

Extracción enzimática y análisis cualitativo del jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)

Jorge Alfredo Cardona Ponce

ZAMORANO
Carrera de Agroindustria
Diciembre, 2005

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Extracción enzimática y análisis cualitativo del jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.)

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniería en Agroindustria
en el grado de Licenciatura

Presentado por

Jorge Alfredo Cardona Ponce

Honduras
Diciembre, 2005

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reserva el derecho de autor.

Jorge Alfredo Cardona Ponce

Honduras
Diciembre, 2005

**Extracción enzimática y análisis cualitativo del jugo de açai
(*Euterpe oleracea* Mart.)**

Presentado por:

Jorge Alfredo Cardona Ponce

Aprobado:

Julio R. López, M.Sc.
Asesor principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Odilo Duarte, Dr.Sci.Agr., M.B.A.
Asesor

Kenneth Hoadley, D.B.A.
Rector

Stephen Talcott, Ph.D.
Asesor externo

DEDICATORIA

A Dios por estar iluminando mi camino siempre.

A mi familia (Fernando, Susana y Diego) por creer en mí y darme la oportunidad y las fuerzas para seguir adelante.

A mi Tío Coco que fue una gran persona, un ejemplo a seguir y que ahora me acompaña siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por darme las herramientas para lograr éxito en la vida.

Al Ing. Julio López por su paciencia, confianza y apoyo en todo el proceso del presente trabajo.

Al Dr. Espinal por su amistad, confianza y apoyo en mis años en la carrera de Agroindustria

Al Dr. Talcott que no sólo me dió la oportunidad de trabajar con él y aprender mucho sobre investigación de frutas sino también por ser un gran apoyo y guía en la realización de los experimentos de esta tesis

Al Dr. Bueso y al Dr. Duarte por sus valiosos consejos y el apoyo al realizar este proyecto de graduación.

A Thelma, Rolan y muchos otros compañeros que aguantaron frustraciones y apoyaron en el transcurso de este proyecto.

En general a la clase 05 por todos los momentos compartidos, muchas gracias!

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A Zamorano por la beca parcial otorgada.

Al departamento de Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana (FSHN) de la Universidad de Florida por los fondos y equipo brindado para la realización de este estudio.

RESUMEN

Cardona J. 2005 Extracción enzimática y análisis cualitativo del jugo de açái (*Euterpe oleracea* Mart.). Proyecto especial del Programa de Ingeniería Agroindustrial. Zamorano, Honduras. 31 p.

El açái (*Euterpe oleracea* Mart.) es una fruta que ha venido ganando bastante importancia debido a sus componentes altamente nutritivos y a su potencial nutracéutico. El proceso de extracción enzimática es considerado beneficioso y mejor que el proceso térmico-mecánico en varias frutas. El objetivo de este estudio fue incrementar el porcentaje de extracción de jugo de la pulpa de açái a través de tratamientos enzimáticos y medir la reducción de las cualidades en lo que a polifenoles se refiere. Los experimentos se realizaron en el Departamento de Ciencia de alimentos y Nutrición Humana (FSHN) de la Universidad de Florida. Se utilizaron tratamientos de celulasa (C), pectinasa (P), una combinación de ambas (PC) y un testigo (B) de pulpa de açái expuesta únicamente a temperatura. Se incubaron las muestras (25 U/mL) de puré con enzimas por 0, 15, 30, 60 y 120 min a la temperatura óptima de cada enzima. 25°C (P), 31°C (B) y (PC) y 37°C (C). Debido al poco daño causado por las enzimas en los factores cualitativos (capacidad antioxidante, concentración de antocianinas y fenoles solubles totales), se procedió a duplicar los tiempos de incubación a 0, 1, 2, 3 y 4 horas, y la concentración enzimática (50 U/mL) para evaluar cambios negativos en la calidad del jugo. Se midió el porcentaje de extracción de jugo, concentración de antocianinas, capacidad antioxidante y fenoles solubles totales. Los tratamientos enzimáticos tuvieron un efecto directo en la extracción de jugo. El incremento en extracción de jugo tuvo una tendencia logarítmica porque al duplicar la dosis de tiempo y concentración enzimática, el porcentaje de jugo extraído no aumentó a la misma tasa. La aplicación de celulasa a 50 U/mL durante 4 horas produjo el mayor porcentaje de jugo (33.64%) sin dañar la capacidad antioxidante o el color de las muestras.

Palabras clave: Açái, celulasa, porcentaje de extracción, capacidad antioxidante.

CONTENIDO

Portada.....	i
Portadilla.....	ii
Hoja de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimiento a patrocinadores	vi
Resumen	vii
Contenido	viii
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 Objetivo general	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
1.2 ALCANCES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	2
1.2.1 Alcances	2
1.2.2 Limitaciones	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 CONTEXTO GENERAL.....	3
2.2 AÇAÍ	3
2.2.1 Beneficios a la salud.....	4
2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	5
2.4 EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA EN JUGOS DE FRUTAS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1 UBICACIÓN.....	8
3.2 MATERIALES.....	8
3.3 EQUIPOS	9
3.4 MÉTODOS.....	9
3.4.1 Diseño experimental.....	9
3.4.2 Producción de jugo.....	9
3.4.3 Pérdida de color (calidad) en el jugo.....	10
3.4.4 Capacidad antioxidante (Método ORAC)	10
3.4.5 Fenoles Solubles Totales (Método Folin-Ciocalteu).....	10

