa, polifenoles.

#### ABSTRACT

Native potatoes (*Solanum andigena*) are produced and commercialized in the Andean region of Ecuador and they represent the foundation of the population's feeding, both urban and rural. Currently, there is demand for Andean products because of their high nutritional value and bioactive content. The purpose of this investigation was to evaluate the content of antioxidants (anthocyanin) and micronutrients (iron, magnesium and calcium) in the native, peeled and unpeeled potatoes Puca Shungo, ("red heart") Yana Shungo ("black heart") and Yema de huevo ("egg yolk"). Chemical analysis were made in order to characterize the varieties of native potatoes. Also, the differential pH method by UV-visible spectrophotometry was used to quantify the content of anthocyanin and the official methods of analysis (AOAC) in combination with the flame atomic absorption spectrophotometry technique to determinate the content of micronutrients. The highest content of anthocyanin was found in the unpeeled Yana Shungo variety with 252.77 mg/100 g (dry weight). Similarly, the highest contents of iron and magnesium were found in the unpeeled Yana Shungo variety with 8.38 and 152.64 mg/100 g (dry weight), respectively. In the other hand, the highest level of calcium was found in the unpeeled Yema de huevo variety with 55.47 mg/100 g (dry weight).

**Keywords:** Tubers, antioxidants, minerals, potatoes, polyphenols

## 1. INTRODUCCIÓN

La papa nativa (*Solanum andigena*) se caracteriza por la diversidad de formas, tamaños y colores. Así, la forma puede ser redonda, alargada, aplanada, comprimida, entre otras; mientras que los colores de la piel y pulpa varían entre amarillo, morado, rojo y rosado, con diseños atractivos en la pulpa (Martínez, 2009). Los colores indican la presencia de antioxidantes naturales como flavonoides, carotenoides y antocianinas, que actúan contra los radicales libres impidiendo su acción degenerativa en las células (Tanquina, 2013). Monteros et al. (2005) mencionan que el contenido de minerales en la papa nativa es importante, principalmente en hierro (Fe) con valores superiores a la papa mejorada.

Badui (2006) señala que las antocianinas producen un efecto benéfico en la salud por su actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antidiabética y antitumoral; mientras que el Fe transporta y almacena el oxígeno a través de la hemoglobina y mioglobina, y participa como cofactor de varias enzimas. Finalmente, el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) son los minerales más abundantes en el cuerpo humano y cumplen principalmente funciones estructurales en huesos y dientes. En consecuencia, el objetivo de la investigación fue evaluar el contenido de antocianinas y micronutrientes de las variedades de papa nativa Puca Shungo, Yana Shungo y Yema de Huevo, entera y pelada, con el propósito de promover su producción, procesamiento y consumo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

Se empleó papa nativa de las variedades Puca Shungo, Yana Shungo y Yema de Huevo producida en la provincia de Tungurahua. Primero, los tubérculos frescos se lavaron y cortaron en hojuelas de 5 mm de grosor mediante un procesador de papas Robot Coupe CL Ultra. Luego, las hojuelas se secaron a 50 °C por 24 h en un secador de bandejas GANDER MTN, y se molieron en un Molino M20 IKA WERKE. La papa molida se tamizó a 150 µm, y se guardó en recipientes adecuados.

### 2.2. Composición química

Para determinar la composición química de la papa se utilizaron los métodos oficiales de la AOAC: 2003.06 (grasa), 2001.11 (proteína), 962.09 (fibra cruda) y 923.03 (cenizas). Para determinar humedad se utilizó una balanza infrarroja Mettler-Toledo HX204 calibrada. Los carbohidratos y la energía se determinaron mediante las ecuaciones 1 y 2, respectivamente:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 \% - (\% \text{ H} + \% \text{ C} + \% \text{ G} + \% \text{ P} + \% \text{ F}) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: H = Humedad, C = Cenizas, G = Grasa, P = Proteína y F = Fibra cruda.

$$\text{Energía (kcal/100g)} = (\text{P} * 4) + (\text{G} * 9) + (\text{C} * 4) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde: P = Proteína (g/100g), G = Grasa (g/100g) y C = Carbohidratos (g/100g).

### 2.3. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño factorial A x B. Factor A (variedad) con tres niveles:

Puca Shungo, Yana Shungo y Yema de Huevo, y factor B (presentación) con dos niveles: entera y pelada. En la Tabla 1 se presentan las combinaciones del diseño experimental. Cada tratamiento con cinco réplicas.

**Tabla 1.** Combinaciones del diseño experimental

Interacción	Tratamiento
$a_0b_0$	Puca Shungo entera
$a_0b_1$	Puca Shungo pelada
$a_1b_0$	Yana Shungo entera
$a_1b_1$	Yana Shungo pelada
$a_2b_0$	Yema de huevo entera
$a_2b_1$	Yema de huevo pelada

### 2.4. Determinación de antocianinas

Las antocianinas se determinaron en un Espectrofotómetro UV Visible Evolution 201, y según el método de pH diferencial desarrollado por Giusti & Wrolstad (2001).

### 2.5. Determinación de micronutrientes

Lo micronutrientes Fe, Ca y Mg se

determinaron en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica AA500 pg Instruments de llama, y en base a los métodos oficiales de la AOAC: 999.11 (Fe) y 984.27 (Ca y Mg).

### 2.6. Análisis estadístico

El procesamiento de los resultados involucró el análisis de varianza (ANOVA), la comparación de las medias mediante la prueba de Tukey con una significancia de 0,05, y la utilización del software estadístico

Statgraphics Centurion XV.II.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Composición química de la papa entera

En la Tabla 2 se muestra la composición química y la energía de la papa entera de las variedades Puca Shungo, Yana Shungo y Yema de Huevo. Puca Shungo presentó el valor más bajo de humedad (76,3%), por lo que posee el mayor contenido de materia seca y de nutrientes. Según Alvarado (2014), los valores

altos de materia seca contribuyen a un adecuado procesamiento de la papa. Además, todas las variedades presentaron contenidos altos de cenizas (minerales), siendo superiores a las variedades mejoradas (1,08 %) (INCAP, 2012). Yana Shungo presentó los valores más altos de grasa, proteína y fibra cruda con 0,38, 1,92 y 0,88%, respectivamente; mientras que Puca Shungo se destacó por el mayor contenido de carbohidratos (17,35%) y de energía (79,05 kcal/100 g). Los parámetros de cenizas, grasa y fibra cruda presentaron diferencias significativas entre las variedades de papa.

**Tabla 2.** Composición química de la papa entera de las variedades *Puca Shungo*, *Yana Shungo* y *Yema de Huevo*.

Parámetro	<i>Puca Shungo</i>	<i>Yana Shungo</i>	<i>Yema de Huevo</i>
Humedad (%)	76,3 ± 1,22 <sup>b</sup>	79,5 ± 0,93 <sup>a</sup>	78,6 ± 1,92 <sup>a</sup>
Cenizas (%)	3,5 ± 0,15 <sup>c</sup>	4,3 ± 0,16 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,05 <sup>b</sup>
Grasa (%)	0,25 ± 0,046 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,029 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,085 <sup>c</sup>
Proteína (%)	1,84	1,92	1,89
Fibra cruda <sup>1</sup> (%)	0,76 ± 0,073 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,099 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,095 <sup>c</sup>
Carbohidratos <sup>2</sup> (%)	17,35	13,01	14,87
Energía <sup>2</sup> (kcal/ 100 g)	79,05	63,23	68,48

<sup>a, b, c</sup>: Describen grupos homogéneos,  $p < 0.05$ . <sup>1</sup>Obtenido en laboratorio LACONAL. <sup>2</sup>Obtenido por cálculo matemático.

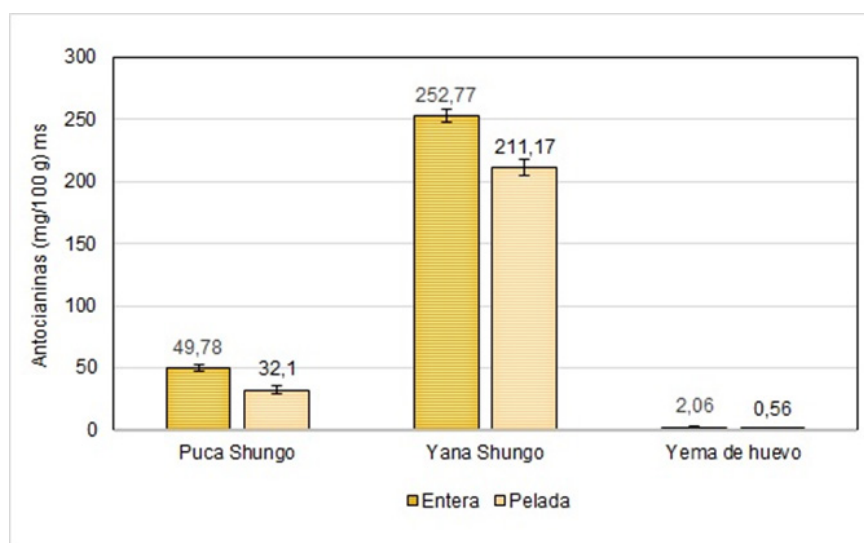
#### 3.2. Determinación de antocianinas de papa entera y pelada

En la Figura 1 se presenta el contenido de antocianinas en las variedades de papa, entera y pelada. Se destaca el mayor contenido de antocianinas

en Yana Shungo, seguido de Puca Shungo, tanto en papa entera como en pelada. Estudios recientes indican que la capacidad antioxidante total, fenoles totales y antocianinas totales se presentan en el siguiente orden descendente: cultivos morados, rojos, amarillos y blancos (Zaheer et al.,

2014). Luego, Yana Shungo al poseer un color morado oscuro contiene la mayor concentración de antocianinas. Al realizar la comparación de las presentaciones en las dos variedades fue evidente el mayor contenido de antocianinas en la papa con cáscara. Comparando los resultados experimentales del contenido de antocianinas de Puca Shungo y Yana Shungo con los reportados bibliográficamente, el contenido de las primeras fue superior, particularmente la variedad Yana Shungo presentó casi el doble del contenido de antocianinas con respecto a lo reportado. Así, Untuña (2013) reportó contenidos de antocianinas de 40 y 152 mg/100 g de materia seca para Puca Shungo y Yana Shungo, respectivamente, valores

inferiores a los observados en el presente estudio (Fig. 1). Similarmente, Tanquina (2013) encontró contenidos menores de antocianinas en Puca Shungo (44,96 mg/100 g ms) y Yana Shungo (168,13 mg/100 g ms). El ANOVA determinó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las variedades de papa y las presentaciones. El bajo contenido de antocianinas en Yema de Huevo se corrobora con su color amarillo, y denota la presencia de carotenoides más no de antocianinas (Herrera et al., 2011). Fuenzalida (2008) evaluó variedades de papa con pigmentación antociánica (morada) y carotenoide (amarilla) y concluyó que la primera presenta la mayor cantidad de polifenoles y actividad antioxidante.



**Figura 1.** Contenido de antocianinas de las variedades *Puca Shungo*, *Yana Shungo* y *Yema de Huevo*, entera y pelada.

### 3.3. Determinación de hierro, magnesio y calcio en papa entera y pelada

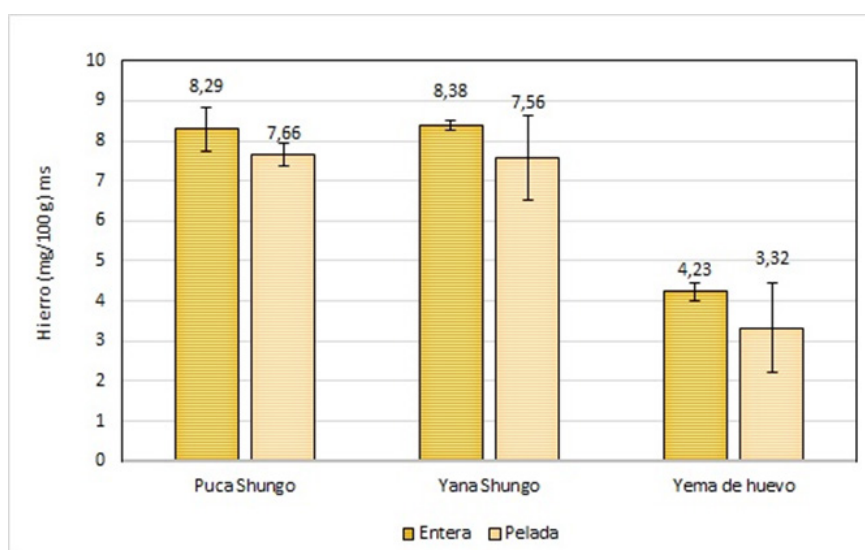
En la Figura 2 se observa que los

contenidos de Fe en Puca Shungo y Yana Shungo son similares, inclusive en las dos condiciones de presentación; sin presentar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellas. Además, los contenidos de Fe de las dos variedades

son superiores a los de Yema de huevo, pelada y entera.

Al comparar los contenidos de Fe en las variedades de papa del presente estudio con el de la papa mejorada Super Chola (4,2 mg/100 g) (Villacrés et al. 2009), se observó que las Puca Shungo y Yana Shungo poseen casi el doble del contenido de este micronutriente; mientras que Yema de huevo presenta un contenido similar al de la variedad

mejorada. Además, Ortega (2014) reportó que los valores más altos de Fe para las variedades mejoradas INIAP-Fripapa y Superchola son de 6,41 y 7,41 mg/100 g de Fe, respectivamente. Debe señalarse que una parte del Fe de la papa mejorada proviene los fertilizantes químicos, mientras que el Fe de la papa nativa proviene de una producción sin utilización de fertilizantes de síntesis.



**Figura 2.** Contenido de hierro de las variedades *Puca Shungo*, *Yana Shungo* y *Yema de Huevo*, entera y pelada.

En la Figura 3 se observa que Yana Shungo, entera y pelada, presenta el mayor contenido de Mg, seguida de Yema de huevo, y finalmente Puca Shungo. Los contenidos de Mg de la papa entera y pelada de Yana Shungo y Puca Shungo presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), siendo la entera la que tiene mayor concentración de este mineral, evidenciándose el aporte de Mg proveniente de la cáscara. Según

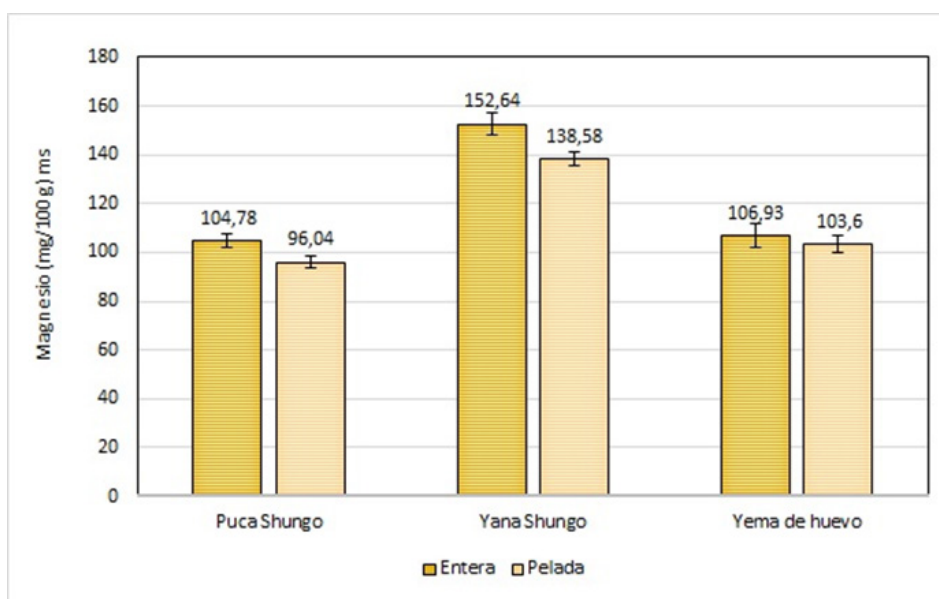
Villacrés et al. (2013), la mayoría de las vitaminas y minerales de la papa se encuentran debajo de la piel. La Yema de huevo no presentó diferencia significativa entre las presentaciones.

Untuña (2013) reportó contenidos de 70 y 140 mg Mg /100 g ms para Puca Shungo y Yana Shungo, respectivamente; mientras que Cuesta et al. (2011) establecieron intervalos de 80 a 130 mg Mg /100 g ms y de



80 a 170 mg Mg/100 g ms para las mismas variedades, respectivamente. Al comparar con el valor reportado por el USDA (2016) de 23 mg/100 g ms de Mg en una papa comercial, se

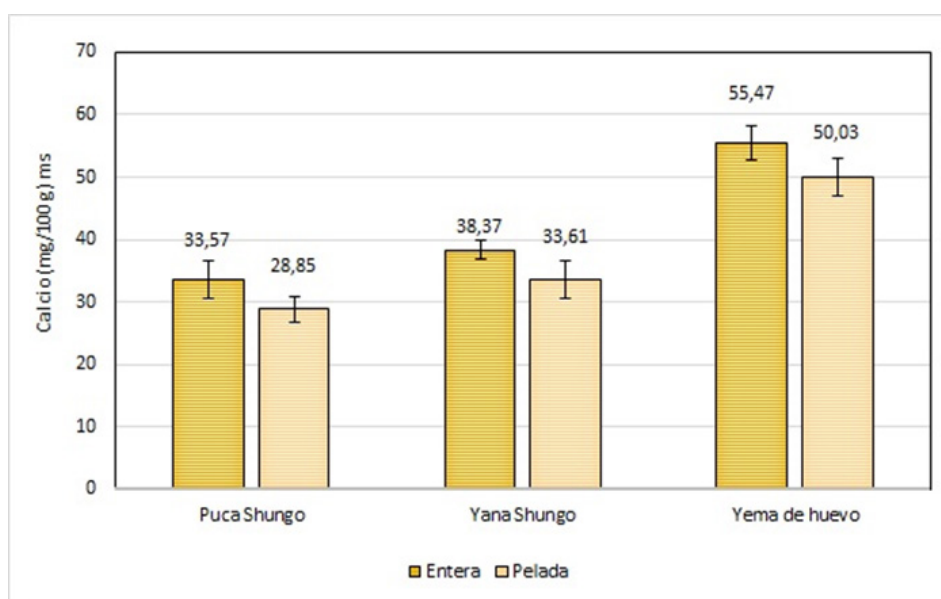
observa que los contenidos de Mg de las variedades nativas son muy superiores; y por tanto, constituyen una excelente fuente de Mg.



**Figura 3.** Contenido de magnesio de las variedades *Puca Shungo*, *Yana Shungo* y *Yema de Huevo*, entera y pelada.

En la Figura 4 se observa que, a diferencia de lo que ocurre con el Fe y Mg cuyos contenidos en Yema de huevo son menores a los de Puca Shungo y Yana Shungo, el contenido de Ca en Yema de huevo es superior a Yana Shungo y Puca Shungo, tanto entera como pelada. Además, las presentaciones de las tres variedades mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que el consumo de papa

con cáscara aportaría con un mayor contenido de Ca. Monteros et al. (2011) indican que los contenidos de Ca para Puca Shungo y Yana Shungo varían de 30 a 60 mg/100 g ms y de 50 a 90 mg/100 g ms, respectivamente. En cuanto a Puca Shungo, el contenido fue similar, y en el caso de Yana Shungo, el contenido fue inferior al señalado bibliográficamente.



**Figura 4.** Contenido de calcio de las variedades *Puca Shungo*, *Yana Shungo* y *Yema de Huevo*, entera y pelada.

#### 4. CONCLUSIONES

Todas las variedades de papa nativa presentaron valores altos de humedad (76,3 – 78,6%), cenizas (3,5 - 4,3%) y carbohidratos (13,0 - 17,4%); y valores bajos de grasa (0,16 - 0,38%) y proteínas (1,8 - 1,9%). Particularmente, Puca Shungo presentó los valores más altos de materia seca, carbohidratos y energía; mientras Yana Shungo los más altos de cenizas, grasa, proteína y fibra cruda.

La variedad y la cáscara influyeron en el contenido de antocianinas y minerales de la papa. Los valores más altos de antocianinas en papa entera y pelada corresponden a Yana Shungo con 252,7 y 211,1 mg/100 g, respectivamente, seguido de Puca Shungo, y con valores muy bajos Yema de Huevo. La papa entera Yana Shungo presentó las mayores

concentraciones de Fe (8,38 mg/100 g) y Mg (152,64 mg/100 g); mientras que Yema de Huevo las más altas de Ca en sus presentaciones pelada y entera con 50,0 y 55,4 mg/100 g, respectivamente. Puca Shungo y Yana Shungo, entera y pelada, presentaron valores similares de Fe, pero superiores a los de Yema de Huevo. Los resultados de la investigación evidenciaron el potencial nutritivo de la papa nativa en términos de antocianinas y micronutrientes.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Técnica de Ambato; al Proyecto Canje de Deuda Ecuador-España “Fortalecimiento de la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos para investigación, tecnología e innovación

en el área de alimentos, con el fin de promover la generación y el desarrollo de empresas agroindustriales en la zona 3 del país, y monitorear el contenido de metales pesados en los cultivos afectados por las cenizas provenientes de las erupciones volcánicas del Tungurahua”; y al Proyecto Red de Cereales “Valoración de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana”. Especiales agradecimientos a los Ingenieros Jorge Briceño, Mónica Silva y Mario Álvarez por su guía y ayuda en la ejecución de la investigación.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. Official Method of Analysis 923.03 (Ash determination), 962.09. (Fiber crude in animal food and pet food), 2003.06 (Crude Fat in Feeds, Cereal Grains and Forages). 15th Edition. USA. (2006)
- AOAC. Official Method of Analysis 984.27. (Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium, Sodium and Zinc in Infant Formula), 999.11. (Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in foods). 15 Edition. USA. (2006)
- Badui, S. (2006). Química de los alimentos. (4ta Ed.). México: Editorial PEARSON EDUCACIÓN.
- Cuesta, X., Monteros, C., Rivadeneira J. & Torres, L. (2011). Variedades de papa nativa. Disponible en: <https://cipotato.org/region-quito/informacion/inventario-de-tecnologias/variedades/>
- Fuenzalida, N. (2008). Determinación de la cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante en papas nativas pigmentadas. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 1–13.
- Herrera, A. & Rodríguez, L. (2011). Tecnologías de producción y transformación de papa criolla. (1era. Ed.). Bogotá-Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- INCAP (2012). Tabla de composición de alimentos de Centro América. (2da, Ed.)
- Martínez, F. (2009). Caracterización morfológica e inventario de conocimientos colectivos de variedades de papas nativas (*Solanum Tuberosum* L.) en la provincia de Chimborazo. (Tesis de Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador.
- Monteros, C., Cuesta, X., Jiménez, J., López, G., & Carmen, C. (2005). Las papas nativas en el Ecuador. INIAP Archivo Histórico.
- Monteros, C., & Reinoso, I. (2011). Informe final del proyecto Proyecto FTG-353/05 “Innovaciones Tecnológicas y Mercados Diferenciados para Productores de

- Papas Nativas.” Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria. (FONTAGRO), INIAP-Ecuador, Quito-Ecuador.
- Ortega, D. (2014). Evaluación del comportamiento agronómico de genotipos de papa (*Solanum tuberosum*) con altos contenidos de hierro y zinc en dos localidades de la Sierra Ecuatoriana. (Tesis de Pregrado). Universidad Central del Ecuador. Quito-Ecuador.
- Tanquina, I. (2013). Efecto de la especie y el procesamiento sobre el contenido de compuestos y propiedades antioxidantes del Maíz (*Zea mays* L.) negro, Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) negro, Sangorache (*Amaranthus quitensis* L.) y variedades de Papas nativas (*tuberosum* grupo *andigenum*). (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Ambato-Ecuador.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2016). Basic report of nutrients of potatoes, flesh and skin, raw en 2016.
- Untuña, P. (2013). Estudio del efecto de la fritura al vacío sobre los atributos de calidad de chips de papa nativa. (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito-Ecuador.
- Villacrés E., Quilca N., Muñoz R., Monteros C. y I. Reinoso. (2009). Caracterización física, nutricional y funcional de papas nativas (*Solanum tuberosum* ssp.) para orientar sus usos en Ecuador. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 15(1):52-54
- Villacrés, E., Quelal, M. & Álvarez, J. (2013). Nutrición, Procesamiento y Gastronomía de Raíces y Tubérculos Andinos en Ecuador: Una revisión bibliográfica de la Papa, Melloco, Oca, Mashua, Zanahoria Blanca y Jícama. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Centro Internacional de la Papa (CIP). Quito-Ecuador.
- Zaheer, K., & Akhtar, M. H. (2014). Recent advances in potato production, usage, nutrition-a Review. *Food Science and Nutrition*, (June), 37–41. <http://doi.org/10.1080/10408398.2012.724479>

## **Modificación de las propiedades reológicas y panificables mediante fermentación del almidón de maíz variedad INIAP 122**

Modification of rheological properties and breadmaking by fermentation of corn starch variety INIAP 122

**P. Acurio<sup>1</sup>, E. Villacrés<sup>2</sup>, M. Paredes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidad Técnica de Ambato (UTA), Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Ambato-Ecuador

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Departamento de Nutrición y Calidad, Mejía - Ecuador.