3.4.6	Análisis cualitativo de antocianinas	10
3.4.7	Análisis estadístico	11
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1	PRIMER ENSAYO.....	12
4.1.1	Incremento en la producción de jugo	12
4.1.2	Perdida de color	13
4.1.3	Capacidad Antioxidante	14
4.1.4	Fenoles Solubles Totales	16
4.2	SEGUNDO ENSAYO.....	16
4.2.1	Incremento en la producción de jugo	17
4.2.2	Perdida de color	18
4.2.3	Capacidad Antioxidante	19
4.2.4	Análisis cualitativo de antocianinas	20
5.	CONCLUSIONES.....	23
6.	RECOMENDACIONES.....	24
7.	BIBLIOGRAFIA.....	25
8.	ANEXOS	27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Caracterización físico-química de la pulpa de açai.	4
2.	Contenido de polifenoles y antocianinas (mg/L pulpa fresca) en Açai (Euterpe oleracea Mart.).....	5
3.	Efecto del tratamiento con pectinasa y celulasa en el porcentaje de recuperación de jugo en tandas de residuo de piña (g/100g de pulpa fresca).	7
4.	Efecto de tratamientos enzimáticos en el rendimiento de extracción, concentración de antocianinas, capacidad antioxidante y fenoles solubles totales del jugo de açai. Primer ensayo.	12
5.	Efecto de tratamientos enzimáticos en el rendimiento de extracción, concentración de antocianinas y capacidad antioxidante del jugo de açai. Segundo ensayo.	17
6.	Integraciones de área bajo la curva del HPLC para el tratamiento con celulasa y el testigo de 0, 2 y 4 horas (mg/L de jugo de açai).....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Porcentaje de recuperación de jugo por medio de centrifugación después de 2 horas (ENSAYO 1).....	13
2.	Porcentaje de antocianinas en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 1)	14
3.	Porcentaje de μmol de Trolox en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 1).	15
4.	Porcentaje de la concentración de polifenoles en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 1).....	16
5.	Porcentaje de recuperación de jugo después de 4 horas (ENSAYO 2)	18
6.	Porcentaje de antocianinas en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 2)	19
7.	Porcentaje de μmol de Trolox en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 2)	20
8.	Cromatograma de antocianinas de açai (Control y Celulasa a las 0 horas).....	20
9.	Cromatograma de antocianinas de açai (Testigo y Celulasa a las 2 horas).	21
10.	Cromatograma de antocianinas de açai (Testigo y Celulasa a las 4 horas).	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Ilustraciones de Açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	28
2.	Ficha Técnica de las enzimas.	29
3.	Cálculos para la preparación de las muestras.	30
4.	Flujo de proceso general de inoculación y baño maría.	31

1. INTRODUCCIÓN

El Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) es una fruta tropical altamente consumida en el Brasil, específicamente en el noreste. Últimamente y gracias a su contenido nutricional, el açaí ha tomado gran importancia en mercados extranjeros especialmente en los Estados Unidos.

Esta fruta ha sido y es consumida por los habitantes de la amazonía y representa una fuente importante de nutrientes en las dietas de algunas poblaciones Caboclo (Rogez, 2000). Además se utiliza la nuez del açaí para algunas decoraciones y joyería de la zona.

Existen diversos productos hechos a bases de açaí que van desde productos en polvo, pastillas, hasta jugos de frutas tropicales. (Del Pozo *et al*, 2004).

No se ha podido encontrar mucha información respecto a tratamientos enzimáticos aplicados a esta fruta, pero diversos estudios demuestran las bondades en la relación entre frutas y enzimas.

El presente estudio es uno de los primeros pasos en una gran investigación que está empezando a desarrollarse en el mercado estadounidense para sacar al mercado más productos nutricionales y de alguna manera encontrar la mejor forma de manipular y conocer esta materia prima. El tratamiento de extracción enzimática de jugo ha funcionado en otras frutas. Este sistema podría ser una alternativa para aumentar la producción de jugo clarificado de açaí sin cambiar significativamente su contenido nutricional.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Incrementar el porcentaje de extracción y evaluar la calidad nutracéutica del jugo de açai obtenido por medio de tratamientos enzimáticos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluación del porcentaje de extracción a diferentes tiempos de incubación 0-4 horas.
- Analizar la capacidad antioxidante de los compuestos del jugo.
- Cuantificar los polifenoles presentes en el jugo.
- Evaluar las diferencias en concentración de antocianinas entre las muestras incubadas.
- Evaluación de los tratamientos enzimáticos para su uso a posteriori en el procesamiento de açai.

1.2 ALCANCES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1.2.1 Alcances

- Investigar la interacción del jugo de açai con tratamientos enzimáticos para reducir el desperdicio en la producción de jugo de açai.
- Lograr incrementar el porcentaje de extracción de jugo clarificado de açai
- Analizar cualitativamente el jugo de açai (capacidad antioxidante, fenoles solubles totales, concentración de antocianinas).

1.2.2 Limitaciones

- Limitantes económicas y de tiempo no permitieron un estudio más profundo sobre todos los factores que afectan la calidad del jugo de açai y sus cambios con los tratamientos realizados.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CONTEXTO GENERAL

Según Murrieta *et al.* (1999), el açai es una planta muy utilizada por poblaciones indígenas en la amazonía. Los altos niveles de energía y proteína en la dieta probablemente se relacionan con el consumo de esta fruta. La pulpa de açai es una fuente de vitamina E, fibras, cobre, boro, entre otros (Rogez, 2000).

El fruto del açai contiene polifenoles que son muy codiciados por su color y su capacidad antioxidante (Del Pozo-Insfran, 2004). Estos atributos le dan al açai y a otras frutas el potencial de disminuir la incidencia de enfermedades crónicas como shocks hemorrágicos, arteriosclerosis, promoción de tumores, carcinogénesis, entre otros (Sambazon).

Ya que el açai contiene muchos sólidos que en la actualidad representan un desperdicio, se ha tratado, como en otras frutas, de incrementar la producción de jugo por medio de tratamientos enzimáticos. Estos tratamientos son muy utilizados en el procesamiento de frutas y vegetales para incrementar la cantidad de jugo extraído (Demir, 2001).

El proceso enzimático es considerado beneficioso y mejor que el proceso térmico-mecánico en varias frutas. En particular el uso de celulasas y pectinasas ha sido parte integral del moderno procesamiento de alimentos no sólo por la facilidad al exprimir la materia prima sino también por asegurar la alta calidad del producto final (Sreenath, 1994).

En estudios aplicados a producción de vino, se habla de que el uso de enzimas incrementa la extracción de polifenoles y la calidad del color. Los resultados en índice de color, contenido de antocianinas y fenoles son más altos en las muestras sometidas a tratamientos enzimáticos que en el testigo sin mostrar cambios significativos en los parámetros de calidad (Pardo, 1999). En otro estudio sobre jugo de manzana (Mihalev, 2004) se demostró que la maceración enzimática de jugo de manzana afecta positivamente su potencial antioxidante. Este efecto está directamente relacionado al uso de enzimas y no así a temperatura ya que el experimento se realizó a 20 ± 3 °C.

2.2 AÇAÍ

El Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), de la familia Palmae y originaria de los valles y orillas de ríos en la Amazonía, es una palma de alrededor de 25 metros de altura. Crece en forma

de mata, es decir, que muchos tallos salen de una misma raíz. Puede haber desde 3 hasta 25 tallos por mata en diferentes etapas de crecimiento. Sus hojas de coloración verde oscura pueden alcanzar un tamaño de 2 metros. Presenta pequeñas flores agrupadas en grandes racimos de coloración amarillenta que aparecen a partir de septiembre hasta enero pero están presentes casi todo el año (Sambazon, 2002).

Los frutos de la palma del açai tienen una forma esférica, de 1 a 1.4 centímetros de diámetro y color violeta. Cada palma produce 3 o 4 manojos conteniendo de 3 a 6 kilogramos de fruta cada uno. La producción de fruta se da durante todo el año, sin embargo la mayor producción está entre los meses de julio y diciembre (Sambazon).

Cuadro 1. Caracterización físico-química de la pulpa de açai.

COMPOSICIÓN	VALORES
pH	5.23 ± 0.01
Sólidos solubles totales (°Brix)	4.80 ± 0.02
Acidez titulable (% ácido láctico)	0.21 ± 0.00
Sólidos totales (%)	15.27 ± 0.04
Sólidos insolubles (%)	10.41 ± 0.10
Sólidos solubles (%)	4.86 ± 0.14
Humedad (% base húmeda)	84.73 ± 0.04
Cenizas (%)	0.64 ± 0.01
Proteínas (%)	1.63 ± 0.01
Lípidos (%)	6.49 ± 0.03

Fuente: Pereira (2002)

2.2.1 Beneficios a la salud

El açai ganó fama gracias a su alta capacidad antioxidante, grandes cantidades de radicales libres que están implicados en la disminución de riesgo de algunas enfermedades como artritis, disfunciones gastrointestinales, arteriosclerosis, entre otras (Sambazon, 2002).

Según un estudio técnico realizado por la empresa Sambazon, (2002) el açai cuenta con un perfil nutricional muy completo:

- Provee al consumidor con vitamina C que no es producida en el cuerpo y debe ser consumida diariamente. Los requerimientos diarios son de 45 mg/día. Esta vitamina es necesaria para la producción de colágeno, inicia la conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado, etc.
- Contiene 45mg/100mg de materia seca de vitamina E (α -tocoferol) que es un potente antioxidante. Al igual que la vitamina C esta vitamina debe ser consumida en la dieta. Previene la oxidación de otras vitaminas (A y C). A la vez protege a

los glóbulos rojos de la hemólisis y previene la oxidación de ácidos grasos polinsaturados.

- Entre los minerales que presenta el açaí están: calcio, hierro y potasio que cumplen funciones vitales en el cuerpo como la formación de huesos, asociación con la sangre para atrapar oxígeno y mantener la excitación nerviosa y muscular respectivamente.
- Posee ácidos grasos esenciales (omega 6 y 9) que no son producidos por el cuerpo y son de vital importancia para la formación o síntesis de algunos componentes biológicos. Ej. Prostaglandina.
- Contiene una variedad de polifenoles que han ganado fama por su funcionamiento en disminuir la incidencia de enfermedades como el cáncer y otras anteriormente mencionadas. La presencia de antocianinas y otros polifenoles en la pulpa de açaí puede verse en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Contenido de polifenoles y antocianinas (mg/L pulpa fresca) en Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).