*Artículo recibido: 04/09/2017*

*Artículo aceptado: 02/06/2018*

### **RESUMEN**

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la fermentación en las propiedades reológicas y panificables del almidón de maíz variedad INIAP 122. El almidón fermentado de maíz se obtuvo mediante dos procesos diferentes tanto de extracción, de fermentación y de secado. Los resultados de las propiedades reológicas mostraron que la fuerza registrada en el Mixolab para gelatinización y retrogradación del almidón fermentado (2,62 a 2,68 Nm) fue menor en relación al almidón sin fermentar (2,96 a 2,88 Nm) lo que indica que el pan fermentado presenta la misma textura por mayor tiempo. El contenido amilásico del almidón fermentado y sin fermentar presenta diferencias estadísticamente diferentes con valores entre 2,11 hasta 2,40 Nm, lo que evidencia que las muestras tienen una actividad amilásica baja provocando masas blandas. Las muestras de almidón fermentado absorben mayor cantidad de agua entre 61 y 66% en relación al almidón sin fermentar 55 %, proporcionando mayor rendimiento en la elaboración de pan. Como resultado de la evaluación sensorial y propiedades panificables el mejor tratamiento fue la muestra molida, fermentada en un biorreactor y secada a 50°C (MB50°C), estas condiciones permitieron obtener un volumen de pan de 61,2 cm<sup>3</sup>, textura de 18,30 N y atributos sensoriales agradables.

**Palabras claves:** Almidón, maíz, pH, acidez, textura y volumen

### **ABSTRACT**

This work evaluated the fermentation effect on the rheological and bread-making properties of corn starch from the variety INIAP 122. Fermented corn starch was obtained by two different processes of both extraction, fermentation and drying. The results showed that the rheological properties in the recorded force Mixolab to gelatinization and retrogradation of the starch fermentation (2.62 to 2.68 Nm) was lower compared to unfermented starch (2.96 to 2.88 Nm) so It is indicating that the fermented bread has the same texture for longer. . The amylose content of the fermented and unfermented starch presents statistical differences between values 2.11 to 2.40 Nm, which shows that the samples have a low amylase activity causing soft dough. Fermented starch samples absorb more water between 61 and 66% compared to unfermented 55% starch. As a result of sensory evaluation and bread-making properties was the best treatment ground, fermented sample in a bioreactor and dried at 50°C (MB50°C), these conditions allowed a volume of 61.2cm<sup>3</sup> bread, texture 18 30 N and pleasant sensory attributes.

**Keywords:** Corn starch, pH, acidity, texture and volume.

## 1. INTRODUCCIÓN

La alta importación de trigo para la elaboración de productos de panificación crea inconvenientes en la Industria Molinera Ecuatoriana y en la economía del país. Diferentes Instituciones buscan alternativas para la sustitución parcial o total del trigo extranjero (Gómez, 2012). El Ecuador es uno de los países con mayor diversidad genética de maíz, actualmente se reconocen 29 variedades siendo el maíz duro seco y maíz suave seco los de mayor producción. Entre el 90 - 96 % es consumido por el sector avícola en la fabricación de alimentos balanceados, alrededor del 4% por industrias de consumo humano y el resto es usado para semilla (Líderes, R., 2018).

Betancourt, (2013), demostró que la fermentación es una alternativa para mejorar las propiedades panificables e incrementar la digestibilidad y el valor nutricional de la harina de maíz.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la fermentación sobre las propiedades reológicas y panificables del almidón de maíz variedad INIAP 122. Esta investigación surge para diversificar el consumo de productos de panificación, revalorizando el cereal ecuatoriano y contribuyendo a la seguridad alimentaria de la población ecuatoriana.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materia prima

Se utilizó maíz de variedad INIAP 122 proporcionado por el departamento de semillas del INIAP

### 2.2. Diseño experimental

Se aplicó el diseño factorial completo 23 con una repetición. Los factores y niveles de estudio se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Diseño experimental. Procesos de extracción, fermentación y secado

Factores	Niveles
a: Método de extracción	a <sub>0</sub> : Molino
	a <sub>1</sub> : Licuado
b: Método de fermentación	b <sub>0</sub> : Biorreactor
	b <sub>1</sub> : Funda plástica
c: Temperatura de secado	c <sub>0</sub> : 50°C
	c <sub>1</sub> : 65°C

### 2.3. Obtención del almidón fermentado de maíz

procesos batch, las etapas se muestran en la Figura 1.

La obtención se realizó mediante

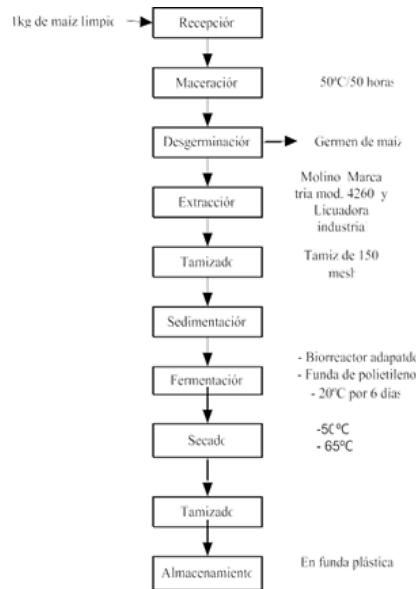


Figura 1. Obtención de almidón fermentado de maíz

### 2.4. Análisis químicos del almidón fermentado de maíz

Se realizó por triplicado la determinación de pH, acidez y humedad según los métodos de la AOAC 02-52, 02-31 y 964.22 respectivamente.

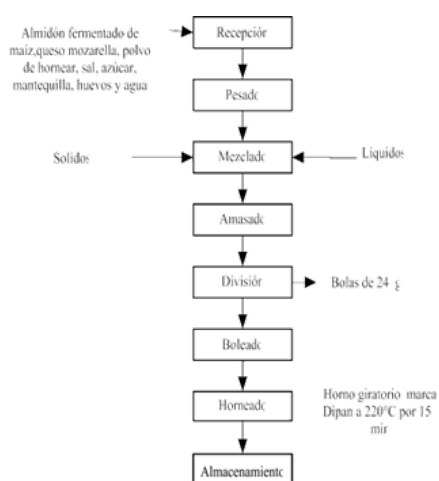
### 2.5. Análisis reológico.

Se determinó parámetros farinográficos como absorción de agua, tiempo de desarrollo, estabilidad y debilitamiento. Además, desarrollo de la masa(C1), poder de hinchamiento

del almidón(C2), gelatinización del almidón(C3), actividad amilásica(C4) y retrogradación (C5), utilizando el equipo Mixolab Chopin 2. Se aplicó el método estandarizado por la AACC 54-60.01

### 2.6. Elaboración de pan de almidón fermentado de maíz.

El proceso de elaboración de pan se realizó en el laboratorio experimental del INIAP. Se siguió el procedimiento tradicional de elaboración de un pan de trigo, disminuyendo el tiempo en el horno (Figura 2)



**Figura 2.** Diagrama de flujo para la elaboración de pan

## 2.7. Análisis de textura y propiedades panificables

La textura se determinó utilizando el texturometró TA.XT2i con una velocidad de pre-ensayo de 1,7 m/s, distancia de 4 mm, fuerza de 2 N utilizando una sonda de P 36/R.

El volumen del pan se midió mediante el método de desplazamiento de semillas establecido en la Norma INEC 530.

## 2.8. Análisis sensorial

Los parámetros estudiados fueron textura de miga, color de la corteza, apariencia, sabor, color de miga, y aceptabilidad. Se utilizó un diseño de bloques incompletos para 18 catadores semientrenados con 3 réplicas y 4 tratamientos para cada uno, según metodología de Cochran, (2008).

## 2.9. Análisis Estadístico

Mediante el análisis de varianza (Tukey) en excel se determinó una diferencia significativa en los atributos sensoriales del pan de almidón fermentado de maíz.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Análisis químicos del almidón fermentado de maíz.

El proceso de fermentación se caracterizó por la disminución del pH desde 6,14 hasta 3,13 y el incremento de la acidez desde 0,19% hasta 0,72% de ácido láctico en 6 días de fermentación. Las muestras fermentadas extraídas mediante licuado presentaron mayor rendimiento con valores de 71,1% a 78,7 % en comparación a las muestras fermentadas extraídas mediante molienda con valores entre 66% a 69,3%. (Tabla 2), lo cual permitió establecer el porcentaje de almidón fermentado aprovechable.



**Tabla 2.** Valores de pH, acidez, rendimiento y humedad del almidón fermentación de maíz

Muestras	pH		Acidez		Rendimiento (%)	Humedad (%)
	Inicial	Final	Inicial	Final		
MB50°C	6,09	3,42	0,19	0,59	66,6	13,5
MB65°C	6,2	3,48	0,17	0,55	67,2	14,3
MF50°C	6,05	3,4	0,2	0,58	67,2	13,9
MF65°C	6,14	3,43	0,2	0,59	66	13,6
LB50°C	6	3,13	0,24	0,72	78,8	14,2
LB65°C	6	3,28	0,2	0,68	71,1	12,7
LF50°C	6	3,31	0,2	0,65	78,3	13,1
LF65°C	6	3,4	0,2	0,64	78,7	13,9
Almidón sin fermentar	6,2	6,2	0,17	0,17	69,3	12

**Simbología.** método de extracción (L=licuado; M=molido); método de fermentación (B= biorreactor; F=funda); método de secado (50°C; 65°C).

### 3.2. Parámetros Farinográficos

Los parámetros farinográficos obtenidos en el simulador del Mixolab mostraron que las muestras de almidón fermentado absorben mayor cantidad de agua (61% y 66%) comparándola con el almidón sin fermentar (55%). La absorción de agua más alta fue de

66% en la muestra licuada, fermentada en un biorreactor y secada a 50°C (LB50°C) (Tabla 3), este valor puede estar influenciado por una mayor cantidad de almidones dañados, según Moiraghi, Ribotta y Aguirre, (2005) los almidones dañados absorben aproximadamente cuatro veces el peso del grano.

**Tabla 3.** Parámetros farinográficos de los almidones de maíz con y sin fermentación

Muestras	Absorción de agua (%)	Tiempo de desarrollo (min)	Estabilidad (min)	Debilitamiento (UF)
MB50°C	63,5 <sup>c</sup>	10,50 <sup>e</sup>	1,75 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
MB65°C	63 <sup>b,c</sup>	3,00 <sup>b</sup>	1,5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
MF50°C	61 <sup>a</sup>	5,50 <sup>c</sup>	1,5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
MF65°C	61 <sup>a,b</sup>	10,0 <sup>de</sup>	1,5 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>
LB50°C	66 <sup>d</sup>	1,50 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	140 <sup>c</sup>
LB65°C	63 <sup>a,b,c</sup>	1,50 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	138 <sup>c</sup>
LF50°C	63 <sup>a,b,c</sup>	10,25 <sup>e</sup>	1,5 <sup>a</sup>	98 <sup>b</sup>
LF65°C	64 <sup>c</sup>	6,00 <sup>c,d</sup>	1,5 <sup>a</sup>	93 <sup>b</sup>
Sin fermentar	55 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a,b</sup>	1,5 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>

Los promedios con letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Modificación de las propiedades reológicas y panificables mediante fermentación del almidón de maíz variedad INIAP 122**

Modification of rheological properties and breadmaking by fermentation of corn starch variety INIAP 122

Respecto al tiempo de desarrollo se obtuvo que la mayoría de las muestras de almidón fermentado necesitan tiempos mayores a 5,5 min para la formación de la masa lo cual puede estar asociado con la velocidad de absorción de agua y la dificultad de los almidones para formar una masa viscoelástica lo que produjo la fatiga de la masa y pérdida de cohesión. Este resultado concuerda con lo ya mencionado por Matos y Rosell, (2008) al evaluar el desarrollo de la masa de almidones naturales.

La estabilidad de la masa de las muestras estudiadas no presentaron diferencias estadísticamente ( $p > 0,05$ ), con valores entre 1,5 a 1,75 min. No así el valor del debilitamiento de 0 a 140 Unidades Farinograficas (UF) en las masas de almidón fermentado de maíz y almidón sin fermentar, mientras que las muestras licuadas y fermentadas presentaron valores mayores a 93 UF,

es decir tienen menor tolerancia al amasado.

### 3.3. Análisis Reológico

El análisis de las propiedades reológicas

mostraron que el desarrollo de la masa (C1) de las muestras de almidón fermentado y sin fermentar fluctúa de 1,08 a 1,15 Nm (Tabla 4), encontrándose dentro del rango establecido por el Mixolab para tener datos confiables sobre reología.

El poder de hinchamiento (C2), de las muestras de almidón fermentado y sin fermentar varían entre 0 a 0,48 Nm, donde las muestras MB65°C, LB50°C, LF50°C, LF65°C presentaron una fuerza igual a 0 Nm, es decir estas muestras absorben mayor cantidad de agua provocando un incremento en el volumen de los gránulos de almidón.

**Tabla 4.** Reología de la masa de los almidones fermentados de maíz y almidón sin fermentar

Muestras	C1 (Nm)	C2 (Nm)	C3 (Nm)	C4 (Nm)	C5 (Nm)
MB50°C	1,08	0,43c	2,61b,c	2,27a,b	2,48a
MB65°C	1,07	0,00a	2,88c,d	2,40a,b	2,88b
MF50°C	1,08	0,44c	2,63b,c	2,26a,b	2,67a
MF65°C	1,08	0,29b	2,39b	2,22b	2,99b
LB50°C	1,15	0,00a	2,10a	2,12a	2,53a
LB65°C	1,10	0,26b	2,99d	2,18a,b	2,80b
LF50°C	1,08	0,00a	2,41b	2,14a	2,56a
LF65°C	1,10	0,00a	2,96d	2,11a	2,59b
Almidón sin fermentar	1,15	0,28b	3,03e	2,40a,b	2,88b

*Desarrollo de la masa (C1), poder de hinchamiento del almidón (C2), gelatinización del almidón (C3), actividad amilásica (C4) y retrogradación (C5). Los promedios con letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )*

La fuerza registrada para la gelatinización (C3) del almidón fermentado y sin fermentar varía desde 2,10 hasta 3,03 Nm. La fuerza más alta producida fue de 3,03 Nm en el almidón sin fermentar, lo que indica que esta muestra tendrá una masa más viscosa llegando a afectar la apariencia y textura del pan.

La fuerza registrada para actividad amilásica (C4), de las muestras de almidón fermentado y sin fermentar fluctúan entre 2,11 hasta 2,40 Nm, lo que evidencia que las muestras tienen una actividad amilásica baja provocando masas blandas (Dubat, Rosell y Gallarher, 2014).

La fuerza registrada para la retrogradación (C5), del almidón fermentado y sin fermentar está en el intervalo de 2,48 hasta 2,99 Nm. La fuerza más alta fue 2,99 Nm en la muestra molida, fermentada en

una funda plástica y secada a 65°C (MF65°C) siendo este valor similar al del almidón sin fermentar 2,99 Nm, es decir en estas muestras la retrogradación es más rápida.

### 3.4. Propiedades panificables

Las muestras de pan de almidón fermentado y almidón sin fermentar presentaron propiedades panificables estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (Tabla 5). El volumen específico más alto fue 2,66 cm<sup>3</sup>/g en la muestra molida, fermentada en biorreactor y secada a 50°C (MB50°C). Este parámetro está relacionado con la distribución y cantidad de alveolos en el pan formado en la fermentación lo que implica producción de gas, incremento del volumen y disminución del peso del pan en el proceso de horneado (Pineda, 2013).

**Tabla 5.** Propiedades panificables de las muestras de pan de almidones fermentados de maíz y almidón sin fermentar.

Muestras	Volumen (cm <sup>3</sup> )	Volumen específico (cm <sup>3</sup> /g)	Textura (N)
MB50°C	61,2 <sup>e</sup>	2,66 <sup>e</sup>	18,3 <sup>a</sup>
MB65°C	48,2 <sup>a</sup>	2,09 <sup>a</sup>	39,3 <sup>e</sup>
MF50°C	59,2 <sup>d</sup>	2,57 <sup>d</sup>	27,3 <sup>c</sup>
MF65°C	51,4 <sup>b</sup>	2,24 <sup>b</sup>	40,3 <sup>f</sup>
LB50°C	55,0 <sup>c</sup>	2,39 <sup>c</sup>	18,3 <sup>a</sup>
LB65°C	53,8 <sup>c</sup>	2,34 <sup>c</sup>	30,2 <sup>d</sup>
LF50°C	54,0 <sup>a</sup>	2,33 <sup>c</sup>	23,7 <sup>b</sup>
LF65°C	48,8 <sup>c</sup>	2,12 <sup>b</sup>	30,5 <sup>d</sup>
Sin fermentar	50,8 <sup>b</sup>	2,19 <sup>b</sup>	41,6 <sup>f</sup>

Los promedios con letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

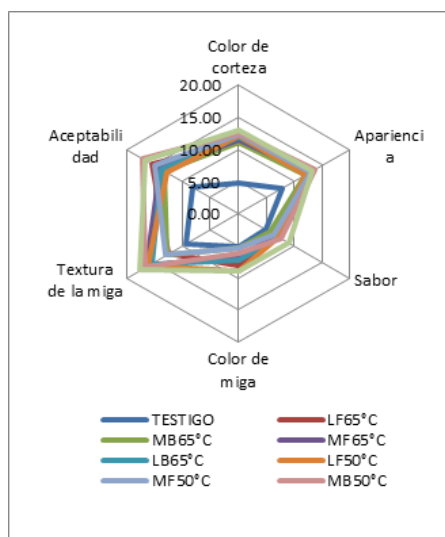
**Modificación de las propiedades reológicas y panificables mediante fermentación del almidón de maíz variedad INIAP 122**

Modification of rheological properties and breadmaking by fermentation of corn starch variety INIAP 122

En consecuencia, la dureza de las muestras de pan de almidón fermentado y sin fermentar está en el intervalo de 18,2 hasta 41,6 N. La textura más baja fue 18,3 N en las muestras (MB50°C) y (LB50°C), la misma que es mayor al comparar con la textura del pan de trigo 9,88 N, esta diferencia se puede atribuir a la ausencia de aditivos como enzimas o gomas que mejoren la textura del pan de almidón fermentado de maíz.

### 3.5. Evaluación sensorial

De acuerdo con los datos de evaluación sensorial se observa que la muestra licuada fermentada en un biorreactor y secada a 50°C (LB50°C) y la muestra molida, fermentada en un biorreactor y secada a 50°C (MB50°C) tienen las mejores puntuaciones en color de la corteza, apariencia o simetría, sabor, color de miga, textura de miga y aceptabilidad (Figura 3).