Compuesto	Contenido (mg/L pulpa fresca)
Cianidina 3-glucósido (antocianina)	1040 ± 58.2
Pelargonindina 3-glucósido (antocianina)	74.4 ± 2.90
Acido ferúlico (polifenol)	212 ± 5.29
(-)-epicatequina (polifenol)	129 ± 3.28
Acido <i>p</i> -hidroxibenzoico (polifenol)	80.5 ± 2.00
Acido Gálico (polifenol)	64.5 ± 1.64
Acido protocatachuic (polifenol)	64.4 ± 1.64
(+)-catequina (polifenol)	60.8 ± 1.98
Acido ellágico (polifenol)	55.4 ± 1.39
Acido vanílico (polifenol)	33.2 ± 1.39
Acido <i>p</i> -coumárico (polifenol)	17.1 ± 1.23
derivado 1 de ácido gálico (polifenol)	47.3 ± 1.40
derivado 2 de ácido gálico (polifenol)	18.4 ± 0.89
derivado 3 de ácido gálico (polifenol)	17.3 ± 1.25
derivado 4 de ácido gálico (polifenol)	13.3 ± 0.96
derivado 5 de ácido gálico (polifenol)	3.90 ± 0.18
Derivado de ácido ellágico (polifenol)	19.5 ± 0.40

Fuente: Del Pozo *et al* (2004)

2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Existe evidencia epidemiológica que un incremento en los niveles de consumo de frutas y vegetales en la dieta reduce el riesgo de cáncer y enfermedades del corazón (Parr, 2000).

Según este autor hay investigaciones que demuestran la acción positiva de los antioxidantes ante estos problemas que representan las principales causas de muerte en el hemisferio Occidental.

Los antioxidantes son radicales libres que reaccionan con compuestos para prevenir la oxidación de otros. De acuerdo con Parr (2000), existen estudios en antioxidantes y otros radicales secuestradores para reducir la severidad de un mal degenerativo. Los radicales libres han sido implicados en jugar un papel importante en muchas enfermedades crónicas, pero actualmente sólo hay prueba de algunos casos como cáncer y problemas cardíacos.

Hace algunos años se le prestaba mucha atención a la capacidad antioxidante de las vitaminas C y E y a los carotenoides, pero de acuerdo con Parr (2000), los flavonoides han tomado gran importancia en estos últimos años debido a su poderosa capacidad antioxidante.

2.4 EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA EN JUGOS DE FRUTAS

De acuerdo con Sreenath (1994), el proceso enzimático es reconocido por una variedad de ventajas sobre el proceso termo-mecánico en varias pulpas de fruta. Según Demir (2000), la hidrólisis enzimática de la pared celular incrementa el porcentaje de producción de jugo, reduciendo azúcares, materia seca soluble y ácidos galacturónicos en diversos productos. La pulpa resultante tiene una viscosidad menor y la cantidad de desperdicio se reduce.

Los tratamientos enzimáticos conllevan a una extensa degradación de pectinas y celulosas que conforman las paredes celulares de la fruta. Actualmente se están usando pectinasas y celulasas en la industria de procesamiento de frutas ya que no sólo facilita el prensado sino también asegura la mayor calidad posible en los productos tratados. Según Sreenath (1994), estas enzimas ayudan al ablandamiento de los tejidos y a la liberación de compuestos atrapados en las células.

Cuadro 3. Efecto del tratamiento con pectinasa y celulasa en el porcentaje de recuperación de jugo en tandas de residuo de piña (g/100g de pulpa fresca).

Tratamiento	Porcentaje de Recuperación de jugo							
	I Tanda		II Tanda		III Tanda		IV Tanda	
	Paso 1	Paso 1+2	Paso 1	Paso 1+2	Paso 1	Paso 1+2	Paso 1	Paso 1+2
	62.8	71.94	66.66	74.12	63.33	72.33	64.81	75.44
Testigo (sin enzimas)	± 9.96	± 6.13	± 6.32	± 10.31	± 6.12	± 6.01	± 9.96	± 6.17
Pectinex	-	-	-	76.50 ± 9.96	75.00 ± 9.54	80.98 ± 5.32	78.89 ± 10.75	81.43 ± 6.88
Celluclast	-	-	-	76.30 ± 9.48	76.50 ± 8.67	83.96 ± 4.80	78.00 ± 11.20	81.89 ± 7.62
Mezcla (Pectinex+Celluclast)	-	-	-	78.40 ± 10.50	74.75 ± 10.12	86.14 ± 4.40	80.12 ± 8.96	83.83 ± 8.15

Fuente: Sreenath (1994).

En otro estudio Mihalev (2004) demostró que el licuado de la pulpa de manzana usando enzimas pectolíticas y celulolíticas incrementó el contenido de polifenoles en los jugos extraídos comparados con los jugos Premium que son producidos por proceso convencional de maceración con enzimas pectolíticas; sin embargo, el uso de enzimas celulolíticas está prohibido para la producción de jugos en la Unión Europea. (Mihalev, 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El presente estudio fue realizado en las instalaciones del departamento de **Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana** (FSHN) de la Universidad de Florida, Gainesville, FL. USA.