**Figura 3.** Promedio de los atributos sensoriales del pan de almidón fermentado de maíz.

## 4. CONCLUSIONES

El análisis de las propiedades reológicas determina que las muestras de almidón fermentado absorben mayor cantidad de agua en un rango de 61 a 66 %, con una fuerza de desarrollo de la masa entre 1,08 a 1,15 Nm. La muestra de almidón sin fermentar presentó los valores más altos de la fuerza registrada en el Mixolab para la gelatinización (3,03 Nm) y actividad

amilasica (2,40 Nm), lo que indica que tiene mayor viscosidad y baja actividad amilasica. En cuanto al contenido de retrogradación la muestra (MB50°C), presentó una menor fuerza de 2,48 Nm, es decir la retrogradación fue más lenta. Como resultado de la evaluación sensorial y propiedades panificables el mejor tratamiento fue la muestra molida, fermentada en un biorreactor y secada a 50°C (MB50°C), estas condiciones de fermentación

del almidón permitieron obtener un volumen de pan de 61,2 cm<sup>3</sup>, dureza de 18,30 N y atributos sensoriales agradables

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis. USA: Chemistry.
- Betancourt Botero, S. P., Bolívar Escobar, G. A., & Ramírez Toro, C. (2013). Fermentación de maíz de alta calidad proteica con *Lactobacillus plantarum* (CPQBA 087-11 DRM) aislado en Colombia de masas tradicionales fermentadas. *Revista argentina de microbiología*, 45(4), 282-283.
- Dubat, A. (2016). *Mixolab: A New Approach to Rheology*. Academic Press
- Gómez, A. (2012). Ecuador busca retornar a la sustentabilidad en trigo. *El Universo*.
- Líderes R. (2018). El cultivo de maíz ha sido constante los últimos años. *Revista Líderes*.
- Lugo, B. (2010). Análisis que Define la Calidad del Pan. *Magazine del Pan*.
- Manual del Mixolab, C. (2009). *Aplicaciones Mixolab manual, reológicas y análisis enzimático*.
- Matos, M. E., & Rosell, C. M. (2013). Quality indicators of rice-based gluten-free bread-like products: relationships between dough rheology and quality characteristics. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2331-2341.
- Moiraghi, M., Ribotta, P. D., Aguirre, A., Pérez, G. T., & León, A. E. (2005). Análisis de la aptitud de trigos pan para la elaboración de galletitas y bizcochuelos. *Agriscientia*, 22(2), 47-54.
- Norma INEC 530. (1981). Harina de trigo. Ensayo de panificación.
- Pineda, P., & Coral, D. (2013). Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido. Recuperado el 2015 de Febrero de 20, de Ingeniería y Ciencia: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-91652010000100008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-91652010000100008&script=sci_arttext)
- Vargas, P. (2010). Obtención de almidón fermentado a partir de yuca (*Manihot esculenta crantz*) variedad valencia, factibilidad de uso en productos de panadería. *Revista Tecnología en Marcha*, 23(3), pág-15.
- Zeng, J., Gao, H., & Guanglei, L. (2011). Características de la Harina de Maíz Fermentado por algunas especies de *Lactobacillus*. *School of Food Science*, 1

## PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE MICROALGAS PSICROFÍLICAS, PRESENTES EN LOS GLACIARES ANTÁRTICOS PARA LA SÍNTESIS DE BIODIESEL

### PRODUCTION OF LIPIDS FROM PSYCHROPHILIC MICROALGAE PRESENT IN ANTARCTIC GLACIERS FOR THE SYNTHESIS OF BIOFUEL

G. Huilca<sup>1</sup>, L. Licto<sup>2</sup>, R. Flores<sup>3</sup>, F. Proaño<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Life Sciences, Faculty of Biotechnology, ESPE University

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, UDLA University

<sup>3</sup> Sustainable Chemistry Laboratory, Faculty of Chemical Sciences, UCE University

*Artículo recibido: 28/11/2018*

*Artículo aceptado: 28/02/2019*

#### RESUMEN

Las microalgas han tenido un impacto negativo en la calidad sensorial en general. Las microalgas psicrófilas viven en ambientes de frío extremo. Además, su crecimiento aumenta porque tienen en su estructura enzimas que solo se adaptan a temperaturas por debajo de 0 °C. Por este motivo, el Laboratorio de Química Sostenible de la Universidad Central del Ecuador, junto con el Instituto Antártico del Ecuador (INAE), realizó una expedición en Greenwich, Roberts, Dee, Barrientos y Antarctic Towers donde se recolectaron varias colecciones de microalgas, donde se analizaron 15 muestras de Greenwich Island y Roberts durante 21 días en diferentes niveles de temperatura, de los géneros *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp y *Stichococcus* sp. Posteriormente, se realizó el aislamiento en placas Petri para obtener cultivos de monoalgal. Cada uno de los géneros aislados se masificó en un volumen de 5 ml hasta alcanzar un volumen de 250 ml en medio M1 modificado a una temperatura de 4 °C y 24 °C, 5000 lux y un fotoperíodo de 12:12 horas. El método de Bligh & Dyer se utilizó para la extracción de lípidos. Los valores de la concentración de lípidos mostraron que el género *Chlorella* sp tiene la concentración más alta con un valor de 0,2802 mg/ml a 4 °C y un valor de 2.6704 mg/ml a 24 °C, el día 22 de su fase exponencial en comparación con los géneros *Chlorococcum* y *Stichococcus* sp.

**Palabras claves:** *Chlorella* sp, *Chlorococcum*, *Stichococcus* sp., Antártica, Lípidos, método Bligh & Dyer.

#### ABSTRACT

Microalgae had a negative impact on the overall sensory quality. Psychrophilic microalgae live in extremely cold environments, their growth increases because they have enzymes in their structure that only adapt to temperatures below 0 °C. For this reason, the Sustainable Chemistry Laboratory of the Central University of Ecuador, together with the Ecuadorian Antarctic Institute (INAE), made an expedition in the Greenwich, Roberts, Dee, Barrientos and Antarctic Towers where several microalgae consortia were collected, where 15 samples from Greenwich Island and Roberts were analyzed at 21 days at different temperatures, from which the genera *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp. Subsequently, isolation was made in Petri dishes to obtain monoalgal cultures. Each of the isolated genera was massified in a volume of 5 mL until reaching a volume of 250 mL in modified M1 medium at a temperature of 4 °C and 24 °C, 5000 lux and a photoperiod of 12:12 hours. The Bligh & Dyer method was used for the extraction of lipids. The values of the lipid concentration showed that the genus *Chlorella* sp is the highest concentration with a value of 0.2802 mg / mL at 4 °C and a value of 2.6704 mg / mL at 24 °C on the 22nd day of its exponential phase in comparison with the genera *Chlorococcum* and *Stichococcus* sp.

**Keywords:** *Chlorella* sp, *Chlorococcum*, *Stichococcus* sp., Antarctica, Lipids, Bligh & Dyer method

## 1. INTRODUCTION

Psychrophilic microalgae are photosynthetic organisms that belong to the plant kingdom and adapt to temperatures of  $-5^{\circ}\text{C}$  (Martínez, 2010). In Ecuador, studies of psychrophilic microorganisms have been conducted in the Chimborazo Glaciers (Correa, 2013). The psychrophilic microalgae collected in the Greenwich, Roberts, Dee, Barrientos and Torre islands of the Antarctic Archipelago have survived to the present, according to data from the Pedro Vicente Maldonado Antarctic Station, the type of genera identified in the microalgae consortium has increased by 2. in 2013 to 6 in 2014. There are 35 samples collected in total, of which 11 belong to Greenwich Island and correspond to the largest number of samples collected containing psychrophilic algae so far. The collections that also have a high abundance belong to the Greenwich Island with 5 genera. The psychrophilic microalgae that have less survival belong to Dee Island (Ecuador Antarctic, 2014). The Sustainable Chemistry Laboratory of the Central University of Ecuador is a government entity that aims to obtain different genera of microalgae from the samples collected, as well as the isolation of the genera: *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp, to carry out processes at a pilot scale to subsequently extract lipids and synthesize biodiesel. The research focuses on the field and laboratory area to study the essential oil extracted from psychrophilic microalgae to make way for the synthesis of biofuel as an alternative source of diesel, as well

as the isolation and massification of surviving microalgae (Flores, 2013). The obtaining of biofuel is extracted from lipids of microalgae collected at low temperatures belonging to the Chlorophyta, Bacillariophyta and Euglenophyta division (Amaro, Guedes, & Malcata, 2011). The most prevalent genera are *Haematococcus* sp., *Chlorella* sp., *Stichococcus* sp., *Diatoma* sp., *Navicula* sp. and *Filamentosa* sp, are characterized by being present in the three years of sampling (Molina, 2015). The marine and freshwater species that contain the highest amount of lipids for the production of biodiesel are *Dunaliella* with 116 mg / L / day and *Nannochloris* with 76.5 mg / L / day, as well as the genus *Chlorella* sp with 50 mg / L / day (MALGAS, 2013). In our country, no psychrophilic microalgae genera have been reported for the synthesis of biodiesel (Flores, 2013). The open systems for obtaining microalgae were developed between 1935 and 1940 due to the scarcity of food. The application was made on an industrial scale with the purpose of obtaining an alternative source of proteins of vegetable and animal origin to replace food for human consumption (Colorado, Moreno, & Pérez, 2013). The first microalgae were massified to obtain lipids during the Second World War in Germany, the studies were carried out by German scientists with the purpose of purifying contaminated waters (MALGAS, 2013). In 1953, microalgae cultures are studied for the use of photosynthetic gas exchangers used in space travel and as sources of microbial proteins (BEAM, 2013). In 1980 the cultivation of microalgae

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilicas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

is produced for the improvement of the environment, transforming the organic samples and sediments from the wastewater into biomass and renewed waters for later use in biofertilizers and water for irrigation. In 1982 at world level, oil increased value, giving alternative ideas such as the use of microalgae as a source of solar energy (Colorado, Moreno, & Pérez, 2013). From 2013 to 2015, samples of microalgae were collected in the islands near the Pedro Vicente Maldonado Scientific Station, climate diversity is an important factor in the synthesis of fatty acids to use them as an alternative source of energy. The sample collected at Punta Figueroa on Greenwich Island in Antarctica has guaranteed the best consortium of microalgae in the production of effective oils such as behemoth, myristic, stearic, palmitic, linoleidic, oleic, palmitoleic, arachidic and linoleaidal. The genus of microalgae and the temperature from which the sample was obtained is important for obtaining lipids in dry weight, as well as the extraction methods used (Flores, 2013).

Currently, the European Union has implemented ideas to develop energy as biodiesel from microalgae consortia with the purpose of reducing derivatives from oil sources and the emissions produced by gases during the greenhouse effect (Wackett, 2008). Among the genera of microalgae identified with higher lipid productivity are *Chlorella* sp and *Chlorococcum* sp (Flores, 2013). But there are major drawbacks that researchers face with the use of microalgae: the presence of high concentrations of

biomass means that more energy is required, and the moderate amount of biofuel produced by microalgae on a pilot scale (AINEnergía, 2015). The cryophyllous microorganisms commonly known as psychrophilic inhabit extremely cold environments, their growth increases because they have enzymes in their structure that only adapt to temperatures below 0 ° C. The cell membrane is made up of fats that flow to the point of freezing (Barreiro & Sandoval, 2006). Among the psychrophilic Antarctic microalgae is *Chlorella* sp, which shows rapid growth in cell cultures (Chinnasamy & Bhatnagar, 2010). Its shape is spherical, green because it contains high levels of chlorophyll (Kanno & Kazie, 2005). Therefore, researchers have opted for studies with psychrophilic microalgae, which could represent a safe alternative for the production of lipids. Among the psychrophilic Antarctic microalgae investigated are mainly: *Pandorina* sp, *Chlorella* sp, *Stichococcus* sp, *Chlamydomona* sp and *Chlorococcum* sp (Molina, 2015). Other results obtained in microalgae such as *Scenedesmus ovalternus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp and *Isochysis* sp, have determined the production of lipids with a growth of 32.7 mg / L / day, obtaining a large amount of biodiesel. These results allow us to conclude that some genera of microalgae could be useful for the production of lipids (Bérmudez, 2012).

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilicas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Collection of samples.

The samples were awarded by the Sustainable Chemistry Laboratory of the Central University of Ecuador as part of the project of the Ecuadorian Antarctic Institute (INAE). These were taken from Greenwich Island and Roberts Island located in Antarctica, later moved to Ecuador in different test tubes with their respective covers.

### 2.2. Adaptation process

Several samples of biomass were taken from the original tubes, where consortiums 15IGa2 with coordinates 35 ° 59 '36' 'S and 48 ° 27' 27 ' ' O, consortium 15IGc1 with coordinates 35 ° 53 '30' 'S and 76 ° 43 '17' 'O and the 15IRe1 consortium with coordinates 35 ° 43' 40 ' ' and 72 ° 13 '27' 'O were adapted to different temperatures in the laboratory after going through a 21-day adaptation process in function of the modified culture medium M1 as shown in Table 1.

**Table 1.** Adaptation of the genres of consortium 15IGa2, 15IGc1 and 15IRe1 at 21 days.

Consortium	Original Sample	Adaptation 4 ° C	Adaptation 24 ° C
15IGa2	<i>Haematococcus sp.</i>	<i>Chlorella sp.</i> <i>Chlorococcum sp</i>	They did not survive
	<i>Chlorococcum sp.</i>		
	<i>Chlorella sp.</i>		
	<i>Stichococcus sp.</i>		
	<i>Diatoma sp.</i>		
15IGc1	<i>Chlorella sp.</i>	<i>Chlorella sp.</i> <i>Stichococcus sp.</i> <i>Chlorococcum sp</i>	They did not survive
	<i>Stichococcus sp.</i>		
	<i>Chlorococcum sp.</i>		
	<i>Chlorella sp.</i>		
15IRe1	<i>Haematococcus sp.</i>	<i>Chlorococcum sp.</i> <i>Chlorella sp.</i>	<i>Chlorococcum sp.</i> <i>Chlorella sp.</i> <i>Stichococcus sp.</i>
	<i>Chlorococcum sp.</i>		
	<i>Chlorella sp.</i>		
	<i>Stichococcus sp.</i>		

### 2.3. Isolation in solid culture medium.

This technique was used to separate the three selected microalgae genera

after the adaptation process in this case were *Chlorella sp* belonging to consortium 15IGa2, *Chlorococcum sp* belonging to consortium 15IGc1 and *Stichococcus sp* belonging to

consortium 15IRe1. Agar was added to the modified M1 medium and 40 mL were distributed in three Petri dishes, then two drops of each consortium were inoculated in each of the boxes and spread with a sterile bacteriological loop. The respective lid was placed and the box was covered with parafilm paper, the Petri boxes were inverted and placed at 24 ° C with a 24 hour photoperiod, illumination of 4500 lux for two weeks. The microalgae were observed in the inverted microscope.

#### 2.4. Preparation of culture medium

Three test tubes were used with 5 mL of modified M1 medium and a small amount of each microalga isolated from its respective Petri box was

placed with a 24 hour photoperiod at 24 ° C with 4500 lux illumination, placing a stopper on the part top of the tube so that it has aeration for two weeks. The culture medium used for the microalgal growth was the modified M1 medium.

#### 2.5. Modified culture medium M1

The medium was prepared in three different bottles according to the amount of volume required, the volume of distilled water was measured with a 1000 mL pipette, then the three bottles were autoclaved for 90 minutes at a pressure of 15 PSI and a temperature of 121 ° C. The composition of the modified M1 medium is shown in Table 2 (Salas, 2015).

**Table 2.** Composition of modified culture medium M1 for 1000 mL (Salas, 2015)

STOCK	CONCENTRATION
<b>Stock I</b>	<b>(g / L)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.18
<b>Stock II</b>	<b>(g / L)</b>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.002
<b>Stock III</b>	<b>(g / L)</b>
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.02
MgSO <sub>4</sub>	2.65
FeSO <sub>4</sub>	0.002
KNO <sub>3</sub>	0.7025
KCl	0.30
ZnSO <sub>4</sub>	0.0007
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.034
EDTA	0.03
MnSO <sub>4</sub>	0.003
CoCl <sub>2</sub>	0.02 mg
CuSO <sub>4</sub>	0.3
Na <sub>2</sub> Mo	0.04 mg

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

## **2.6. Conditions culture microalgae psychrophilic Antarctic**

Once growth was obtained in each test tube, it was massed in 18 bottles of 250 mL. The genera *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp were inoculated into the modified M1 medium in three bottles of 250 mL per each gender at temperatures of 4 ° C and 24 ° C. A system was added to each of the bottles. Aeration of 0.5 L / min, a fuse glass with a diameter of 0.6 mm was attached to a hose, this system was connected to a 5000 Power Pump of 60 Hz, 5 W and 110 V with 2 outputs. Lighting was installed using lamps at 5000 lux with a photoperiod of 12:12 hours. The jars are monitored every day. A cell count was performed using the Neubauer chamber every 3 days. A data record was kept for 28 days to obtain values in the graph of absorbance vs lipid concentration, using the Excel 2008 program.

## **2.7. Bligh & Dyer extraction method**

Five mL of each vial with its respective microalga at different temperatures in 18 test tubes was placed, placing aluminum foil on top to avoid contamination, placed in the oven at 80 ° C in a period of 48 hours. After this time elapsed, 3 mL of a mixture of chloroform-methanol solvents (1: 2) was added. The test tubes (Tube 1) were sonicated in 3 cycles of 15 minutes by adding distilled water and ice. The tubes were incubated at 4 ° C for 24 hours protecting them from the light with aluminum foil. The next day

the tubes were sonicated in 3 cycles of 15 minutes adding distilled water and ice. They were centrifuged at 4700 rpm for 20 minutes at 24 ° C, then the extracts were recovered with a Pasteur pipette, to transfer the supernatant to new 15 mL tubes (Tube 2). 1.5 mL of a chloroform methanol (1: 2) solvent mixture was added to the residual biomass of (Tube 1), this step is done to extract more dry biomass lipids from the microalgae. It was again centrifuged at 4700 rpm for 20 minutes at 24 ° C recovering more extract from (Tube 1) to place it in (Tube 2).

2 mL of distilled water from (Tube 2) containing the extract was added and vortexed. The excess water was removed with a Pasteur pipette, and the last centrifugation was performed at 4700 rpm for 10 minutes at 24 ° C to separate the lower phase formed by chloroform and lipids. Then 1 mL of chloroform was added to further separate the lower phase, a Pasteur pipette was introduced with great care, air was bubbled to the bottom of the tube. The phase of chloroform and lipids was passed from (Tube 2) to (Tube 3), and how much volume was taken was measured. The aqueous phase was washed with 1 mL of chloroform, mixed in the vortex and centrifuged at 4700 rpm for 10 minutes at 24 ° C, the lower phase was recovered and placed in (Tube 3). It was left in a water bath overnight with shaking at 37 ° C without a lid. The next day, after the chloroform was evaporated, 2 mL of concentrated sulfuric acid were added. The tubes were sealed with aluminum foil in order to avoid contamination, a blank was prepared (Tube with sulfuric acid). The tubes

were heated in an oven at 200 ° C for 15 minutes without lids. The tubes were placed in the refrigerator at 4 ° C to cool, 3 mL of distilled water was added. The tubes were sonicated for 15 minutes and mixed with vortex until the sample was homogeneous

and without residues of organic matter. The samples were transferred to the cells and the absorbance was read at 375 nm in the spectrophotometer. The materials used are shown in Table 3.

**Table 3.** Materials used in the Bligh & Dyer Method

Equipment	Reagents	Materials
	Test tubes	
Refrigerator	Aluminum foil	Distilled water
Sonicador	Glass bottles	Ice
Centrifuge	100 mL test tube	Chloroform
Vortex	Pipettes	Methanol
Digital balance	Petri boxes	Sulfuric acid
	Stove	

### 2.8. Quantification of lipids extracted by spectrophotometry

The amount of lipids extracted from the genera *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp was obtained in the spectrophotometer. To perform the quantification, all the steps mentioned above were developed in the Bligh & Dyer extraction method to measure the absorbance at 375 nm. The concentration of lipids obtained from each gender at different temperature was calculated by the following equation:

$$[Lipids] = \left( \frac{Ab - 0.0126}{2.8311} \right) \times \frac{3.5}{V_{ext}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where: Ab (Absorbance), Vext (Volume extracted from the sample).

The concentration of lipids indicated the lipid production in time. These data were calculated through the SPSS 15.0 program The equation of the line was obtained with experiments previously carried out at the Central University of Ecuador.

$$y = 2.831 + 0.0126 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$R^2 = 0.999$$

### 2.9. Determination of the growth curve of *Stichococcus* sp.

To obtain the dry weight of the genus *Stichococcus* sp. in the stationary phase to determine the growth curve, first the test tubes were weighed on the analytical balance before placing the volume of each bottle, then 5 mL of each bottle was placed at a

temperature of 4 °C and 24 °C In the 6 test tubes measured above, aluminum foil was used in the upper part to avoid contamination in the sample, then the tubes were placed in the oven at 80 °C in a period of 48 hours. Once the dry biomass was obtained inside each tube, it was reweighed in the analytical balance, the results were taken in a register and analyzed using the Excel 2008 program. Through the analysis of ANOVA and Duncan's Test, the factor temperature and gender in the production of lipids for the synthesis of biofuel was determined through the SPSS 15.0 program.

### 3. RESULTS AND DISCUSSIONS

#### 3.1. *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp.

##### Massification

Microalgae samples obtained from the 15IGa2, 15IGc1 and 15IRe1 consortiums of Greenwich Island and Roberts Island of the Antarctic Islands

were conserved in 3 test tubes, with modified M1 medium, in a 24 hour photoperiod at a temperature of 24 °C with aeration and illuminance of 4500 lux. After two weeks of isolation, the microalgae isolated in their respective Petri box were observed, and the genera *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp. in the modified M1 medium with three repetitions of each in bottles of 250 mL at 4 °C and 24 °C in a photoperiod of 12:12 hours, with moderate aeration and with illuminance of 5000 lux.

##### Analysis of cell growth at different temperatures

The values indicated in Table 4 and Table 5 in relation to cell growth at the temperature of 4 °C, indicated that in three replications (A, B and C), the average number of *Chlorella* sp cells per mL in the exponential phase on day 22 was 285'000 000 cel / mL, compared to the genus *Chlorococcum* sp which was 95'100 000 cel / mL, both microalgae were at the same temperature, phase, illumination, photoperiod and aeration.

**Table 4.** Average cell growth of the genus *Chlorella* sp at 4 °C

<i>Chlorella</i> / M1				
DAYS	A	B	C	AVERAGE
0	0	0	0	0
4	1,40E + 06	1.38E + 06	1.39E + 06	1.39E + 06
11	3,10E + 06	3.09E + 06	3,11E + 06	3,10E + 06
15	2,80E + 07	2,90E + 07	2,84E + 07	2,85E + 07
18	1,00E + 08	1.04E + 08	1.08E + 08	1.04E + 08
22	2,90E + 08	2.81E + 08	2,85E + 08	2,85E + 08
25	2,60E + 08	2,55E + 08	2.67E + 08	2.61E + 08

Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilicas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

**Table 5.** Average cell growth of the genus *Chlorococcum* sp at 4 °C

<i>Chlorococcum</i> / mL				
DAYS	A	B	C	AVERAGE
0	0	0	0	0
4	4.67E + 05	4.60E + 05	4.63E + 05	4.63E + 05
11	1.03E + 06	1.03E + 06	1.04E + 06	1.03E + 06
15	9.33E + 06	9,67E + 06	9,47E + 06	9,49E + 06
18	3,33E + 07	3,47E + 07	3,60E + 07	3,47E + 07
22	9,67E + 07	9,37E + 07	9,50E + 07	9.51E + 07
25	8.67E + 07	8,50E + 07	8.90E + 07	8.69E + 07

The three repeats (A, B and C) of the genus *Stichococcus* sp at a temperature of 4 °C indicated an average value of cells per gram on day 22 of its exponential phase of 0.88 cel / g, in

this case performed the dry weight count, due to the fact that a cell count cannot be executed in the Neubauer Chamber due to its morphology. The values are shown in Table 6.

**Table 6.** Average cell growth of the genus *Stichococcus* sp at 4 °C

<i>Stichococcus</i> / g				
DAYS	A	B	C	AVERAGE
0	0	0	0	0
4	0.02	0.02	0.02	0.02
11	0.16	0.17	0.16	0.16
15	0.38	0.36	0.36	0.37
18	0.65	0.68	0.68	0.67
22	0.88	0.90	0.88	0.88
25	0.74	0.78	0.78	0.76

The data indicated in Table 7 and Table 8 in relation to cell growth at 24 °C, showed that in three replications (D, E and F) the average cell number of *Chlorella* sp per mL in the

exponential phase in the day 22 was 604,000,000 cel / mL compared to the genus *Chlorococcum* sp which was 201,000,000 cel / mL, both genera were in equal conditions.

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

**Table 7.** Average cell growth of the genus *Chlorella* sp at 24 °C

<i>Chlorella</i> / mL				
DAYS	D	E	F	AVERAGE
0	0	0	0	0
4	1,35E + 06	1.36E + 06	1.34E + 06	1,35E + 06
11	1.38E + 08	1,48E + 08	1,52E + 08	1,46E + 08
15	3.53E + 08	3.05E + 08	3,11E + 08	3,23E + 08
18	4.70E + 08	4,75E + 08	4,80E + 08	4,75E + 08
22	6,00E + 08	6.02E + 08	6,10E + 08	6.04E + 08
25	5,26E + 08	4.78E + 08	5,18E + 08	5.07E + 08

**Table 8.** Average cell growth of the genus *Chlorococcum* sp at 24 °C

<i>Chlorococcum</i> / mL				
DAYS	D	E	F	AVERAGE
0	0	0	0	0
4	4.50E + 05	4.53E + 05	4,47E + 05	4.50E + 05
11	4,60E + 07	4.94E + 07	5.05E + 07	4,86E + 07
15	1,18E + 08	1.02E + 08	1.04E + 08	1.08E + 08
18	1,57E + 08	1.58E + 08	1,60E + 08	1.58E + 08
22	2,00E + 08	2.01E + 08	2.03E + 08	2.01E + 08
25	1,75E + 08	1,59E + 08	1.73E + 08	1,69E + 08

The three repetitions (D, E and F) of the genus *Stichococcus* sp at 4 °C presented an average value of cells for each gram on day 22 of its exponential

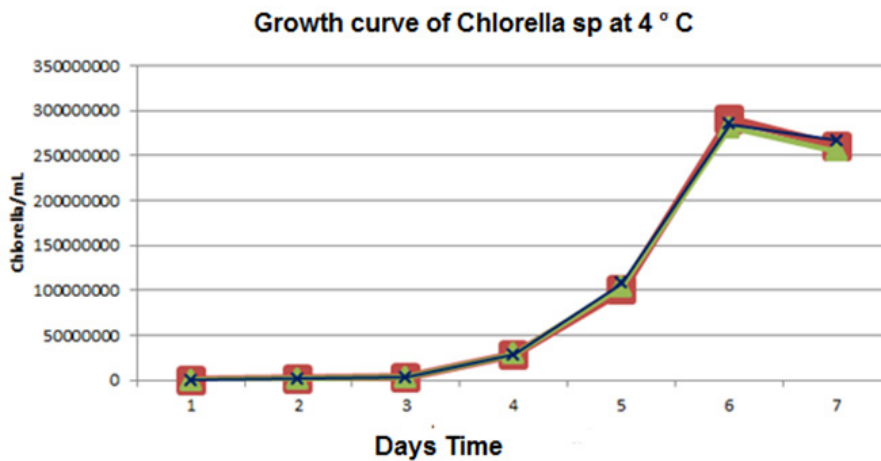
phase of 1.18 cel/g, the cell count was performed by dry weight. The values are indicated in Table 9.

**Table 9.** Average cell growth of the genus *Stichococcus* sp at 4 °C

<i>Stichococcus</i> / g				
DAYS	D	E	F	AVERAGE
0	0	0	0	0
4	0.13	0.15	0.15	0.14
eleven	0.30	0.30	0.29	0.30
fifteen	0.60	0.63	0.63	0.62
18	0.80	0.83	0.80	0.81
22	1,15	1,18	1.20	1,18
25	0.85	0.78	0.78	0.80

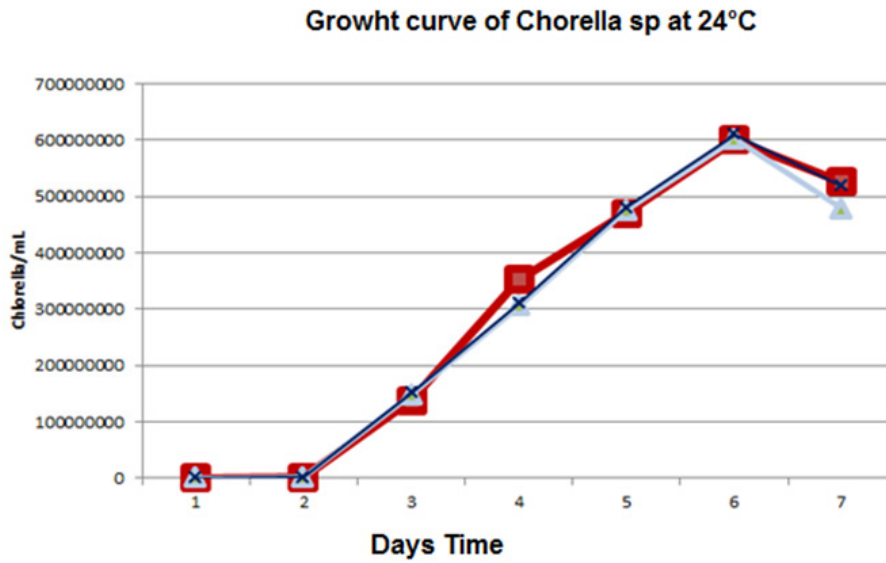
The genera *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp grew in the modified M1 medium that contained several macroelements and microelements to contribute to microalgal growth (Salas, 2015).

Figure 1 and Figure 2 show that *Chlorella* sp microalgae had greater cell growth at 28 days in its three repetitions at 4 °C and 24 °C in relation to the genus *Chlorococcum* sp indicated in Figure 3 and Figure 4.

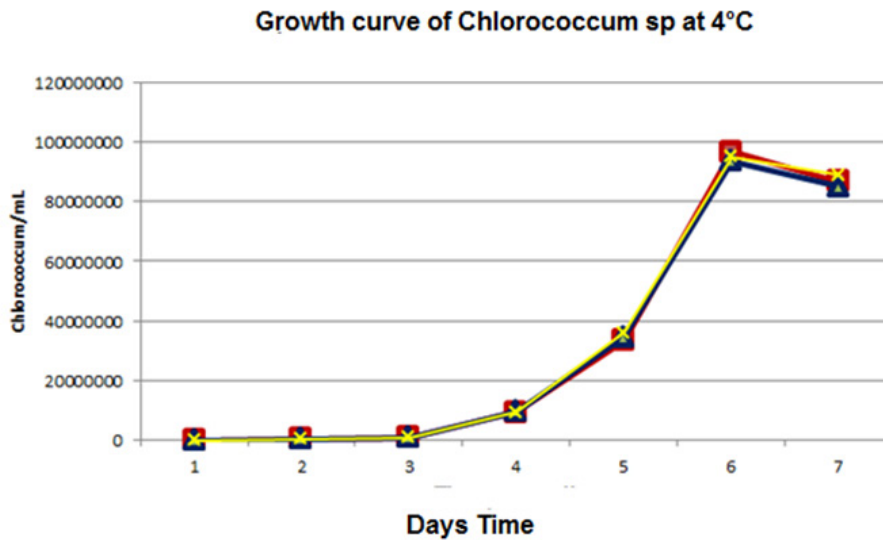


**Figure 1.-** Growth curve of *Chlorella* sp cultivated in M1 modified in 3 repetitions at 4 °C.





**Figure 2.-** Growth of curve *Chorella* sp cultivated in M1 modified in 3 repetitions at 4 °C.



**Figure 3.-** Growth curve of *Chlorococcum* sp cultivated in M1 modified in 3 repetitions at 4 °C.

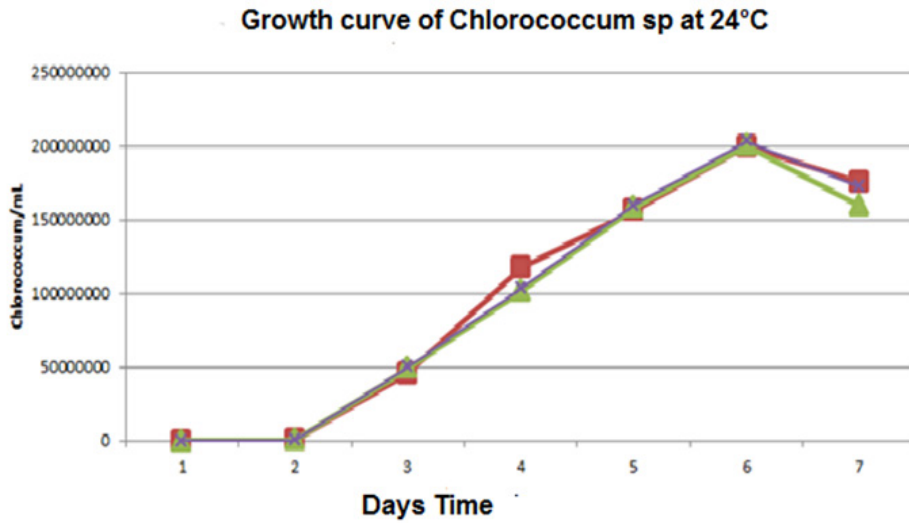


Figure 4.- Growth curve of Chlorococcum sp cultivated in M1 modified in 3 repetitions at 24 °C.

Figure 5 and Figure 6 show the cell growth of Stichococcus sp at 28 days, with three repetitions at different

temperatures. This microalga was under the same conditions as Chlorella sp and Chlorococcum sp.

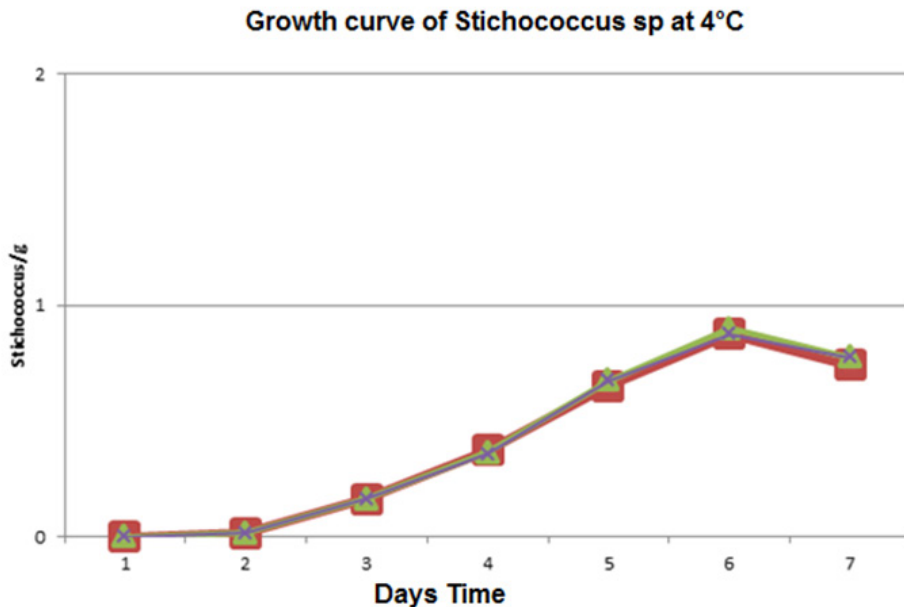
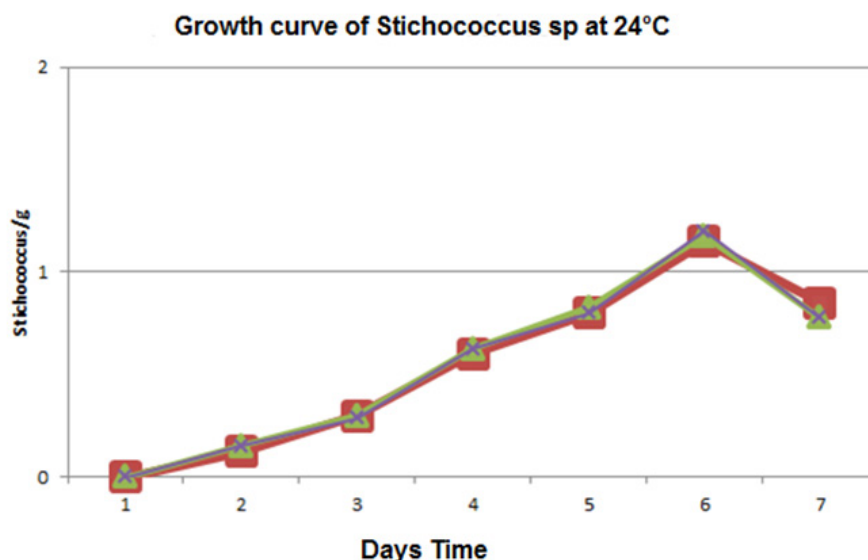


Figure 5.- Growth curve of Stichococcus sp cultivated in M1 modified in 3 repetitions at 4 °C.



**Figure 6.-** Growth curve of *Stichococcus* sp cultivated in M1 modified in 3 repetitions at 24 °C.

The genus *Chlorella* sp showed greater cellular growth until day 22 of its exponential phase in comparison with the genera *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp, because it has a better capacity of absorption of CO<sub>2</sub>, which is why it captured all the nutrients contained in the culture medium used which in this case was the modified M1 (Khotimchenko & Yakolevka, 2005). The time in which the microalgal cells were generated is optimal for the production of lipids and subsequently sintering biofuel and several metabolites. It should also be noted that the modified culture medium M1 favors the growth of the microalga due to the nitrogen and phosphorus components in its composition (Fernández, Sánchez, & Molina, 2001). The cell growth of *Chlorella* sp can be identified in the color according to the light that the microalga receives. At a temperature of 4 °C they showed

a dark green coloration, this is given by the cyanelles that they have inside. As the bottles preserved at 24 °C they took a light green tone, after 7 days they suffer a deterioration by the photo-oxidative effect since the light and the external oxygen act as secondary factors on the microalga, so that more volume of the modified medium M1 was placed, this causes the cells to acquire again the nutrients that were administered at the beginning and thus be able to assimilate components that have not yet been captured by the genus (*Chisti*, 2007). The modified M1 medium was not used by the *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp for cell growth. One of the factors that influences is the composition that the medium possesses, for this reason other different culture media must be tested until finding the appropriate one in future projects to carry out cell growth and later the extraction of lipids

(Jaramillo, 2011). The BBM culture medium allows the development of a large number of cells of *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp although it presents a small amount of nitrogen in its composition (Kuma, 2010).

#### Measurement of extracted lipids

The data obtained in Table 10 in relation to the extraction of lipids of the genera *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp, indicated that the lipid concentration of the genus *Chlorella* sp at a temperature of 4 °C on day 22 of the exponential phase it was 0.2802 mg / mL in comparison with

the genus *Chlorococcum* sp which presented a concentration of 0.0922 mg / mL and the genus *Stichococcus* sp which was 0.0685 mg / mL. All genera were at the same conditions of aeration, light and photoperiod. Likewise, the concentration of lipids extracted at a temperature of 24 °C was greater in the genus *Chlorella* sp on day 22 of the exponential phase with a value of 2.6702 mg / mL, while in the genus *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp, the concentration was 0.8890 mg / mL and 0.5595 mg / mL respectively, as shown in Table 11 .

**Table 10.** Lipid concentration of microalgae genera at 4 °C

Days	Lipids <i>Chlorella</i> sp [mg / mL]	Lipids <i>Chlorococcum</i> sp [mg / mL]	Lipid <i>Stichococcus</i> sp [mg / mL]
0	0	0	0
4	0,1167	0,0380	0.0177
11	0,1682	0,0549	0,0445
15	0.1961	0.0642	0,0519
18	0,2130	0,0698	0.0551
22	0.2802	0,0922	0,0685
25	0.2403	0,0789	0,0587

**Table 11.** Lipid concentration of the microalgae genera at 24 °C

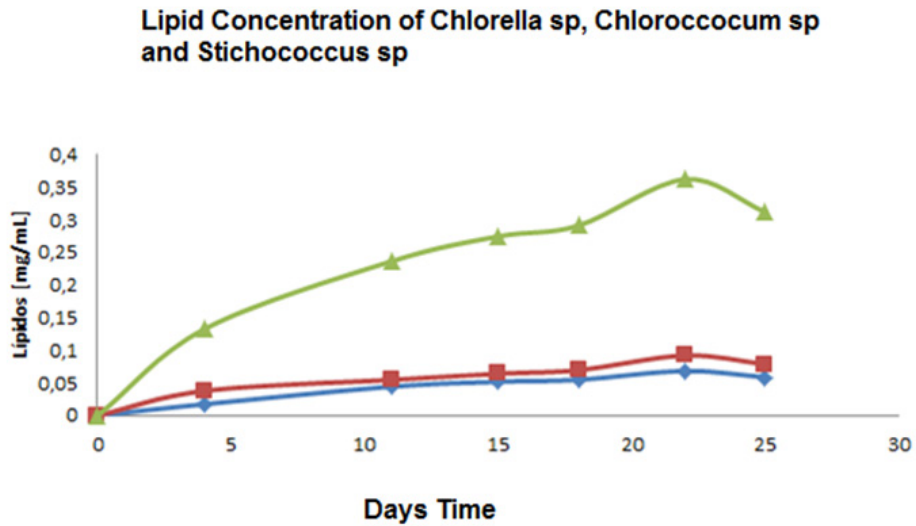
Days	Lipids <i>Chlorella</i> sp [mg / mL]	Lipids <i>Chlorococcum</i> sp [mg / mL]	Lipid <i>Stichococcus</i> sp [mg / mL]
0	0	0	0
4	0,0740	0,0238	0,0180
11	0,2331	0,0765	0.0653
15	0,2765	0,0910	0,0671
18	1,2562	0.4175	0,1785
22	2,6704	0.8890	0.5595
25	1,7097	0,5687	0.4309

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilicas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

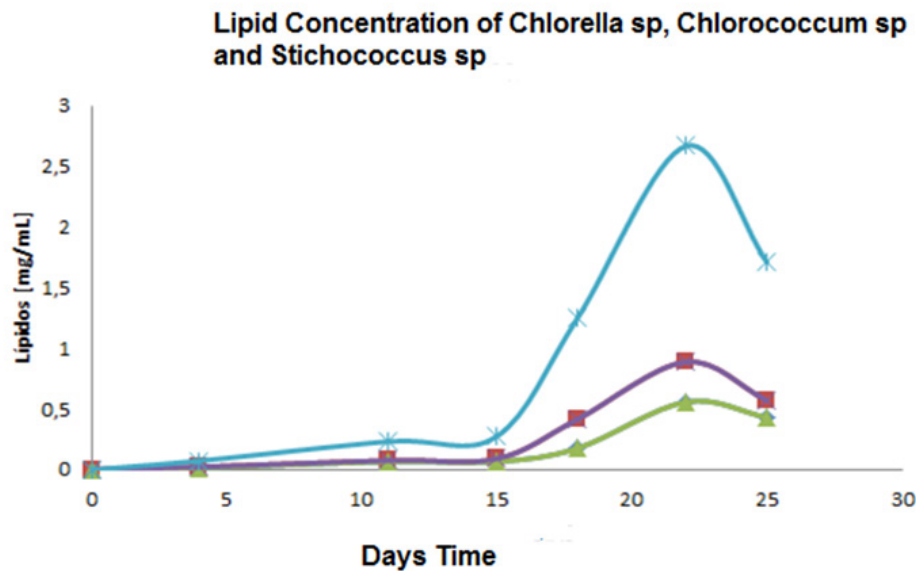
Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

Figure 7 and Figure 8 show the average of lipid concentrations at 28 days, with

three repetitions at a temperature of 4 °C and 24 °C.



**Figure 7.-** Average concentration of Lipids of Chlorella sp, Chlorococcum sp and Stichococcus sp at 4°C.



**Figure 8.-** Average concentration of Lipids of Chlorella sp, Chlorococcum sp and Stichococcus sp at 24°C.

Chlorella sp adapted at 4 °C showed higher concentration of lipids compared to Chlorococcum sp and Stichococcus sp. The lower temperatures increased the level of unsaturation and the light intensity of 5000 lux favored the microalgae in the accumulation of triglycerides with a high saturation level (Anderson & Katja, 2003). In addition, the genus Chlorella sp at 24 °C showed higher lipid production due to the capture of solar energy and CO<sub>2</sub> from the environment. This microalgae is one of the genera with the highest percentage of lipids, the Chlorella emersonii species produces 63% in comparison with the species Chlorococcum oleofaciens that presents 44.3% (Faife, Otero, & Álvarez, 2012). Chlorella sp presents higher productivity of lipids at different temperatures due to the high level of triglycerides that contains, in addition to the genetic constitution, the light intensity, pH, salinity, minerals that were factors that influenced the lipid production (Lee, Lewis, & Ahsman, 2009). In all three genera studied there is a variation in the lipid content. The genera Chlorococcum sp and Stichococcus sp showed very low lipid levels because their cell growth could occur under unfavorable conditions, there were not enough stress conditions and they did not assimilate all the nutrients of the culture medium administered at both temperatures (Liang, Dong, Miao, & Dai, 2006). The optimal culture medium for these microalgae genera is the BBM or Bristol because it contains a stock solution of macronutrients, a stock of micronutrients and a stock of traces. In addition, the pH of the

medium, the concentrations of each of the stocks, the nitrogen composition, as well as the external factors for the development of cellular growth of microalgae should be taken into consideration (MALGAS, 2013). The genera Chlorella sp and Chlorococcum sp and Stichococcus sp presented lipid production at different temperatures, these results were obtained thanks to the Bligh & Dyer method, which allows to extract a large amount of fatty acids using methanol and chloroform as solvents, without the use of heat (Salas, 2015) The analysis of variance was performed for the cell growth of Chlorella sp and Chlorococcum sp at different temperatures, where these hypotheses were verified. The analysis of variance was carried out for the lipid concentration of the genera Chlorella sp, Chlorococcum sp and Stichococcus sp at different temperatures, where these hypotheses were verified.

Ho: Microalgae gender effect = 0

Ha: Microalga genre effect  $\neq$  0

Ho: Temperature effect = 0

Ha: Temperature effect  $\neq$  0

By means of the analysis of variance or ANOVA in the SPSS 15.0 program as shown in Table 12, it was verified that the meanings given by the microalgae and temperature gender factor, related to the significance of 0.05 are lower, so that proceeds to reject the null hypotheses of equality in the factors. For this reason, it was analyzed that the Chlorella sp microalgae had a higher lipid concentration at different temperatures.

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilicas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

**Table 12.** Analysis of ANOVA or variance of the genera *Chlorella sp*, *Chlorococcum sp* *Stichococcus sp* at different temperatures.