3.2 MATERIALES

- Pulpa de açai. (resultado del procesamiento y separación de cáscara y semilla del açai)
- Agua destilada.
- Agua deionizada.
- Pectinasa (*Aspergillus niger*) Actividad 3500 u/g. temperatura óptima 25°C. MP Biochemicals.
- Celulasa (*Trichoderma viride*) Actividad 11.2 u/mg. Temperatura óptima 37°C. MP Biochemicals.
- Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetrathylchroman-2-carboxylic acid). Sigma-Aldrich.
- Buffer de fosfato (0.75M K₂HPO₄ y .0.75M NaH₂PO₄) a pH 7. Fisher Scientific
- Radical 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Sigma-Aldrich
- Flourescein. Sigma-Aldrich.
- Reactivo Folin-Ciocalteau. Sigma-Aldrich
- Ácido Gálico. Sigma-Aldrich.
- Carbonato de Sodio (Na₂CO₃). Fisher Scientific.
- Buffer (KCl y HCl) a pH 1.0. Fisher Scientific.
- Tubos de ensayo con tapa. Fisher Scientific.
- Microplatos. Fisher Scientific.
- Erlenmeyers. Fisher Scientific.
- Beakers. Fisher Scientific.
- Papel encerado. Fisher Scientific.
- Papel aluminio. Fisher Scientific.

3.3 EQUIPOS

- Fmax Molecular Devices.
- HPLC Dionex.
- Spectra Max 190. Molecular Devices.
- Potenciómetro Digital 109. Corning.
- Vortex Genie 2 12-812 Fisher Brand®.
- Balanza analítica APX 100 Denver Instruments.
- Baño María. Waterbath Isotemp 210. Fisher Scientific.
- Centrifuga. Modelo 225. Fisher Scientific.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para todos los parámetros de calidad y cantidad de este trabajo.

Se realizaron dos ensayos. En el primero se utilizaron tres tratamientos celulasa (C), pectinasa (P), mezcla pectinasa-celulasa (PC)) a una concentración de 25 U/mL y expuestos a baño maría por 0, 15, 30, 60 y 120 minutos a temperaturas óptimas para cada enzima. Para evaluar los tratamientos se usó un testigo expuesto a una temperatura promedio (31°C) por el mismo tiempo. Se extrajo tres muestras por cada tratamiento a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.

Para el segundo ensayo se incrementó la concentración enzimática a 50 U/mL y el tiempo de exposición a 0, 1, 2, 3 y 4 horas. Ya que en el primer segmento del estudio se observó un mejor comportamiento por parte de celulasa y pectinasa+celulasa, estos dos tratamientos fueron comparados con un testigo exactamente igual que el del primer ensayo. Al igual que en el primer estudio se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

3.4.2 Producción de jugo

Se prepararon 100 mL de muestra. Se mezclaron 95 mL de puré de açaí con 5 mL de enzima diluida en buffer 4.2. El testigo llevó únicamente 5 mL de del mismo buffer. Se extrajeron 6 mL para cada tubo (3 repeticiones por tiempo) a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Se centrifugaron las muestras por 10 minutos y luego se midió la cantidad de jugo separado del desperdicio en cada tubo. Los datos se reportaron en centímetros de longitud de la porción de jugo presente en los tubos de ensayo y fueron interpretados como el porcentaje de variación comparado con el testigo y las primeras muestras de cada tratamiento a 0 horas.

3.4.3 Pérdida de color (calidad) en el jugo

Se hizo una dilución de 100x de jugo de açai con buffer pH 1.0 para el análisis espectrofotométrico a 520nm de longitud de onda. Por medio de un espectrofotómetro se midió la cantidad de antocianinas presentes para determinar la calidad del jugo de açai en función de su color. Los datos se reportaron en partes por millón de antocianinas en las muestras y fueron interpretadas como el porcentaje de variación comparado con el testigo y las primeras muestras de cada tratamiento a 0 horas.

3.4.4 Capacidad antioxidante (Método ORAC)

Previo al análisis se prepararon los diferentes agentes: el buffer, la solución fluorescente y el radical. Se elaboró la solución buffer de fosfato pH 7.0 con la que se prepararon las muestras y la curva estándar a una dilución 500x. La curva estándar consiste en una mezcla de Trolox® (Análogo soluble en agua de vitamina E) y buffer. Se preparó la solución fluorescente con 10 µL de Fluorescein concentrado más 50 mL de buffer. Se agregó 50 µL de jugo y/o curva estándar con 100 µL de fluorescein más 50 µL de radical AAPH. El microplato fue analizado por 70 minutos con lecturas cada 2 minutos por medio del método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Se analizó la capacidad antioxidante del jugo de açai en el Fmax. Los datos se reportaron en micromoles de equivalente de Trolox por mlilitro y fueron analizadas como el porcentaje de variación comparado con el testigo y las primeras muestras de cada tratamiento a 0 horas.

3.4.5 Fenoles Solubles Totales (Método Folin-Ciocalteu)

Se prepararon los agentes necesarios para la prueba, el reactivo Folin-Ciocalteu (diluyendo 125 mL de reactivo FC comercial en un litro de agua destilada) y el carbonato de sodio (disolviendo 105.99g de Na₂CO₃ en 800 mL de agua destilada para luego llevarlo a un volumen de un litro). Se hizo una dilución de 50x de jugo con agua destilada. Se hizo una curva estándar de ácido gálico y agua destilada. Se tomó 100 µL de muestra que fue mezclada con 1 mL de reactivo FC y se esperó 3 minutos para luego adicionar 1 mL de carbonato de sodio para detener la reacción, posteriormente se analizó las muestras a una longitud de onda de 726nm en un espectrofotómetro. Se cuantificó la cantidad de fenoles solubles presentes en el jugo. Los datos se reportaron en miligramos de fenoles por kilogramo de muestra y fueron examinados como porcentajes de variación comparado con el testigo y las primeras muestras de cada tratamiento a 0 horas.