Variance analysis					
Source	Sum of Squares Type III	gl	Half quadratic	F	P
Model	4,054	5	0.811	3,935	0.0001
Genus	1,647	2	0.823	3,996	0.0001
Temperature	1,646	1	1,646	7,987	0.0001
Error	6,181	30	0.206		
Total	13,917	36			

Note: To accept the null hypothesis  $P > 0.05$ . F = Ratio of mean squares, P = significance

The Duncan Test was analyzed through the SPSS 15.0 program to check the genus of microalgae that had the highest lipid production taking into consideration the temperature at which each one of them was. In Table 13 the analysis of the gender factor was carried out, resulting in the *Chlorella sp* microalga indicating a

mean value of 0.619, the value is high so it was grouped in a subset, while the genus *Chlorococcum sp* showed a mean value of 0.205 and the genus *Stichococcus sp* had a mean value of 0.134, presenting low levels for this reason were grouped in the same subset.

**Table 13.** ADuncan test of the genera *Chlorella sp*, *Chlorococcum sp* *Stichococcus sp* at different temperatures.

Duncan Alpha test = 0.05			
Error: 0.206		gl: 30	
Gender	Socks	N	Subset
<i>Chlorella sp</i>	0.619	12	1
<i>Chlorococcum sp</i>	0.205	12	2
<i>Stichococcus sp</i>	0,134	12	2

#### 4. CONCLUSIONS

All psychrophilic microalgae present in glaciers in Antarctica produce lipids for the synthesis of biofuel, the genus *Chlorella sp* being the highest concentration with a value of 0.2802 mg / mL at a temperature of 4 °C

and a value of 2, 6704 mg / mL at a temperature of 24 °C on day 22 of its exponential phase. The analysis of the lipid composition shows that the temperature and composition of the modified M1 culture medium are important for the adaptation of the microalgal cells, when these are at

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilicas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

temperatures of 4 °C and 24 °C, of which the samples adapted to room temperature showed greater cell growth. All samples of microalgae obtained from the 15IGa2, 15IGc1 and 15IRE1 consortiums of Greenwich Island and Roberts Island of the Antarctic Islands were initially massed at a volume of 5 mL, from which the genera *Chlorella* sp, *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp were isolated. until reaching a volume of 250 mL, in a 24-hour photoperiod with aeration and illuminance of 4500 lux. The extraction of lipids was carried out from the Antarctic psychrophilic microalgae using the Bligh & Dyer method for the synthesis of biofuel. The genus *Chlorella* sp generates more lipids at a temperature of 24 °C, and in a small amount at a temperature of 4 °C. The genera *Chlorococcum* sp and *Stichococcus* sp generated a low amount of lipids at different temperatures, taking into account that the lipid concentration is low, it is not ruled out that other factors have influenced the production of lipids.

Among the psychrophilic Antarctic microalgae is *Chlorella* sp, which shows rapid growth in cell cultures (Chinnasamy & Bhatnagar, 2010). Its shape is spherical, green because it contains high levels of chlorophyll (Kanno & Kazie, 2005).

## REFERENCES

- Abd El-Baky, A., & El-Baroty, G. (2013). Healthy benefit of microalgal bioactive substances. *Aquatic Science*, 1(1), 11-23.
- Ahmad, F., Khan, A., & Yasar, A. (2012). Uptake of nutrients from municipal wastewater and biodiesel production by mixed algae culture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(7), 550-554.
- AINenergía. (2015). Biodiesel a partir de microalgas: ventajas y desventajas. Recuperado el 07 de septiembre de 2016, de <http://ainenergia.com/biodiesel-a-partir-de-microalgas-ventajas-y-desventajas/>
- Albarracín, I. (2007). Microalgas: Potenciales Productores de Biodiesel. XV Simposio Electrónico Internacional. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad, equidad.
- Alvear Alayón, M. R., Castillo Saldarriaga, C. R., Henao Argumedo, D.L., & Tejada Benítez, L. P. A. (2011). Evaluación del PH y concentración de Nitrogeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella* nativa como fuente de aceite vegetal para la producción del biodiesel (Doctoral dissertation, Universidad de Cartagena).
- Amaro, H., Guedes, C., & Malcata, X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10), 3402-3410.
- Anderson, J., & Katja, P. (2003). Does Excessive Phosphorus Necessarily Cause Increasing Biomass of Diazotrophic Cyanobacteria. In *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Biology, Ecology*, 52(3), 205-217.

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel



- ASOCAE. (2011). Política económica del Antártico. Recuperado el 10 de septiembre de 2016, de [http://www.natureduca.com/ant\\_eco\\_politicaecon.php](http://www.natureduca.com/ant_eco_politicaecon.php)
- BancoMundial. (2013). Indicadores del desarrollo mundial. Recuperado el 11 de septiembre de 2016, de <http://datos.bancomundial.org/indicador/EG.USE.COMM.FO.ZS/countries>
- Barraza, C., Collao, V., Espinoza, C., Moya, F., & Thun, G. (2009). Producción de biodiesel a partir de microalgas. Monografía. Valparaíso: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Barreiro, J., & Sandoval, A. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Caracas, Venezuela: Editorial Equinoccio.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). Algae, Anatomy, Biochemistry and a Biotechnology. Boca Raton, Florida: Tylor & Francis Group.
- BEAM. (2013). History of Microalgae Culture. Recuperado el 07 de Septiembre de 2016, de <http://www.bsb.murdoch.edu.au/groups/beam/BEAM-Appl0.html>
- Bérmudez, L. S. (2012). Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Universidad Nacional de Colombia.
- Cárdenas, P. (2010). Biodiesel a partir de microalgas antárticas. Estudio parámetros de crecimientos de éstas. Trabajo de Grado. Punta Arenas: Universidad de Magallanes.
- Carvajal, A., Cadena, M., Molina, D., Romero, P., Gavilanez, F., & Morales, E. (2013). Cultivo de una cepa carotenogénica de *Chlorococcum* sp (Chlorophyta: Chlorococcales) aislada de rizósfera de *Vicia faba* (Haba). Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, 36(2), 309-324.
- Carvalho, P., Silva, O., Baptista, M., & Malcata, F. (2011). Light Requirements in Microalgal Photobioreactors: An Overview of Biophotonic Aspects. *Appl Microbiological Biotechnology*, 89 (5), 1275-1288.
- Castillo, C., Henao, D., & Tejada, L. (2011). Obtención y comparación de los aceites obtenidos de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella* nativa como materia prima para la producción de biosiesel. Trabajo de Grado. Cartagena: Programa de Ingeniería Química Universidad de Cartagena.
- Chen, P., Min, M., & Wang, L. (2009). Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(4), 56-60.
- Chinnasamy, S., & Bhatnagar, A. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101(9), 3097-3105.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology*

- Advances. 25(3), 294-306.
- Cobos, M., Castro, J., & Cerdeira, L. (2014). Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya, Loreto, Perú. *Ecología Aplicada*, 13(2), 169- 175.
- Colorado, M., Moreno, D., & Pérez, J. (2013). Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia. *Ambiente y Desarrollo*, 17(32), 113-126.
- Correa. (2013). Comparación de la biodiversidad de hongos psicrófilos y psicrótrofos presentes en ecosistemas glaciares de la Antártida y el Chimborazo. Tesis de Grado. Ambato. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Des Abbayes, H., Chadefaud, M., Grassé, P., Feldmann, J., & Prévot, A. (1989). *Botánica vegetales inferiores*. Barcelona: Reverté.
- Dortch, Q. (1990). The Interaction Between Ammonium and Nitrate Uptake in Phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. oldendorf, 61(1), 183-201.
- EcuadorAntártico. (2014). La Estación Científica Pedro Vicente Maldonado hacia el estatus de base permanente. *Ecuador Antártico*, 6(7): 1-40.
- Faife, E., Otero, M., & Álvarez, A. (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable. (Parte II: Microalgas). ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 46(3), 26-35.
- Fernández, F., Sánchez, J., & Molina, Y. (2001). Airlift driven external loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, 56(8), 2721-2732.
- Flores, R. (2013). Evaluación de algaspsicrófilas antárticas como posible fuente de energía renovable. Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de <http://docplayer.es/9880628-Evaluacion-de-algas-psicrofilas-antarticas-como-posible-fuente-de-energia-renovable-avance-semester-uno.html>
- Garbisu, C., Blanco, A., Alkorta, I., Llama, M., & Serra, J. (1999). Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y Ciencia*, 272. 64-71.
- Garibay, A., Vásquez, D., Sánchez, M., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *Bio Tecnología*, 13(3), 38-61.
- Gavilanez, F., Morales, E., & Molina, D. (2013). Taller de biotecnología de microalgas y cianobacterias. Quito: Instituto de Ciencias Básicas UCE.
- González, Á., Kafarov, V., & Guzmán, A. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospectiva*, 7(2), 53-60.
- Gouveia, L. (2011). *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*.

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

- SpringerBriefs in Microbiology, DOI: 10.1007/978-3-642-17997-6\_1.
- Hannon, Gimpel, Tran, Rasala, & Mayfield. (2010). Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*, 1(5): 763–784.
- Huang, Y., Chen, M., & Liu, D. (2008). Effect of Nitrogen, Phosphorus, Light Formation and Disappearance and Water Temperature on the of Blue - green Algae Bloom. *Journal of Northwest Science*, 36(9), 93-100.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2).
- Jaramillo, J. (2011). Evaluación Tecnológica Económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. Universidad Nacional de Colombia, 109-112.
- Kanno, T., & Kazie, U. (2005). *Chlorella vulgaris* and *Chlorella vulgaris* extract (CVE): The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Woodland Publishing.
- Khotimchenko, S., & Yakolevka, I. (2005). Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66(1), 73-79.
- Klochkova, T., Kang, G., Cho, C., Pueschel, J., West, J. & Kim, H. (2006). Biology of a terrestrial green alga *Chlorococcum* sp. (Chlorococcales, Chlorophyta) collected from the Miruksazi stupa in Korea. *Phycology*, 45(3), 349-358.
- Kumar, N. (2010). Nutrient removal, growth response and lipid enrichment by a phytoplankton community. *Biomass Algal.*, 1(3), 1-28.
- Lee, A., Lewis, D., & Ahsman, P. (2009). Microbial flocculation, a potentially lowcost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 559-567.
- Liang, X., Dong, W., Miao, X., & Dai, C. (2006). Production technology and influencing factors of microorganism grease. *Food Reserve Disease*, 27(3), 46-47.
- Liu, C., Sun, H., & Zhu, L. (2006). Effects of Salinity Formed with Two Inorganic Salts on Freshwater Algae Growth. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 26(1), 157-161.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos*. Illinois: Pearson Prentice Hall.
- MALGAS. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica*. Madrid. España: AST Ingeniería SL.
- Martínez, A. (2010). Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta: Volvocales) cultivada en diferentes medios.

- México DF. México: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y tecnología avanzada.
- Molina. (2015). Diversidad de microalgas en muestras colectadas entorno a la estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado en el verano austral de 2013 y 2014. RAPAL, 1-22.
- Monthieu, C. (2010). Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel. Universidad Pontificia Comillas.
- Navarrete, F., Demarco, A., Mambil, E., & Romera, N. (2014). Modelo de producción de biodiesel a partir de algas en Argentina (Doctoral dissertation, Universidad Argentina de la Empresa). Recuperado el 12 de septiembre de 2016, de <http://www.dinamica-de-sistemas.com/revista/0613e-dinamica-de-sistemas>
- Salas, Cando, M. L. (2015). Perfil lipídico de microalgas antárticas recolectadas en febrero 2013 en el Archipiélago Schetland del sur. Universidad Central del Ecuador.
- Sánchez, Y., Piloto, R., Goyos, N., & Ferrer, N. (2012). Predicción del número de cetano de biocombustibles a partir de su composición de ácidos grasos. Ingeniería Mecánica, 15(2), 147-157.
- Santamaría, P., García, F., & Roselló, J. (2010). Biología y Botánica. (Vol.2). Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Santos, M., & Mesquita, J. (1984). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. Coimbra, Portugal: Universidad de Coimbra. 49(1), 215-228.
- Scheffler, J. (2007). Underwater Habits. *Illumin*, 9(4).
- Sivakumar, G., Jeong, K., & O Lay, J. (2014). Bioprocessing of *Stichococcus bacillaris* strain siva2011. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 62.
- Tan, X., Kong, F., & Yu, Y. (2009). Effects of Enhanced Temperature on Algae Recruitment and Phytoplankton Community Succession. *China Environmental Science*, 29(6), 578-582.
- Ugwu, C., & Aoyagi, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021-4088.
- Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. (2007). *Fundamentos de Bioquímica*. Madrid: Médica Panamericana.
- Wackett, L. (2008). Microbial-based fuels: science and technology. *Microbial Biotechnology*, 1(3): 211-225.
- Zang, C., Huang, S., & Wu, M. (2011). Comparison of Relationships Between pH, Dissolved Oxygen and Chlorophyll a for Aquaculture and Nonaquaculture Waters. *Water Air and Soil Pollution*, 219(1- 4), 157-174.

**Producción de lípidos a partir de microalgas psicrófilas, presentes en los glaciares antárticos para la síntesis de biodiesel**

Production of lipids from psychrophilic microalgae present in antarctic glaciers for the synthesis of biofuel

## ANÁLISIS AEROBIOLÓGICO DEL RELLENO SANITARIO DEL GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO DEL CANTÓN SALCEDO

### AEROBIOLOGICAL ANALYSIS OF THE SANITARY FILLAGE OF THE DECENTRALIZED AUTONOMOUS GOVERNMENT OF SALCEDO'S CITY

**M. Córdova-Suárez<sup>1</sup>, Nicole-Vásquez<sup>1</sup>, Diego- Solis<sup>1</sup>, E. Garcés-Sánchez<sup>1</sup>, P. Ramos-Córdova<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>Empresa Pública Municipal de Gestión Integral de Desechos Sólidos de Ambato, EPM-GIDSA, Parroquia Izamba César Augusto Salazar y José Cobo, Ambato - Ecuador

*Artículo recibido: 13/04/2018*

*Artículo aceptado: 06/06/2018*

#### RESUMEN

El volumen de generación de residuos sólidos urbanos depende de varios factores socio-económicos entre los que tenemos el nivel de vida de la población, el ingreso económico de los hogares y de la zona que se trate (rural o urbana). La disposición final de los desechos hospitalarios y comunes son manejados por el personal del relleno sanitario del cantón Salcedo, este se encuentra ubicado en el sector de Jachaguango. El estudio aerobiológico del aire generará resultados sobre la realidad atmosférica de los principales sectores en la que se desempeñan los trabajadores del relleno. La determinación de los microorganismos patógenos presentes en el relleno, permite generar una base importante de datos que aportarán en la disminución de enfermedades en los empleados y en la propagación de epidemias originadas por el transporte en el aire de estos patógenos.

**Palabras claves:** pruebas IMViC, microorganismos patógenos, hongos, bacterias, desechos infecciosos, desechos comunes

#### ABSTRACT

The volume of solid urban waste generation depends on several socio-economic factors, such as the population's standard of living, the economic income of households and the area concerned (rural or urban). The final disposal of hospital and common wastes are managed by the sanitary landfill of the canton Salcedo; this is located in the sector of Jachaguango. The aerobiological study of air will generate results on the atmospheric reality of the main sectors in which fillers perform. The determination of the pathogenic microorganisms present in the landfill makes it possible to generate an important data base that will contribute to the future development of biosafety manuals to avoid diseases in the employees and to the reduction of epidemics caused by the transport in the air of these pathogens.

**Keywords:** IMViC tests, pathogens microorganisms, fungi, bacteria, infectious waste, common waste

## 1. INTRODUCCIÓN

El cantón Salcedo tiene graves problemas de contaminación al igual que otras ciudades del Ecuador, esto se debe principalmente por los desechos generados de manera cotidiana por sus habitantes, por esta razón el Departamento de Gestión Ambiental del Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Salcedo, específicamente el área de desechos sólidos, busca gestionar los mismos dentro del relleno sanitario del sector de Jachaguango (Donoso, Otto, Calahorrano, & Charcopa, 2014).

A causa de la acumulación diaria de basura en el relleno sanitario de Salcedo, se debe considerar el bienestar del factor antrópico, el cual es vulnerable a la acumulación de vectores y patógenos que se encuentran en el aire que abarca la zona de estudio (Jimenez, 2012). Los microorganismos son transportados a través de chimeneas encargadas de comunicar el interior del relleno con el medio ambiente externo, con la finalidad de expulsar principalmente gas metano y otros gases producto de la descomposición anaeróbica de los residuos previamente depositados y sellados (Andache & Castillo, 2016). Los vectores suspendidos en la atmósfera son fácilmente inhalables, produciendo efectos directos a la salud de los seres humanos que ejecutan su labor dentro de las instalaciones.

El estudio aerobiológico dentro del relleno sanitario del cantón Salcedo, permitirá identificar posibles microorganismos de características patógenas, que pueden llegar a ser los

responsables de afectar la integridad de los trabajadores, constituyéndose en una base de datos necesaria para el estudio de las posibles medidas a tomar que logren mitigar dichas afectaciones.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño experimental

Según lo planificado en la metodología del proceso, se realizó un diseño experimental del tipo AxBxC en el cual se consideraron tres factores. A continuación, en la tabla 1 se presenta la matriz del diseño.

Mediante el empleo del paquete estadístico Infostat estudiantil, se ha logrado desarrollar la prueba de Tuckey con un diseño experimental del tipo AxBxC a nivel de confianza del 95% de los datos de obtenidos de la medición por el método turbidimétrico, dando un total de 40 muestras, un coeficiente de correlación del 97% y un coeficiente de variación del 11,35%.

### 2.2. Análisis aerobiológico

El procedimiento empleado para la identificación de microorganismos patógenos se presenta en la figura 1.

### 2.3. Crecimiento Micótico

Para el análisis de crecimiento de hongos se utilizó el medio de cultivo líquido de infusión cerebro corazón (BHI) en el cual se añadieron antibióticos como Rifampicina

**Tabla 1.** Tratamientos resultantes de la combinación de los factores en estudio.

<b>Tratamientos</b>	<b>A: Sectores</b>	<b>B: Hora</b>	<b>C: Días</b>
a1b1c1	ADH	09h00	Lunes
a1b1c2	ADH	09h00	Martes
a1b1c3	ADH	09h00	Miércoles
a1b1c4	ADH	09h00	Jueves
a1b1c5	ADH	09h00	Viernes
a1b2c1	ADH	11h00	Lunes
a1b2c2	ADH	11h00	Martes
a1b2c3	ADH	11h00	Miércoles
a1b2c4	ADH	11h00	Jueves
a1b2c5	ADH	11h00	Viernes
a2b1c1	ADDSC	09h00	Lunes
a2b1c2	ADDSC	09h00	Martes
a2b1c3	ADDSC	09h00	Miércoles
a2b1c4	ADDSC	09h00	Jueves
a2b1c5	ADDSC	09h00	Viernes
a2b2c1	ADDSC	11h00	Lunes
a2b2c2	ADDSC	11h00	Martes
a2b2c3	ADDSC	11h00	Miércoles
a2b2c4	ADDSC	11h00	Jueves
a2b2c5	ADDSC	11h00	Viernes

*Nota:* Donde ADH representa al área de desechos hospitalarios y ADDSC representa el área de depósito de desechos sólidos comunes.

y Estreptomycin, para inhibir el crecimiento bacteriano, sin embargo, no existió crecimiento micótico al inocular el medio en cajas Petri.

#### **2.4. Difusión en placa para bacterias**

Se sembró por el método de difusión en placa, este procedimiento se realizó en los 40 tratamientos del muestreo bacteriano en agar McConkey y Tripteína Soya agar en los cuales se realizaron

diluciones de 10<sup>1</sup>; 10<sup>2</sup>; 10<sup>3</sup>; 10<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> respectivamente. Logrando evidenciar crecimiento en la mayoría de las muestras tomadas posteriormente al tiempo de incubación (48 horas a 37 °C).

#### **2.5. Difusión en placa para hongos**

Se realizó difusión en placa de hongos, para la cual se inoculó la muestra en diluciones 10<sup>0</sup> y 10<sup>1</sup> de las dos áreas

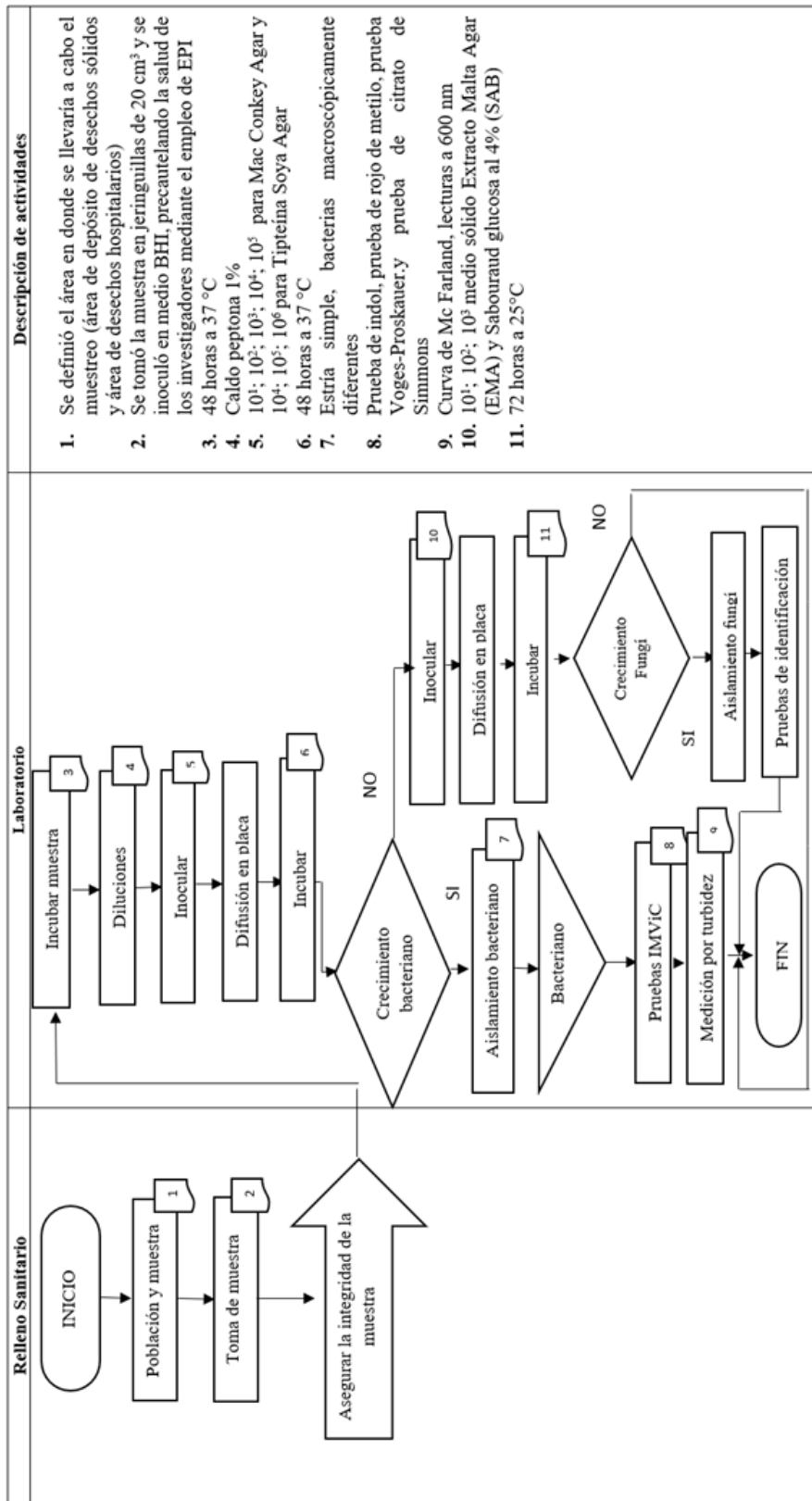


Figura 1. Metodología del Proceso



de estudio en medio Sabouraud agar glucosa al 4% y Extracto Malta agar, se constató la ausencia de crecimiento de hongos luego del tiempo de incubación (48 horas).