3.4.6 Análisis cualitativo de antocianinas

Este análisis se realizó por medio de un HPLC con un detector PDA 100. Se utilizó una columna de fase reversa a una longitud de onda de 520nm con una fase móvil a base de agua (Fase A) y 60% de metanol (Fase B), ambas fases móviles fueron ajustadas a un pH 2.4 con ácido *o*-fosfórico. Se controlaron los gradientes de solventes. Se corrió fase B

desde 0 hasta 30% en 3 minutos, de 30 a 50% en 5 minutos, de 50 a 70% en 17 minutos, de 70 a 80% en 5 minutos, de 80 a 100% en 5 minutos y se mantuvo así durante los últimos 10 minutos del análisis a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las muestras fueron diluidas 5x.

3.4.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se evaluaron con el programa SAS[®] “Statistical Analysis System” utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) con una significancia del 95% y una separación de medias LSD para determinar si existía diferencia significativa entre el porcentaje de extracción de jugo y factores cualitativos (capacidad antioxidante, concentración de antocianinas fenoles solubles totales) de los tratamientos enzimáticos y el testigo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRIMER ENSAYO

En la primera parte del estudio se analizaron las muestras de puré con tratamiento enzimático y en el Cuadro 4 se ven las separaciones de media de cada estudio.

Cuadro 4. Efecto de tratamientos enzimáticos en el rendimiento de extracción, concentración de antocianinas, capacidad antioxidante y fenoles solubles totales del jugo de açái. Primer ensayo.

Porcentaje comparado con el inicial				
Tratamiento	Extracción de jugo	Concentración de antocianinas	Capacidad antioxidante	Fenoles solubles totales
Testigo (B)	0.58 ^c	102.88 ^b	105.19 ^a	91.29 ^c
Pectinasa (P)	5.30 ^b	94.11 ^b	99.14 ^a	100.92 ^{bc}
Celulasa (C)	7.07 ^{ab}	115.66 ^a	102.07 ^a	119.24 ^a
Ambas (PC)*	8.83 ^a	104.64 ^b	99.81 ^a	111.44 ^{ab}

* Ambas: Combinación de pectinasa y celulasa a 12.5 U/mL cada una.

4.1.1 Incremento en la producción de jugo

El Cuadro 4 muestra que el porcentaje de extracción sin tratamiento enzimático no varía significativamente por más tiempo que se deje. No existen diferencias significativas entre los tratamientos de celulasa y pectinasa-celulasa pero si se observa diferencia respecto al tratamiento de pectinasa y al testigo, esto prueba la funcionalidad de las enzimas en la ruptura de paredes celulares para la liberación de agua y algunos componentes hidrofílicos contenidos en la misma.

En la Figura 1. La tendencia general sin importar el tratamiento es que todas las enzimas incrementan el porcentaje de jugo entre más tiempo se les dé para trabajar. A medida se incrementó el tiempo de incubación (Figura 1), el testigo sólo aumentó 2.56% de jugo mientras que la extracción de jugo con tratamiento enzimático obtuvo 25% en el caso de la combinación celulasa-pectinasa incubada a 31°C, un 16% para la celulasa incubada a 37°C y 12.4% para pectinasa, todas por un periodo de 2 horas.

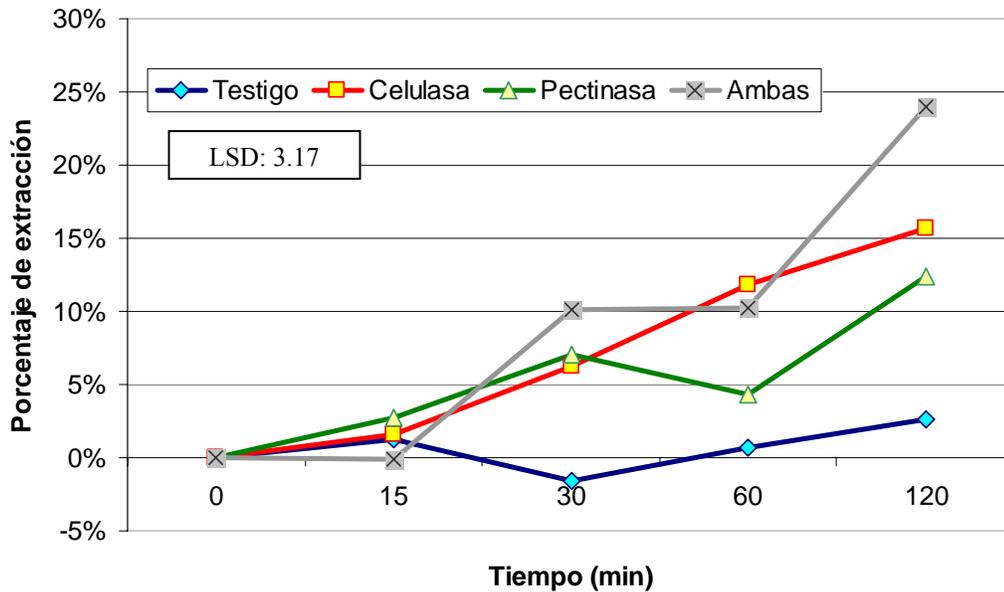


Figura 1. Porcentaje de recuperación de jugo por medio de centrifugación después de 2 horas (ENSAYO 1)

4.1.2 Pérdida de color

Después de 2 horas de incubación el testigo y el tratamiento con pectinasa redujeron la cantidad de antocianinas en alrededor de 20% de la concentración inicial (Figura 2). Los tratamientos con celulasa y la combinación pectinasa-celulasa mantuvieron su calidad en cuanto a color se refiere. En el Cuadro 4 se ve que hubo diferencia de 11% entre celulasa y la combinación (PC) y más aún con los demás tratamientos y el testigo, esto demuestra que celulasa se comportó mejor con las muestras ya que no redujo color y fue el mejor tratamiento.

De acuerdo al análisis estadístico el tratamiento con celulasa fue 13% más alto en antocianina que el testigo, esto demuestra que tuvo un mejor comportamiento ya que no afectó a la calidad en color del jugo.

El testigo y el tratamiento de pectinasa se mantuvieron la concentración de antocianinas hasta los 30 minutos de incubación, (Figura 2) donde empezaron a disminuir. El tratamiento de pectinasa al final de las 2 horas bajó en 23.81% la concentración de antocianinas presentes en el jugo. Véase Figura 2. El testigo bajó hasta 19% lo que demuestra que los tratamientos de celulasa y pectinasa-celulasa de alguna forma ayudaron a mantener estable la calidad del jugo por 2 horas.

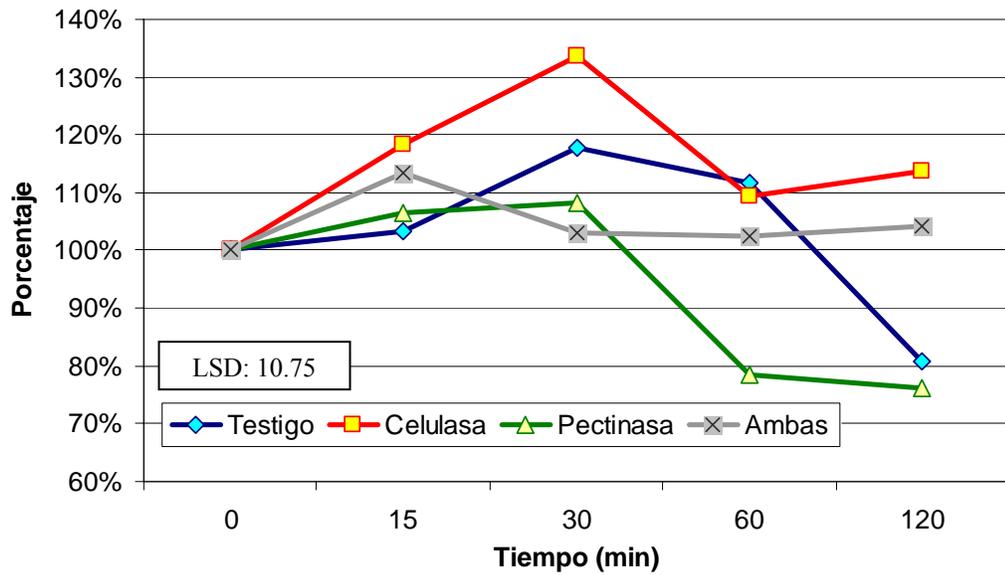


Figura 2. Porcentaje de antocianinas en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 1)

4.1.3 Capacidad Antioxidante

Como se puede observar en el Cuadro 4 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo, esto demuestra que no se perdió la capacidad antioxidante después del tratamiento térmico-enzimático por 2 horas.

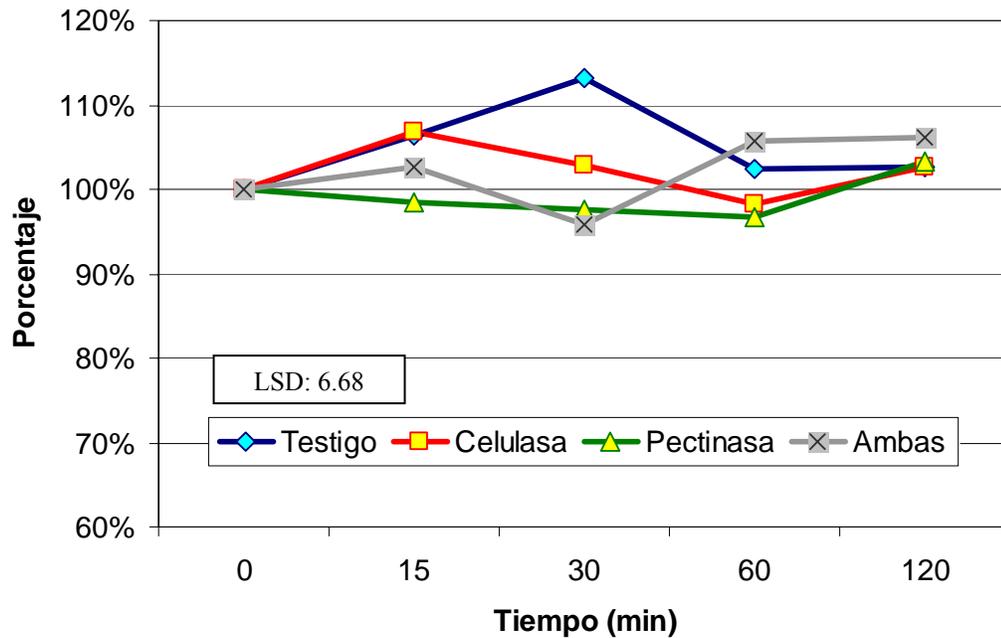


Figura 3. Porcentaje de μmol de Trolox en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 1).