## **2.6. Aislamiento bacteriano**

Cada colonia fue purificada en cajas tri-petri con el mismo medio de cultivo del que fueron extraídas, garantizando de esta manera que las funciones metabólicas de los microorganismos no se vean afectadas por el cambio de sustrato empleado en el medio. Posterior al tiempo de incubación (48 horas a 37 °C) de las estrías simples, se evidenció que el crecimiento microbiano era apto para posteriores pruebas.

## **2.7. Pruebas IMViC**

Para las pruebas IMViC se aislaron 129 bacterias distintas macroscópicamente, las cuales fueron sometidas a la prueba de Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato de Simmons. Los resultados de estas pruebas se aprecian por la variación de coloración que presentan.

# **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **3.1. Crecimiento bacteriano**

Se observó la presencia de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo líquido Infusión Cerebro-Corazón (BHI), el cual presentó turbidez al

ser incubada por 48 horas a 37 °C. La turbidez del medio de cultivo evidenció la presencia de microorganismos en el relleno sanitario del cantón.

## **3.2. Difusión en placa para bacterias**

Existió crecimiento en la gran mayoría de muestras en Tripteína Soya agar, esto se debió a que, el medio no es estrictamente selectivo, lo cual favorece al desarrollo de una mayor cantidad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y estrictos (DocPlayer, 2017). A diferencia de McConkey agar en el cual no existió crecimiento mayoritario, debido a que, es un medio de diferenciación selectiva en el cual principalmente podemos encontrar Enterobacteriaceae y otros tipos de bacilos Gram negativos (Becton Dickinson, 2014).

## **3.3. Aislamiento bacteriano**

El aislamiento bacteriano de las placas en medio de cultivo agar McConkey y Tripteína Soya agar, se llevó a cabo mediante purificación por estría simple de las colonias macroscópicamente diferentes, dando un resultado de 48 y 81 colonias aisladas respectivamente para cada medio de cultivo, siendo un total de 129 colonias por evaluar.

## **3.4. Pruebas IMViC**

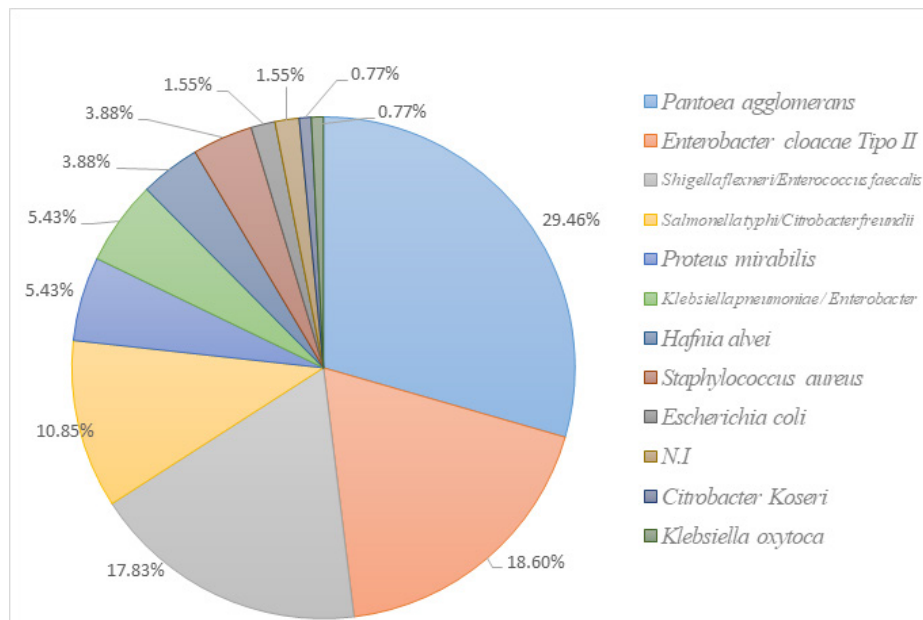
Las 129 bacterias distintas macroscópicamente, fueron sometidas a las pruebas IMViC. Estas pruebas permitieron identificar a los

microorganismos por la variación de color, esta variante se dio debido a que los microorganismos producen ciertos tipos de productos en presencia de los colorantes. Las bacterias fueron identificadas según su especie, esta identificación se basó en la reacción (cambio de color) que determinó a que especie de microorganismos perteneció en base de datos bibliográficos.

En la figura 2 se puede observar que existió una mayor frecuencia de *Pantoea agglomerans* el cual constó de 38 repeticiones, lo que corresponde al 29% del total de bacterias aisladas, *Enterobacter cloacae* Tipo II fue el segundo microorganismo más frecuentemente aislado con 24 repeticiones correspondiente al 19% del total de bacterias aisladas, *Shigella flexneri/Enterococcus faecalis* presentaron una frecuencia de incidencia de 23 repeticiones correspondiente al 17,83%, tanto

*Proteus mirabilis* como *Klebsiella pneumoniae/ Enterobacter* presentaron la misma incidencia con 7 repeticiones lo cual corresponde al 5,43%, *Hafnia alvei* y *Staphylococcus aureus* tuvieron una frecuencia de 5 repeticiones cada uno lo cual corresponde al 3,88%, *Escherichia coli* con 2 repeticiones correspondientes al 1,55% y tanto *Citrobacter koseri* como *Klebsiella oxytoca* presentaron una frecuencia de 1 repetición cada uno correspondiente al 0,77%. Finalmente existieron dos colonias que no pudieron ser identificadas debido a que no se encontró los resultados estandarizados.

De este grupo de bacterias, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* fueron consideradas como peligrosas, debido a que, representan un riesgo para el trabajador, esto se debe a su capacidad de causar patologías graves en el ser humano, representando un serio riesgo en la salud de los trabajadores por lo



**Figura 2.** Repetitividad del aislamiento microbiano durante la fase experimental del proyecto.

que se consideran patógenos de alta peligrosidad, además presentan un serio riesgo para la comunidad debido a que puede ser transmitidos por medio del trabajador.

### **3.5. Medición de cantidad microbiana por turbidez**

El método común de conteo en placa para la determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) no ha sido tomado como un método factible dentro del presente estudio, esto debido al tiempo y recursos económicos que se deben emplear, por lo que se realizó un análisis cuantitativo por medio de la medición de la turbidez de las muestras obtenidas a partir del crecimiento microbiano en el medio de cultivo (BHI), para la cual se requirió el empleo de la curva estándar de crecimiento microbiano, conocida como escala de Mc Farland o a su vez como curva estándar de Mc Farland, la cual provee los patrones necesarios por medio de reacciones químicas para conocer un valor estimado de microorganismos por métodos turbidimétricos y espectrofotométricos (Corrales, 2015).

### **3.6. Diseño experimental**

Las interacciones tomadas en cuenta fueron: según la zona de desechos como a1(hospitalarios) y a2 (comunes), según la hora en la que se tomó que fueron b1 (9:00) y b2 (11:00), finalmente los días muestreados fueron c1 (lunes), c2 (martes), c3 (miércoles), c4 (jueves), c5 (viernes). Al ser objeto de la presente investigación la determinación de la mayor

concentración de microorganismos en el aire causantes de posibles enfermedades a los trabajadores del relleno sanitario del cantón Salcedo por exposición, se ha logrado deducir que las combinaciones a2b2c4 y a2b2c1 son estadísticamente significantes y representan los factores con mayor riesgo biológico en el período del estudio realizado. Estos resultados tienen gran relación con la información brindada por el Gobierno Autónomo Descentralizado (GAD) Municipal de Salcedo, en los que mencionaban que los días de feria del cantón corresponden a los días domingos y jueves (Lascano, 2016) y los desechos provenientes son depositados en grandes cantidades en las celdas de depósito.

## **4. CONCLUSIONES**

Se puede observar que según la interacción estadística del diseño AxBxC el área de desechos sólidos es la de mayor concentración de microorganismos para los días jueves a las 11H00 y lunes a las 11H00, se pudo observar que existen microorganismos patógenos los cuales fueron identificados por las pruebas IMNViC demostrando así el riesgo al cual se ven expuestos los trabajadores, debido a las infecciones causadas por 15 cepas causantes de diferentes tipos de enfermedades.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Becton Dickinson. (2014). BD MacConkey II Agar. Recuperado de <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>

- Carrasco, A., & Ricardo, E. (2016). Elaboración de instructivos de Seguridad Industrial para puestos de trabajo basados en un Estudio Aerobiológico del relleno sanitario de la Empresa Pública Municipal Gestión Integral de Desechos Sólidos Ambato. (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica). Recuperado de Repositorio UTA: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/21686/1/BQ%2083.pdf>
- Corrales, M. (2015). Solución McFarland. Recuperado el 26 de enero de 2017, de <http://documents.tips/documents/solucion-mcfarland.html#>
- DocPlayer. (2017). Placas de petri conteniendo medios de cultivo. Placas de petri Tripteina Soja Agar (TSA). Recuperado de <https://docplayer.es/11370987-Placas-de-petri-conteniendo-medios-de-cultivo-placas-de-petri-triptona-soja-agar-tsa.html>
- Donoso, J., Otto, C., Calahorrano, O., y Charcopa, L. (2014). Relleno Sanitario San José de Jachaguango, Cantón Salcedo. Obtenido de Prezi.com: <https://prezi.com/bwt4cmwf7o9i/relleno-sanitario-san-jose-de-jachaguango-canton-salcedo/>
- Jimenez, A. M. (2012). Propuesta para el manejo de lixiviados generados en el relleno sanitario del Cantón Salcedo, Provincia de Cotopaxi. Obtenido de Repositorio UTC: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/582>
- Lascano, I. (2016). Inducción al Relleno Sanitario del Cantón Salcedo. (D. Solís, & N. Vásquez, Entrevistadores) Salcedo, Cotopaxi, Ecuador.

## MEDICIÓN DE LAS EMISIONES DE EFECTO INVERNADERO EN EL TERMINAL TERRESTRE DE SALCEDO

### MEASUREMENT OF GREENHOUSE EMISSIONS IN THE TERRESTRIAL TERMINAL OF SALCEDO

M. Córdova-Suarez<sup>1</sup>, A. León-Silva<sup>1</sup>, E. Garcés-Sánchez<sup>1</sup>, D. Borja-Mayorga<sup>2</sup>, D. Córdova-Suarez<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Escuela Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ingeniería Química, Riobamba, Ecuador

<sup>3</sup>HES WELL CORDINATOR SCHLUMBERGER SPM-SHAYA, Auca - Ecuador

*Artículo recibido: 20/04/2018*

*Artículo aceptado: 04/06/2018*

#### RESUMEN

Las emisiones de efecto invernadero es un tema de gran relevancia en la contaminación del aire y el cambio climático, por otro lado, el Gobierno Ecuatoriano reconoce al cambio climático como un desafío y ha tomado varias medidas para reducir las emisiones de GEI a nivel nacional de varios sectores. En este estudio se contribuyó con un inventario de emisiones para el sector transporte del Terminal Terrestre de Salcedo, para lo cual se calculó las emisiones de efecto invernadero con el equipo Bacharach ECA-450 y el método de ralentí, los datos se utilizaron para obtener los factores de emisión de CO<sub>2</sub> (8,98E+04 kg /TJ) y N<sub>2</sub>O (3,46E-02), además se calculó la huella de carbono total (8,86E+03 t CO<sub>2</sub>-eq ) y por alcances, de donde el alcance III (flota de autobuses) generó la mayor cantidad de emisiones debido a la calidad del combustible (diésel) y a la aplicación de la tecnología EURO en Ecuador.

**Palabras claves:** emisiones de efecto invernadero, Terminal Terrestre de Salcedo, huella de carbono, tecnología EURO.

#### ABSTRACT

Greenhouse gas emissions is a key issue in air pollution and climate change, on the other hand, the Government of Ecuador recognizes climate change as a challenge and has taken several measures to reduce GHG emissions at a global level national of several sectors. This study contributed an inventory of emissions for the transport sector of the Bus Station of Salcedo, for which greenhouse emissions were calculated with the Bacharach ECA-450 equipment and the idling method, the data were used to obtain the CO<sub>2</sub> emission factors (8.98E + 04 kg / TJ) and N<sub>2</sub>O (3.46E-02), in addition the total carbon footprint (8.86E + 03 t CO<sub>2</sub>-eq) and by ranges were calculated, from where scope III (bus fleet) generated the largest amount of emissions due to the quality of the fuel (diesel) and the application of the EURO technology in Ecuador.

**Keywords:** greenhouse emissions, Terrestrial Terminal of Salcedo, carbon footprint, EURO technology.

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

## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución del hombre, este se ha adaptado al clima y al lugar en donde vive, pero dado a los efectos del cambio climático causado por los gases de efecto invernadero (GEI) de varios sectores de desarrollo (Alava Castro, 2015), el ser humano está padeciendo varias complicaciones con respecto a la salud y la sostenibilidad de la vida (Adi Moreno-Casasola, Guevara S., Gallardo, & Galante, 2016).

Esto ha forjado que varios organismos a nivel mundial se preocupen del estado de la atmósfera, como es el caso del Convenio de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático y el Protocolo de Kioto, que han establecido varios mecanismos para estabilizar las concentraciones de GEI (IDEAM, 2010; Sánchez Toledano, Carrasco Díaz, & Sánchez Toledano, 2014).

De acuerdo al tratado de Kioto se establecieron tres modalidades para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, que son: El comercio de Derecho de Emisiones, Implementación conjunta (IC) y Mecanismo de Desarrollo Limpio (MDL) (Caballero Quintero & Ledezma Rodríguez, 2013).

Los proyectos MDL en los países que lo desarrollan ayudan a alcanzar objetivos económicos, sociales y ambientales, además buscan una menor dependencia de los combustibles fósiles utilizados por el sector transporte (Gallegos Garzón, 2012).

El transporte en la actualidad se ha convertido en un indicador del desarrollo económico y social de un país, porque permite el acceso a recursos, bienes, insumos además de que la población está en aumento y necesita de un acrecentamiento de medios de movilización (Miralles-Guasch, 2012; Sánchez & Reyes, 2015). Los principales motivos de generación de GEI del transporte en el país están ligadas al atraso en la tecnología automotriz y consumo de combustibles fósiles (Caballero Quintero & Ledezma Rodríguez, 2013).

La Unión Europea desde 1988 ha clasificado la tecnología de los automotores en categorías de Euro (I, II, III, IV, etc.). esta categorización se debe a la normativa europea referente a los límites máximos de emisiones contaminantes que salen por el tubo de escape de los vehículos (coches de gasolina, coches diésel, camiones, autobuses, etc.) (Unión Europea, 2018). Para el presente estudio se manejaron las categorías Euro I, II, III; debido a que en el Ecuador estas categorías con más comunes en terminales terrestres.

La Universidad Técnica de Ambato ha realizado dos estudios sobre Huella de Carbono en Terminales, en las ciudades de Ambato (UDTA) y Riobamba con  $9,24E+04$  y  $3,74E+04$  t CO<sub>2</sub>-eq respectivamente.

Esto ha generado la necesidad de establecer una línea base de la actividad del transporte del Terminal Terrestre de Salcedo con el fin de calcular las emisiones de efecto invernadero y la huella de carbono mediante los

principios del Protocolo de emisiones de gases de efecto invernadero, además este proyecto va encaminado al beneficio del Terminal Terrestre de Salcedo y de la sociedad en general, ya que se diseñará un plan de Acción para mejorar el Transporte público de la Parroquia urbana San Miguel de Salcedo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

Se utilizó un analizador de combustión de la marca Bacharach ECA-450 y el método de ralentí, que consistió en tomar la medición con la caja de cambios en punto muerto y el motor embragado para obtener: % O<sub>2</sub>, temperatura de chimenea y ambiente, CO, NO, NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> en mg/m<sup>3</sup>.

### 2.2. Metodología

Las mediciones se realizaron mediante el método a ralentí y para obtener mediciones precisas se estandarizo el proceso, mediante la toma de medición de 1 minuto para el calentamiento del

motor del autobús y 30 segundos para la toma de muestra con el equipo ECA-450, las mediciones se realizaron por la mañana y la tarde, en un intervalo de 2 semanas realizando mediciones diarias con dos replicas para cada uno de los autobuses muestreados.

La muestra de autobuses considerada para el alcance III fueron aquellas que prestaban los servicios de transporte dentro del Terminal Terrestre de Salcedo y se clasifico de acuerdo a la norma EURO establecida en el Ecuador la cual considera el año de fabricación del parque automotor, clasificándola en EURO I (1994-2000), EURO II (2001- 2010) y EURO III (2011 en adelante).

Para el desarrollo de la metodología se utilizaron dos normas: la norma ISO 14064-1:2006 que garantizó niveles de calidad y seguridad en los datos obtenidos y la norma GHG Protocol, que se utilizó como herramienta de cálculo para cuantificar y gestionar las emisiones de Gases de Efecto Invernadero.

### Definición de límites

De acuerdo a la norma ISO 14064-

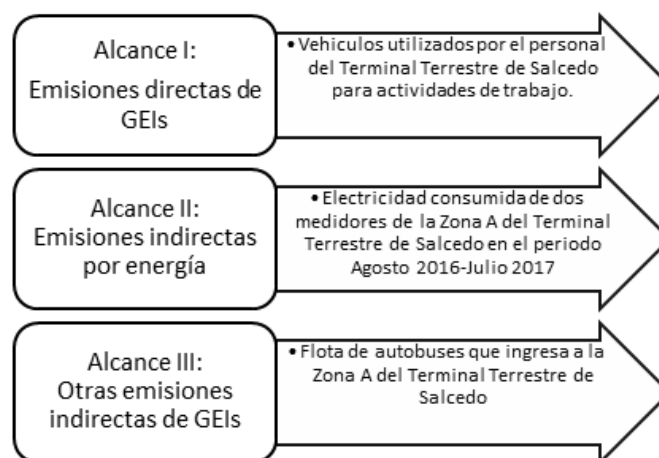


Figura 1. Límites operativos del Terminal Terrestre de Salcedo.

1:2006 se clasifico en tres categorías (Figura 1)

### Tamaño de muestra

La muestra se calculó con un nivel de confianza del 99% de una población de 103 autobuses. Además, se clasifico a la flota según la tecnología EURO (año de fabricación) en Ecuador y se realizó un muestreo estratificado con afijación proporcional para obtener grupos con características similares de emisiones de GEI.

### Proceso de Cuantificación

#### Alcance II

El consumo de electricidad (KWh) se transformó a MWh, posteriormente se utilizó la ecuación de emisiones de CO<sub>2</sub>-eq para electricidad.

Emisiones de CO<sub>2</sub> (eq) = Energía Eléctrica consumida(MWh) \* Factor de emisión eléctrico (para cada país)  
(Ec.1)

El Factor de emisión eléctrico utilizado fue obtenido del Sistema Nacional Interconectada de Ecuador 0.5062 t CO<sub>2</sub>/MWh, además se realizó el promedio de los resultados y se obtuvo la huella de carbono de electricidad en t CO<sub>2</sub>-eq.

#### Alcance III

Se determinó los factores de emisión para CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O en Kg/TJ y las emisiones para cada GEI en t GEI.

Para el factor de emisión CO<sub>2</sub> se utilizó el %O<sub>2</sub> obtenida del equipo ECA-450 para determinar el %CO<sub>2</sub>, además, se estableció la densidad del

aire de San Miguel de Salcedo durante el periodo de medición.

El factor de emisión de N<sub>2</sub>O se calculó de acuerdo al método descrito por Lipman & Delucchi, (2002), que consiste en cálculos estequiométricos, para lo cual se determinó la masa anual de los siguientes gases: NO, NO de la medición y N<sub>2</sub>O.

El cálculo de emisiones de GEI se realizó a CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O Y CH<sub>4</sub> mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

Emisiones de GEIs (t GEI) = (Dato de actividad x Factor de emisión)/1000  
(Ec. 2)

Emisiones de GEIs = Emisiones de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub>.

Dato de actividad = TJ/año

Factor de emisión= Factor calculado de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O, y factor bibliográfico de CH<sub>4</sub>.

#### Cálculo de la huella de Carbono

Para el cálculo de la huella de carbono se utilizó la siguiente ecuación:

Emisiones (t CO<sub>2</sub>-eq)=Dato de emisión x Potencial de calentamiento global  
(Ec. 3)

El potencial de calentamiento (GWP) relativos al CO<sub>2</sub> se obtuvo de Global Warming Potential Values.

#### Procesamiento y Análisis de resultados

Una vez calculadas las emisiones de cada fuente en unidades de toneladas de CO<sub>2</sub>-eq, se sumaron todas las emisiones de la misma categoría y por alcance.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Límites operativos e identificación de emisiones

Para obtener un muestreo representativo de emisiones de GEIs en el Terminal Terrestre de Salcedo, se establecieron tres tipos de emisiones.

Alcance I: El Terminal Terrestre de Salcedo al no contar con vehículos propios para la movilidad de los trabajadores se estableció que este alcance no contribuye con la contaminación del ambiente.

Alcance II: la Zona A posee dos medidores de los cuales se obtuvieron el consumo eléctrico de un año que sirvió para la determinación de

emisiones y huella de carbono.

Alcance III: se consideró a la flota de autobuses puesto que esta produce actividades dentro de la Zona A, pero no es propiedad de la misma, la población de este alcance estuvo formada por 6 cooperativas con un total de 103 autobuses.

#### 3.2. Factores de Emisión

En la tabla 1 se muestran los valores obtenidos de los factores de emisión, dependientes de la tecnología en estudio.

De acuerdo a estudio de IPCC (2006b) los factores de emisión para

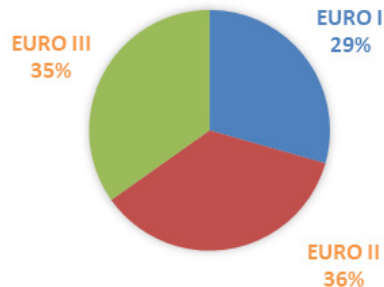
**Tabla 1.** Factores de emisión de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> en kg/TJ

TECNOLOGÍA	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O	CH <sub>4</sub>
EURO I	1,00E+05	3,09E-02	3,90E+00
EURO II	9,45E+04	4,24E-02	3,90E+00
EURO III	7,45E+04	3,05E-02	3,90E+00
<b>PROMEDIO</b>	<b>8,98E+04</b>	<b>3,46E-02</b>	<b>3,90E+00</b>

el transporte terrestre (combustible: diésel) fue de 74100 kg/TJ de CO<sub>2</sub>, este valor fue menor al obtenido 8,98E+04 kg CO<sub>2</sub> /TJ, esto quiere decir, que el carbono que estuvo presente en el combustible no llegó completamente a oxidarse durante el proceso de oxidación. El factor de emisión N<sub>2</sub>O de reportado por IPCC (2006b) fue de 3,9 kg/TJ, este valor comparado con el obtenido fue inferior esto se debió a varios factores como la tecnología, características del autobús, el mantenimiento, el proceso

de la combustión y las características del combustible (Varela Vásquez & Sánchez, 2014). Finalmente, el factor de emisión CH<sub>4</sub> presento valores inapreciables, por ello, se utilizó el valor bibliográfico, expuesto por IPCC (2006b). Según el IPCC (2006a) el usar factores de emisión específicos por tecnología y región, permite la obtención de datos reales.

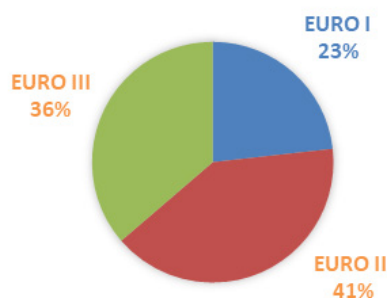
### 3.3. Emisiones de GEI



**Figura 2.** Emisiones de CO2 en toneladas al año.

En la figura 2 se presentan las emisiones obtenidas de CO2 por tecnología EURO del alcance III, el aumento de las emisiones de CO2 de la tecnología EURO II y III con respecto al EURO I se debió principalmente a una aplicación inadecuada de la tecnología en el país, debido a un desbalance entre calidad de combustible, tecnología automotriz y tiempo de aplicación (Fuel Institute, 2013). Esto generó que el EURO II tenga una emisión del 36% y el EURO III disminuyera

su emisión a 1%, mientras que el EURO I alcanzó una emisión del 29%, esto confirmó que el país no es competente para utilizar la tecnología EURO II y III de manera responsable, es decir, utilizar la tecnología con la finalidad de disminuir las emisiones de CO2 al ambiente. Esto confirma la clasificación que el Ecuador tiene sobre la aplicación de la tecnología EURO en el mundo (Naciones Unidas, 2014; Panadero, 2012).



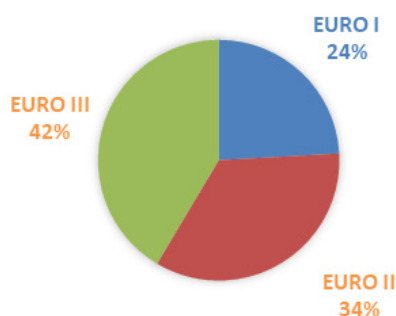
**Figura 3.** Emisiones de N2O en toneladas al año..

Las emisiones de N2O son producto de la quema del combustible (Varela Vásquez & Sánchez, 2014), los

resultados obtenidos fueron muy bajos, pero la tecnología que generó mayor emisión fue el EURO II y

III, el aumento de esta emisión se presume que fue causada por las prácticas de conducción para la toma de muestra, el tipo y antigüedad del catalizador (Guayanlema Córdova, 2013). De acuerdo al inventario de GEI del transporte en Uruguay de las

emisiones de N<sub>2</sub>O con mayor emisión fue el EURO II Y III con 41% y 36% respectivamente, además, presentó valores bajos para este GEI (Aresti, Tanco, Aguirre, Jurburg, & Moratorio, 2016).



**Figura 4.** Emisiones de CH<sub>4</sub> en toneladas al año.

Las emisiones de metano producen el atrapamiento del calor dentro de la atmosfera, esto produce el aumento de la temperatura y cambios en el sistema climatológico (Globalmethane, 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mencionar que las emisiones aumentaron conforme avanza la tecnología EURO, al igual que en el estudio de Aresti y colaboradores (2016) que mencionan que los niveles de CH<sub>4</sub> están en aumento, no solo en el sector de transporte sino de manera general, esto se debió a un desconocimiento de este gas de efecto invernadero dentro del ciclo del carbono lo que complicó el

mejoramiento de la tecnología para reducir las emisiones con respecto a este GEI.

### 3.4. Huella de Carbono

La huella de carbono determino el impacto que produce el Terminal Terrestre de Salcedo, mediante el uso de electricidad y del servicio de transporte en la zona A, la cual se expresó en toneladas de CO<sub>2</sub> equivalente. Como se puede apreciar en la tabla 2 la Huella de Carbono dependió de la tecnología EURO.

**Tabla 2.** Huella de carbono por tecnología EURO al año

TECNOLOGÍA	PROMEDIO DE LA MUESTRA	POBLACIÓN
EURO I (10 unidades)	7,23E+01	7,23E+02
EURO II (56 unidades)	8,80E+01	4,93E+03
EURO III (37 unidades)	8,59E+01	3,18E+03
<b>TOTAL</b>		<b>8,83E+03</b>

*Nota:* La población formada por 103 autobuses para los 3 Euros. El promedio de la muestra y están expresadas en (t CO<sub>2</sub>-e)

La tecnología que más generó emisiones de CO<sub>2</sub>-eq en promedio fue el EURO II con 88 t, esto se debió a que las emisiones de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O fueron más altas para esta tecnología (Figuras 2 y 3). De acuerdo a la investigación realizada en el Terminal Terrestre de Riobamba, el EURO II con 400 autobuses fue la tecnología con mayor emisión 20908.061 t CO<sub>2</sub>-eq, este valor fue superior al obtenido 4,93E+03 t CO<sub>2</sub>-eq (56 autobuses) (Chaglla Cango & Pico Pérez, 2017).

Además, el Gobierno de España en el 2014 alcanzó la mayor cantidad

de emisiones (t CO<sub>2</sub>-eq) procedentes del sector de transporte durante el periodo 2001-2010 que corresponde a la tecnología descrita.

El EURO III con 85,9 t CO<sub>2</sub>-eq (valor promedio) redujo sus emisiones con respecto al EURO II, esto se debió a cambios en el tamaño de los motores y mantenimiento de los autobuses. Finalmente, la tecnología con menor cantidad de toneladas de CO<sub>2</sub>-eq fue el EURO I, esto significó que la tecnología EURO I fue la que más se adaptó a la realidad ecuatoriana.

**Tabla 3.** Comparación entre terminales terrestres de la huella de Carbono anual por alcances.

ALCANCES	SALCEDO	RIOBAMBA
I	0,00	0,00
II	33,80	0,55
III	8,83E+03	3,73E+04
<b>HUELLA DE CARBONO TOTAL</b>	<b>8,86E+03</b>	<b>3,74E+04</b>

*Nota:* La huella de carbono esta expresada en t CO<sub>2</sub>-eq. Los datos del Terminal Terrestre de Riobamba se adaptaron de Chaglla Cango & Pico Pérez; Córdova et al. (2017).

Como se aprecia en la tabla 4 el alcance I tuvo el 0% de emisiones, esto se debió principalmente a que el Terminal Terrestre de Salcedo no cuenta con una fuente de movilización propia, también se atribuyó a que esta edificación es relativamente nueva y que la parroquia San Miguel de Salcedo tiene poca extensión, lo que no justificó la adquisición de un vehículo.

El alcance II hizo referencia al consumo de electricidad de la Zona A la cual generó 33,8 t CO<sub>2</sub>-eq con un consumo de 66,7 MWh/año con dos medidores, este valor se comparó con el valor del Terminal Terrestre de Riobamba y se observó un aumento considerable del consumo eléctrico. Esto se debió al uso de computadores, televisores, impresoras, apertura de puertas automáticas, servicio de ticket entre otros servicios que ofrece la Zona A del Terminal Terrestre de Salcedo.

El alcance III contó con 103 autobuses que brindaron sus servicios a diferentes partes dentro y fuera de la provincia, este alcance generó 8,83E+03 t CO<sub>2</sub>-eq, valor menor en comparación al Terminal de Riobamba, esta disminución de emisiones se debió a que en San Miguel de Salcedo no existieron áreas de transferencia como en la ciudad de Riobamba, esto dio lugar a una menor cantidad de autobuses y emisiones. Además, los resultados obtenidos en esta investigación señalaron que el alcance III generó una mayor cantidad de emisiones contaminantes.

La huella de Carbono total que generó el Terminal Terrestre de Salcedo fue de 8,86E+03 t CO<sub>2</sub>-eq, este valor fue

bajo en comparación con el Terminal de Riobamba. La mayor cantidad de emisiones que contribuyeron a la huella de Carbono fue el del alcance III, una medida que se recomendó adoptar a esta organización, fue disminuir la cantidad de motores encendidos de los autobuses mientras se movilizan en el área de estacionamiento y entrada.

#### 4. CONCLUSIONES

Se calculó las emisiones de efecto invernadero producidas por el Terminal Terrestre de Salcedo basándose en la Norma ISO 14064 y GHG Protocol, de lo cual se determinó el factor de emisión para CO<sub>2</sub> (8,98E+04 kg /TJ) y N<sub>2</sub>O (3,46E-02) valores que difirieron del reportado por IPCC.

Con respecto a las emisiones de GEI (t/año), el EURO II tuvo los valores más altos con respecto a CO<sub>2</sub> (36%) y N<sub>2</sub>O (41%), mientras que para CH<sub>4</sub> el valor más alto fue dado por el EURO III (42%), estos resultados fueron basados en el consumo de combustible (diésel) de la flota de autobuses durante el periodo de medición.

Con respecto a los resultados de la huella de Carbono del Terminal Terrestre de Salcedo, el alcance II o emisiones de electricidad generó 33,8 t CO<sub>2</sub>-eq, y el alcance III (flota de autobuses) el 8,83E+03 t CO<sub>2</sub>-eq, de este alcance la tecnología que más genero emisiones fue el EURO II con 3,18E+03 t CO<sub>2</sub>-eq, este aumento de emisiones se debió a varios factores como calidad del combustible, mantenimiento de los autobuses y aplicación de la norma europea en el país.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alava Castro, D. A. (2015). Cálculo de la huella de carbono bajo la metodología de GreenHouse Gas Protocol. (1), 1–22.
- Aresti, M., Tanco, M., Aguirre, A., Jurburg, D., y Moratorio, D. (2016). Inventario de GEI del Transporte de Carga por Carretera de Uruguay para el año 2014. Universidad de Montevideo. Retrieved from [http://www.um.edu.uy/docs/CINOI\\_2016\\_Informe\\_Estudio\\_Inventario\\_GEI.pdf](http://www.um.edu.uy/docs/CINOI_2016_Informe_Estudio_Inventario_GEI.pdf)
- Chaglla Cango, M. T., y Pico Pérez, P. E. (2017). Estudio de las emisiones directas e indirectas de los gases de efecto invernadero (GEI) en los terminales terrestres de la ciudad de Riobamba. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/26332/1/BQ133.pdf>
- Córdova, M., Cordova, D., Alvarez, F. C., Chaglla, M. T., Pico, P. E., & Pérez, L. V. (2017). Carbon footprints in Ecuador: Case of Riobamba city's bus stations. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. (Vol. 151, No. 1, p. 012001). IOP Publishing.
- Córdova, G., & Maritza, V. (2013). Inventario Nacional de emisiones de gases de efecto invernadero en el sector transporte al 2012. Universidad Central Del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1860/1/T-UCE-0017-43.pdf>
- Davila, F., & Varela, D. (2014). Determinación de la Huella de Carbono de la Universidad Politecnica Salesiana, sede Quito, Campus Sur. Año Base 2012. Revista La Granja. Volumen 21 (1). <https://doi.org/10.17163/igr.n21.2015.03>
- Fuel Institute. (2013). Fuel Quality Councition Worldwide Fuel Charter.
- Garzón, E. M. G. (2012). Análisis mercado de carbono en el ecuador. Observatorio de la Economía Latinoamericana, (168)
- Globalmethane. (2008). La importancia del metano y las actividades de reducción de sus emisiones. Retrieved from [https://www.globalmethane.org/documents/methane\\_fs\\_spa.pdf](https://www.globalmethane.org/documents/methane_fs_spa.pdf)
- Gobierno de España. (2014). Banco Público De Indicadores Ambientales, 3.
- IDEAM, D. (2010). Segunda Comunicación Nacional Ante La Convención Marco De Las Naciones Unidas Sobre Cambio Climatico. Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero (p. 34).
- IPCC. (2006a). Combustión Estacionaria. Reino Unido Branca B. Americano (Brasil), 47. Retrieved from [http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/spanish/pdf/2\\_Volume2/V2\\_2\\_Ch2\\_Stationary\\_Combustion.pdf](http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/spanish/pdf/2_Volume2/V2_2_Ch2_Stationary_Combustion.pdf)
- IPCC. (2006b). Combustión Móvil. Oswaldo Lucon (Brasil) (Vol. 2). Retrieved from <http://www.ipcc->

- [nggip.iges.or.jp/public/2006gl/spanish/pdf/2\\_Volume2/V2\\_3\\_Ch3\\_Mobile\\_Combustion.pdf](http://nggip.iges.or.jp/public/2006gl/spanish/pdf/2_Volume2/V2_3_Ch3_Mobile_Combustion.pdf)
- Lazos- Ruiz Adi, Moreno-Casasola, P., Guevara S., S., Gallardo, C., & Galante, E. (2016). El uso de los árboles en Jamapa, tradiciones en un territorio deforestado. *Madera y Bosques*, 22(1), 17–36. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-04712016000100017](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712016000100017)
- Lipman, T. E., & Delucchi, M. A. (2002). Emissions of nitrous oxide and methane from conventional and alternative fuel motor vehicles. *Climatic Change*, 53(4), 477-516.
- Miralles-Guasch, C. (2012). Las encuestas de movilidad y los referentes ambientales de los transportes. *EURE (Santiago)*, 38(115), 33–45. <https://doi.org/10.4067/S0250-71612012000300002>
- Naciones Unidas. (2014). Iniciativas para reducir las emisiones de carbono del transporte. Retrieved from <https://news.un.org/es/story/2014/09/1312221>
- Navarro, J. (2008). El crecimiento de los niveles de metano causa preocupación. Retrieved from <http://www.cambioclimatico.org/content/el-crecimiento-de-los-niveles-de-metano-causa-preocupacion>
- Panadero, J. (2012). Análisis de normativas de emisiones por países y continentes. *Tecmovia*. Retrieved from <https://www.diarimotor.com/tecmovia/2012/07/15/analisis-de-normativas-de-emisiones-por-paises-y-continentes/>
- Quintero, M. L. R. R. C. (2013). Marco de análisis del mecanismo de desarrollo limpio y las oportunidades del mercado del carbono para el desarrollo de Colombia. *Producción Más Limpia*, 8(1), 48–79. Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/439>
- Sánchez, L., y Reyes, O. (2015). Medidas de adaptación y mitigación frente al cambio climático en América Latina y el Caribe: Una revisión general. *Estudios Del Cambio Climático En América Latina*. Retrieved from <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/39781>
- Sánchez Carreira, M. D. C., y Varela Vázquez, P. (2014). Estado de desarrollo del sector de la energía eólica en Galicia desde una perspectiva de clúster. *Revista Galega de Economía*, 23(1), 53–78. Retrieved from <http://www.usc.es/econo/RGE/Vol23/rge2313c.pdf>
- Toledano, D. S., Díaz, D. C., y Toledano, J. S. (2014). Observatorio de Costes y Financiación del Transporte Urbano Colectivo: Un programa de investigación. *Investigaciones Europeas de Dirección Y Economía de La Empresa*, 20(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.iiedee.2013.05.001>
- Unión Europea. (2018). Las normas euro de control de emisiones contaminantes. Retrieved from [https://europa.eu/european-union/index\\_es](https://europa.eu/european-union/index_es)

## ESTABILIDAD DE LA ENZIMA Cu-Zn SUPERÓXIDO DISMUTASA INMOVILIZADA EN NANOSFERAS 100 PARA UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA

### Cu-Zn SUPEROXIDE DISMUTASE STABILITY ON IMMOBILIZED NANOPARTICLES AS AN ALTERNATIVE FOR A NEW COSMETIC FORMULATION

D. Fernández<sup>1</sup>, A. Fernández<sup>2</sup>, Y. Gelabert<sup>3</sup>, C. Pino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador

<sup>2</sup> Investigador Independiente

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas, Cuba

*Artículo recibido: 07/05/2018*

*Artículo aceptado: 28/02/2019*

#### RESUMEN

Se realizó un estudio de estabilidad de tres formulaciones cosméticas F-1, F-2 y F-3 que se obtuvieron con la adición de cera de abeja, ácido esteárico y trietanolamina respectivamente, como agentes emulsificantes. Se utilizó como principio activo la enzima CuZn – Superóxido Dismutasa (CuZn-SOD) proveniente de eritrocitos humanos, inmovilizada en las Nanosferas 100 (CuZn-SOD-N100), sistema matricial de liberación controlada.

Se analizó la influencia que ejerce la temperatura y la incidencia de la luz sobre la actividad de la enzima inmovilizada. El producto muestreado fue ensayado de acuerdo con el cronograma de ensayos de estabilidad en los tiempos 0, 30, 60 y 90 días. Se demostró que los factores analizados influyen notablemente sobre la estabilidad de la CuZn-SOD-N100, siendo la formulación 3 la más estable a la temperatura de refrigeración y estufa, pero no a la incidencia de la luz, donde la formulación 2 es la más resistente a la fotooxidación.

**Palabras claves:** CuZn – Superóxido Dismutasa, estudio de estabilidad, sistema matricial de liberación controlada, Nanosferas 100.

#### ABSTRACT

A stability study of three cosmetic formulations F-1, F-2 and F-3 was carried out, which were obtained with the addition of beeswax, stearic acid and triethanolamine respectively, as emulsifying agents. The enzyme CuZn - Superoxide Dismutase (CuZn-SOD) from human erythrocytes, immobilized in the Nanospheres 100 (CuZn-SOD-N100), controlled-release matrix system, was used as an active principle.

The influence exerted by temperature and the incidence of light on the activity of the immobilized enzyme was analyzed. The sampled product was tested according to the stability test schedule at times 0, 30, 60 and 90 days. It was demonstrated that the factors analyzed significantly influence the stability of CuZn-SOD-N100, with Formulation 3 being the most stable at the refrigeration and stove temperature, but not at the incidence of light, where formulation 2 is the more resistant to photooxidation.

**Keywords:** CuZn - Superoxide Dismutase, Stability study, controlled release matrix system, Nanospheres 100



## 1. INTRODUCCIÓN

La Industria cosmética ha desempeñado un papel importante en el cuidado, conservación y apariencia del cuerpo humano. En la actualidad los productos cosméticos se enfocan a la protección de la piel cuando está expuesta a agresiones externas, fundamentalmente la luz solar, cuyo signo vital es el envejecimiento cutáneo.

Numerosos han sido los principios activos obtenidos de diversas fuentes que se han utilizado para la protección y reparación de la piel envejecida, entre ellos tenemos, la elaboración de cremas faciales con extractos de aceites obtenidos de plantas como: *Mauritua flexuosa* (Morete), *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi) y *Oenocarpus bataua* (Ungurahua) (Mosquera Tayupanta, Noriega, Tapia, & H Pérez, 2012).

Los superóxidos dismutasas (SOD) son enzimas con características antioxidantes debido a sus propiedades como atrapador de aniones superóxidos, tienen un importante rol en la protección antioxidante de muchas especies reactivas del oxígeno, de ahí su utilización en el diagnóstico y la terapia de diversas enfermedades, así como en la cosmética para la formulación de protectores solares y cremas antiacné.

Fue demostrada por de la Luz Romero-Tejeda, Martínez-Damián, & Rodríguez-Pérez (2015) la importancia que presentan los estudios de estabilidad para predecir las condiciones de almacenamiento

de un producto, ya que existió una disminución de la actividad de la enzima SOD en la planta de salvia (*Salvia officinalis* L.) a los 9 días de permanecer en refrigeración, siendo esta planta utilizada en la industria alimentaria y cosmética.

Durante las últimas décadas se ha enfatizado en el desarrollo de nuevos sistemas de inmovilización que permitan prolongar el tiempo de vida de una sustancia, con el objetivo de mejorar su eficacia. Los sistemas más utilizados para controlar la liberación de los principios activos son los sistemas de microencapsulación y los de secuestro o matriciales.

Para aumentar la actividad de la enzima SOD fueron sintetizadas y caracterizadas por Yang, Jiang, Pan y Zhou (2015), nanopartículas de sílice que contienen magnesio. Además, se utilizaron Nanosferas por Nair, Al-Dhubiab, Shan, Attimarad y Harsha (2017), para aumentar la disponibilidad oral del fármaco Candesartan Cilexetil.

En este trabajo se realizó una formulación dermocosmética, cuyo principio activo fue la Cobre Zinc-Superóxido Dismutasa (CuZn-SOD) inmovilizada en Nanosferas 100, un sistema de partículas del orden de los nanómetros. Se realizó un estudio de estabilidad en vida de anaquel con el objetivo de determinar la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la actividad biológica de la enzima CuZn-SOD inmovilizada en Nanosferas 100.

**Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética**

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

Termómetro digital de vástago largo, intervalo: de - 50 °C a 150 °C (Fisherbrand™).

Frascos de polipropileno, volumen de 30 mL (Thermo Scientific™ Nalgene).

Frascos transparentes de boca ancha estándar con tapón de espuma de polipropileno, volumen de 30 mL (Fisherbrand™).

Frascos ámbar de boca ancha con tapones de polipropileno, volumen de 30 mL (Fisherbrand™).

Inmovilizado de CuZn-SOD purificada de eritrocitos humanos en una suspensión de Nanosferas 100 con un rendimiento en la adsorción del 66%. (Centro de Investigaciones Biomédicas, Cuba).

### 2.2. Equipos

Balanza técnica Yamato.

Balanza analítica Sartorius.

Estufa Fischer.

Centrifuga SIGMA 201 m B-Braun.

Viscosímetro rotatorio Haake modelo V-20.

Refrigerador Haier.

### 2.3. Metodología

Se formularon las cremas siguiendo el siguiente procedimiento: Primeramente, se calentó la fase acuosa hasta alcanzar la temperatura de 70 °C, después se adicionó la fase oleosa con agitación constante

y cuando la temperatura fue menor a 50 °C se adicionó el preservo, y finalmente el principio activo CuZn-SOD inmovilizado en Nanosferas 100 (CuZn-SOD-N100) a temperaturas menores de 37 °C.

Las formulaciones F-1, F-2 y F-3 se obtuvieron con la adición de cera de abeja, ácido esteárico y trietanolamina respectivamente como agentes emulsificantes.

El estudio estabilidad se realizó para las formulaciones a las temperaturas: ambiente (30°C ± 2°C), refrigeración (5°C ± 3°C) y estufa (40± 2°C), de acuerdo con la ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (ICH Q1A, 2003). Para la temperatura ambiente se analizaron las condiciones de luz y oscuridad, envasándose las formulaciones en frascos transparentes y ámbar.

Fue determinada la actividad biológica de la enzima en los tiempos 0, 30, 60 y 90 días, de acuerdo con el Cronograma de Ensayos de Estabilidad, para verificar la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la actividad de la enzima en las formulaciones cosméticas.

### 2.4. Técnica analítica utilizada

Actividad enzimática de la CuZn-SOD: Se realizó por un método indirecto basado en la capacidad de esta enzima para inhibir la reacción de autoxidación del pirogalol. Es un ensayo cinético que transcurre durante 1 minuto a pH 8.20. Para el cálculo de la actividad se tuvo en cuenta que una unidad de actividad enzimática

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

(UAE) es capaz de inhibir el 50% de la autoxidación del pirogalol (Marklund, Marklund, 1974).

Para las formulaciones cosméticas, las unidades se expresaron en UT (Unidades Totales): unidades de actividad enzimática de CuZn-SOD-N 100 por gramo de crema (U/g).

A partir de las medias de las UT, se calculó el porcentaje de actividad residual (%A.R):

$$\% A.R = \frac{UT_i}{UT_0} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

% AR: Porcentaje de actividad residual (%).

UT<sub>i</sub>: Actividad enzimática en los tiempos 30, 60 y 90 días.

UT<sub>0</sub>: Actividad enzimática a tiempo cero.

Se graficó el logaritmo del porcentaje de actividad residual contra el tiempo, obteniéndose tres rectas correspondientes a cada formulación cosmética.

### 2.5. Análisis estadístico de los resultados

Con el empleo del análisis de regresión y correlación lineal, a través del

programa “Statistic”, fue calculada la pendiente de la recta que es igual a la constante de inactivación de la enzima (Kinact).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos de las velocidades de inactivación para las formulaciones con la CuZn-SOD no inmovilizada. La actividad enzimática disminuyó hasta las 6 horas, presentando la enzima en la formulación F-1 un valor mayor de velocidad de inactivación respecto a las formulaciones F-2 y F-3. La enzima sufrió una inactivación total en las tres formulaciones después de las 6 horas de su conservación. En las cremas formuladas con la enzima inmovilizada se obtuvieron valores de actividad enzimática hasta los 90 días, excepto en la formulación F-1 en la condición de estufa donde existió una pérdida total de la actividad enzimática debido a la alta temperatura de conservación que provocó una desnaturalización de la enzima, resultando en una pérdida de la actividad biológica. Este comportamiento se corrobora con lo obtenido al inmovilizar la SOD con diatomita modificada con quitosano que mejora la estabilidad con la conservación y la estabilidad térmica (Song, Zhang, Song y Liu, 2013).

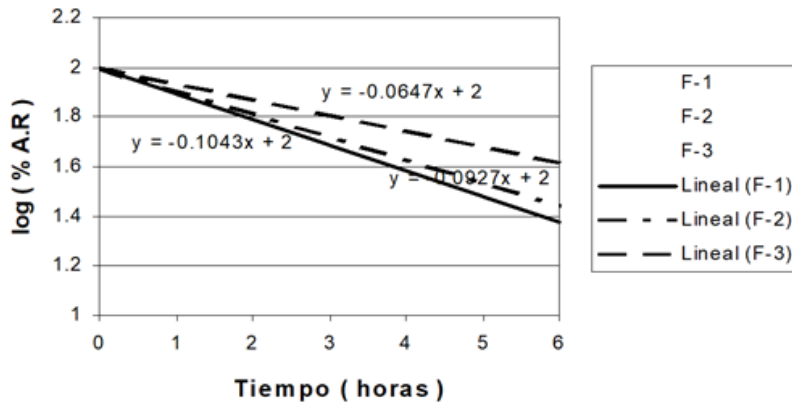


Figura 1. Actividad de la CuZn-SOD en las formulaciones.

La Figura 2, muestra los valores del por ciento de actividad residual en el tiempo, para las formulaciones conservadas en refrigeración. La formulación F-3 presentó el menor valor de  $K_{inact}$ . ( $K_{inact}=0.0008$ ), siendo la F-1 la de mayor  $K_{inact}$  ( $K_{inact}=0.0047$ ), esto refleja que la CuZn-SOD es más inestable en esta

base formulada utilizando cera de abeja como emulsificante, esto puede ser debido a que está compuesta por una variedad de compuestos químicos como peróxidos, hidrocarburos, monoésteres (Borges, 2008), que pueden reaccionar con los compuestos de la formulación causando inestabilidad en esta.

5a. T = 11 °C

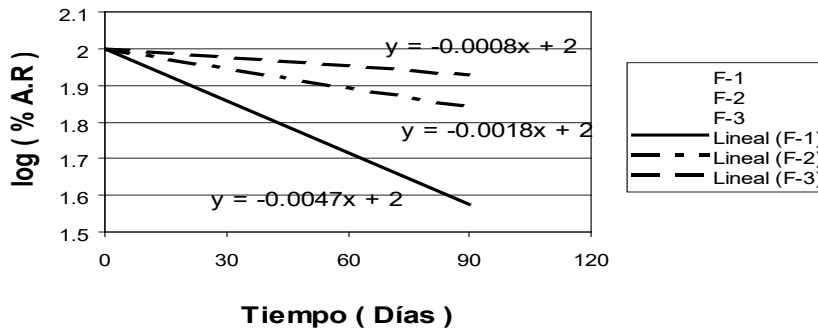


Figura 2. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en refrigeración.

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

De las muestras conservadas a temperatura ambiente, el menor valor de Kinact. lo obtuvo la formulación

F-2 (Kinact. = 0.0023), por lo tanto, la enzima es más estable en esta formulación que en las bases 1 y 3.

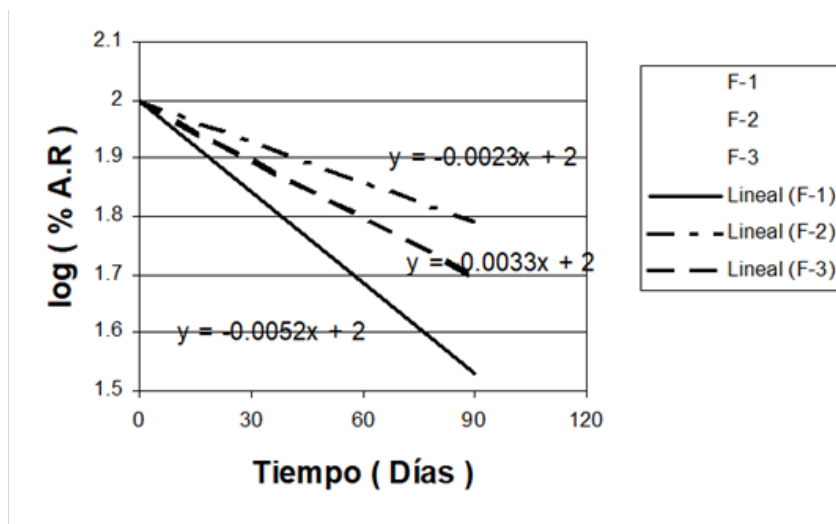


Figura 3. Actividad de la CuZn-SOD-N100 a la temperatura ambiente.

La formulación F-2 presentó como agente emulsificante el ácido esteárico, este ha sido utilizado para formar emulsiones con la trietanolamina logrando obtener un sistema de emulsión óptimo para incorporar al econazol un principio activo liposoluble (Lillini, Pasquali,

Pedemonte, Bregni y Lavaselli, 2016).

De las formulaciones conservadas en la estufa, se encontró la formulación F-3 como la de menor valor de Kinact. (Kinact.= 0.0015), siendo la formulación F-1, la de mayor velocidad de inactivación (Kinact. = 0.0072).

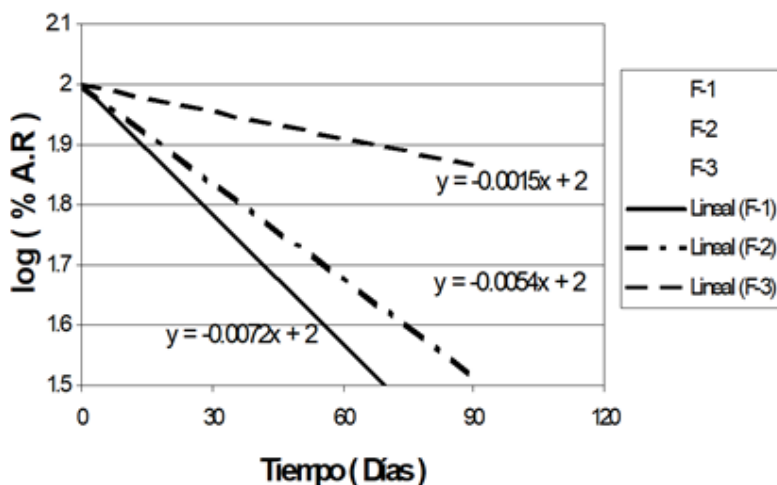


Figura 4. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en la estufa

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

Este comportamiento pudiera estar relacionado con la afectación del sitio activo de la SOD o con la pérdida de los iones cobres que son necesarios para la acción catalítica. Además, las temperaturas elevadas no son favorables para la enzima inmovilizada, pues provocaría la liberación de la CuZn-SOD de las Nanosferas 100.

En la base 1 fue donde la enzima sufrió mayor degradación debido a la

influencia de la luz, un comportamiento muy similar al encontrado en las tres condiciones de temperatura para esta enzima, indicando que la cera de abeja empleada como agente emulsificante no fue efectiva ya que existió pérdida de la estabilidad de la enzima.

La enzima en la base 2 presentó el menor valor de la constante de inactivación, a pesar de la incidencia de la luz.

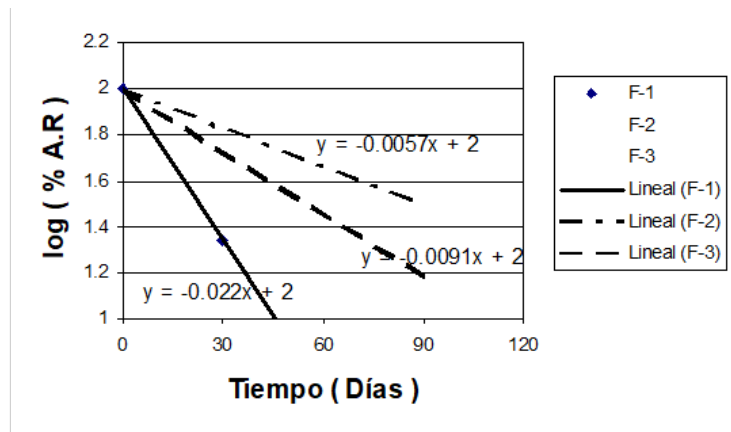


Figura 5. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en presencia de la luz

La enzima en la base 3 (Kinact.=0.0005) tuvo el menor valor de velocidad de inactivación en la condición de

oscuridad, lo que indica que la F-.3 debe envasarse en un frasco que proteja de la luz.

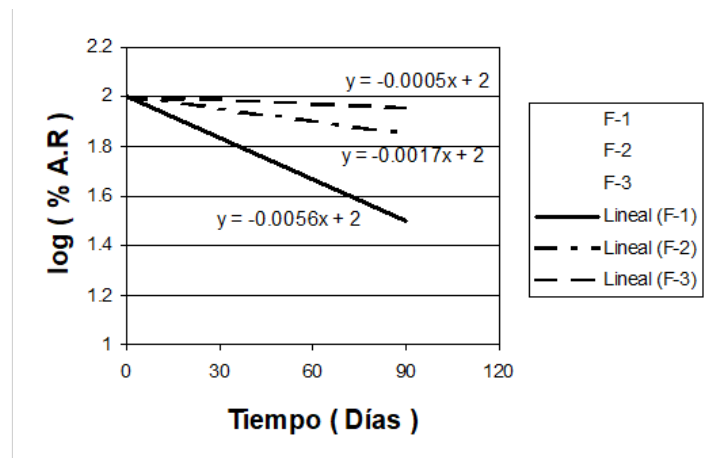


Figura 6. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en presencia de la oscuridad

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

La presencia de la luz provoca reacciones de fotooxidación generándose especies reactivas de oxígeno, estos pueden reaccionar con los ácidos grasos insaturados (componentes de la fase oleosa de las formulaciones), provocando su oxidación, y afectando el resto de los componentes de la formulación y del inmovilizado de CuZn-SOD.

#### 4. CONCLUSIONES

La CuZn-SOD debe estar inmovilizada en las Nanosferas 100, pues de esta forma mantiene su estabilidad en las formulaciones por más tiempo respecto a la enzima no inmovilizada. La temperatura de almacenamiento influyó sobre la velocidad de inactivación de la CuZn-SOD-N100, siendo la enzima más estable a las temperaturas de refrigeración y estufa en la formulación donde se utilizó trietanolamina, mientras que la enzima formulada con ácido esteárico presentó mayor estabilidad a la fotooxidación.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borges, D. (2006). Cera de abejas. Revista Asociación Cubana de Producción Animal. (Vol. 2): 41-43
- ICH. (2003). Stability Testing of new Drug Substances and Products. ICH Topic Q 1 A (R2). (February).
- Lillini, G., Pasquali, R., Pedemonte, C., Bregni, C. y Lavaselli, S. (2016). Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas, y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol. Rev. Colomb.Quím. Farm, 45(1), 5–20. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n1.58011>
- Marklund, S., y Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47(3), 469–474.
- Mosquera Tayupanta, T., Noriega, P., Tapia, W. y H Pérez, S. (2012). Evaluación de la eficacia cosmética de cremas elaboradas con aceites extraídos de especies vegetales amazónicas: *Mauritia flexuosa* (Morete), *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi) Y *Oenocarpus bataua* (Ungurahua). La Granja (Vol. 16). <https://doi.org/10.17163/lgr.n16>
- Nair, A. B., Al-Dhubiab, B. E., Shah, J., Attimarad, M., y Harsha, S. (2017). Poly(Lactic acid-co-glycolic acid) nanospheres improved the oral delivery of Candesartan Cilexetil. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 51(4), 571–579. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.4.86>
- Romero-Tejeda, M., Martínez-Damián, M. y Rodríguez-Pérez, J. (2015). Effect of storage temperature on enzyme activity and antioxidant capacity in *Salvia officinalis* L. Shoots. Revista Chapingo Serie Horticultura (Vol. XXI). <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.01.003>
- Song, C., Zhang, Q., L. Song, S. y Liu, X.

**Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética**

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

(2014). Optimization of superoxide dismutase immobilization carrier and the study on enzymatic properties. WIT Transactions on Ecology and the Environment (Vol. 189). <https://doi.org/10.2495/ICESEP131241>

Yang, M., Jiang, W., Pan, Z. y Zhou, H. (2015). Synthesis, Characterization and SOD-Like Activity of Histidine Immobilized Silica Nanoparticles. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 25(5), 1289–1297. <https://doi.org/10.1007/s10904-015-0239-9>

**Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética**

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation



# ALIMENTOS, CIENCIA E INGENIERÍA

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

## GUÍA PARA AUTORES (v.10)

### *Tipos de publicaciones*

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

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

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

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

*Cartas al Director*, en las que se manifiesten críticas, análisis y/o interpretaciones sobre trabajos publicados en la revista que, a juicio

del Comité Editorial, complementen y enriquezcan la discusión sobre las temáticas abordadas, de **750 palabras** de extensión máxima (aproximadamente 2 hojas).

### *Principios generales*

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

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

Los trabajos deberán ser originales e inéditos, no haberse enviado previa o simultáneamente a otra publicación, sea en formato papel o electrónica, y cumplir con todas las especificaciones de estilo descritas

en el documento Guía para Autores para que sean aceptados. Todas las referencias a trabajos ajenos, han de ser convenientemente expresadas de forma implícita o explícita, reduciendo al mínimo las citas textuales. Se considerará autoplagio la copia textual o duplicación de material de trabajos previos de los autores sin una indicación clara del origen del mismo.

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

### ***Proceso editorial***

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

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

Si el resultado de la corrección es a satisfacción del Editor, será aceptado

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

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

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

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

<b>Cita directa o explícita:</b> (Llerena et al., 2014)
<b>Cita</b>
<b>indirecta o implícita:</b> Llerena et al. (2014)
<b>Referencia bibliográfica (estilo APA 6ª Ed.):</b>
Llerena, W., Samaniego, I., Ramos, M., y Brito, B. (2014). Caracterización físico-química y funcional de seis frutas tropicales y andinas ecuatorianas. <i>Alimentos Ciencia e Ingeniería</i> , 22(2), 13-22.

### ***Formato***

El artículo deberá ser remitido en

formato electrónico, por correo electrónico o correo postal adjuntando CD-ROM o medio de almacenamiento digital análogo, editable mediante software de procesado de texto, preferentemente Microsoft Word o similar, con la siguiente configuración de página:

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

En el correo electrónico o CD-ROM deberán entregarse las tablas y figuras incluidas en cada artículo en sus formatos nativos originales (Excel, Powerpoint, etc.), de manera que puedan ser editadas durante el proceso de maquetación, debiendo estar numeradas de la misma forma en que aparecen en el artículo.

### **Contenido de los artículos de investigación**

#### **• Primera página**

##### **1. Título**

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

##### **2. Autores**

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

##### **3. Resumen/Abstract**

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

##### **4. Palabras clave/Keywords**

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

#### **• Estructura del trabajo**

El trabajo se escribirá en texto a columna simple, tamaño Times New

Roman 12, justificado. Las secciones se subdividirán, en caso necesario, mediante esquema numerado (1.1, 1.1.1, 1.1.1.1; 1.2, etc.), debiendo las siguientes **secciones**:

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

1. Introducción, en la que se justificará la motivación que ha llevado a los autores a emprender la investigación y los objetivos perseguidos. Aportará una adecuada base de conocimiento sobre el tema estudiado, evitando extenderse en la descripción de las referencias y la discusión sobre las mismas.
2. Material y métodos utilizados en la investigación, describiendo todo de forma tal que el lector pueda ser capaz de entender completamente o replicar las condiciones experimentales bajo las cuales han trabajado los autores. A este respecto, es necesario mencionar marca y modelo de los principales equipos utilizados y referenciar de forma precisa las técnicas analíticas empleadas, de preferencia, optando por normas estandarizadas y reconocidas en el ámbito internacional, salvo cuando los métodos hayan sido publicados con anterioridad, en cuyo caso, se mencionarán como referencia, describiendo únicamente las modificaciones sustanciales. Se pide a los autores describir adecuadamente el diseño experimental elegido, las

herramientas matemáticas y estadísticas utilizadas y el empleo de unidades de medida y notación del Sistema Internacional, así como adherirse a las normas internacionales de nomenclatura binomial de plantas y animales y hacer uso de abreviaturas previamente explicadas en el texto.

3. Resultados y discusión de los mismos, aportando las tablas, figuras, gráficos y diagramas que sean necesarias. Los resultados serán claros y concisos. Todo aporte de información original por parte de los autores deberá ser contrastado, en la medida de lo posible, con referencias a otros autores, explicando el significado que la nueva información supone dentro del contexto científico-técnico en el que se sitúa el artículo. La mera descripción numérica o textual de los resultados, dejada a libre interpretación del lector, no será considerada aceptable por el Comité Editorial en ningún caso.
4. Conclusiones, en las que se resuman los principales resultados obtenidos en la investigación. Esta sección, podrá tener entidad propia o integrarse dentro de la sección precedente.

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

manuscrito o aportando su opinión crítica.

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

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

1. Tablas: se proporcionarán aparte del texto principal y numerarán en Times New Roman 10, en la parte superior, de forma correlativa (Tabla 1, Tabla 2, etc.) según se vayan citando en el texto. Cada tabla deberá venir acompañada, a continuación de su numeración, de un título adecuadamente

informativo, aportando las condiciones experimentales si es necesario, de forma que el lector no tenga la necesidad de referirse al texto para entender el contenido de la tabla (**autoexplicativa**). Los autores podrán utilizar notas al pie de las tablas para aclarar cualquier información o abreviatura utilizada, empleando para ello superíndices. Los autores deberán asegurarse de que la información ofrecida por las tablas no duplica la ofrecida por las figuras y viceversa. Al aportar información analítica, los autores deberán especificar los valores promedio y estadísticos de variabilidad de los datos (desviación típica, error estándar, coeficiente de variación, etc.), además del número de réplicas llevadas a cabo en cada determinación. Las probabilidades se indicarán mediante la siguiente convención: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$ . El texto dentro de las tablas será Times New Roman 10. Se recomienda emplear las herramientas de formato propias del procesador de textos Microsoft Word para crear las tablas. La inserción de tablas en formato gráfico (JPEG, TIFF etc.) está fuertemente desaconsejada, por no permitir la correcta edición de las mismas en la versión final de la revista.

2. Figuras: se proporcionarán aparte del texto principal y numerarán, en Times New Roman 10, en la parte inferior, fuera de la propia figura, de forma correlativa (Figura 1, Figura 2, etc.) según se vayan citando en el texto. Cada figura deberá

venir acompañada, a continuación de su numeración, de un título adecuadamente informativo, de forma que el lector no tenga la necesidad de referirse al texto para entender el contenido de la figura (autoexplicativa). Las figuras han de ser presentadas en formatos gráficos de adecuada calidad, como JPEG (con compresión no superior al 80%) o TIFF. Los formatos optimizados para presentación en pantalla (GIF, BMP, PICT, etc.) no ofrecen suficiente calidad para la impresión en formato papel, por lo que ha de evitarse su uso. Se recomienda, para elementos a color, una resolución mínima de 300 ppp (píxeles por pulgada), para medios tonos o escala de grises, una resolución mínima de 500 ppp y para elementos bitmap (blanco/negro) una resolución mínima de 1000 ppp. La revista se publica en formato digital a color pero, dado que la versión impresa de la revista se edita en blanco y negro, se recomienda a los autores elaborar las figuras de forma que sigan siendo comprensibles en la gama de tonalidades de escala de grises, maximizando el contraste de los elementos gráficos, empleando símbolos claramente diferenciados, etc.

3. Ecuaciones: se intercalarán en el texto principal a medida que sea necesario, numerándose de forma correlativa mediante la notación Ecuación 1, Ecuación 2, etc. Para su incorporación al texto, se aconseja el uso del editor de ecuaciones del procesador de textos Microsoft Word o análogo

(MathType, LaTeX, etc.). Todos los términos de cada ecuación deberán ser explicados convenientemente, incluyendo las unidades de cada término.

### **Contenido de trabajos diferentes a los artículos de investigación**

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





UNIVERSIDAD  
TÉCNICA DE AMBATO