Hubo un comportamiento similar de todos los tratamientos que se mantuvieron muy cerca del 100% (Figura 3). Esto demuestra que la capacidad antioxidante no se vio afectada por los tratamientos enzimáticos y que todavía se pudo incrementar el tiempo de incubación.

4.1.4 Fenoles Solubles Totales

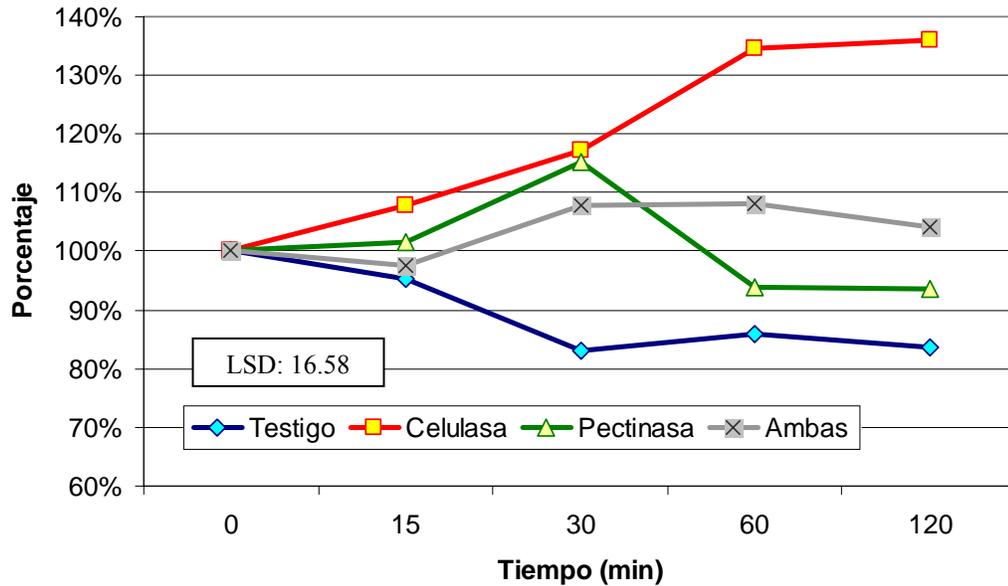


Figura 4. Porcentaje de la concentración de polifenoles en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 1)

El Cuadro 4 muestra que la pulpa de açai sin enzimas bajó su contenido fenólico significativamente desde el inicio de la incubación. No hubo diferencias significativas entre celulasa y la combinación y que, al igual que en el análisis de Concentración de antocianinas, estos dos tratamientos mantuvieron la calidad del jugo incluso mejor que el testigo que disminuyó en un 16.5% y fue significativamente diferente.

Celulasa y la combinación pectinasa-celulasa podrían aguantar mayor exposición térmica ya que no disminuyeron su contenido fenólico (Figura 4). Esto no ocurre con pectinasa ya que a partir de los 30 minutos la concentración de polifenoles disminuyó hasta llegar a un 6.42% por debajo del porcentaje inicial.

4.2 SEGUNDO ENSAYO

Los estudios del primer ensayo mostraron que los tratamientos con celulasa y la combinación celulasa-pectinasa fueron los que mejor interactuaron con las muestras por ello se decidió duplicar el tiempo y la dosis enzimática para ver si estos tratamientos tenían alguna repercusión negativa en la calidad final del jugo.

Cuadro 5. Efecto de tratamientos enzimáticos en el rendimiento de extracción, concentración de antocianinas y capacidad antioxidante del jugo de açaí. Segundo ensayo.

Porcentaje comparado con el inicial			
Tratamiento	Extracción de jugo	Concentración de antocianinas	Capacidad antioxidante
Testigo (B)	1.88 ^b	105.74 ^b	111.17 ^a
Celulasa (C)	16.73 ^a	120.91 ^a	107.00 ^a
Ambas (PC)*	18.35 ^a	97.03 ^c	79.99 ^b

* Ambas: Combinación de pectinasa y celulasa a 25 U/mL cada una.

4.2.1 Incremento en la producción de jugo

Se realizó el mismo procedimiento que en la primera prueba pero se utilizó 50U/mL de enzima durante 4 horas.

Según los resultados expuestos en el Cuadro 5, el testigo no aumentó significativamente el porcentaje de extracción de jugo con sólo un 3.36%. Los tratamientos enzimáticos (C) y (PC) lograron extraer aún más jugo que en la fase inicial y no hubo diferencias estadísticas entre ellos. A la vez se observa una diferencia grande entre los tratamientos y el testigo, mostrando así el eficiente trabajo de las enzimas en la degradación de paredes celulares.

Como se puede observar en la Figura 5, a pesar que no hubo diferencia en el porcentaje de extracción entre los dos tratamientos enzimáticos, el tratamiento con celulasa aún tiene una pendiente positiva de lo cual se puede inferir que todavía se podría seguir extrayendo jugo de la pulpa mientras que en el caso de la mezcla (PC), se ve una fase de crecimiento lento, casi nulo en la curva, lo que muestra que a partir de cuatro horas ya no sería posible seguir extrayendo más jugo, aun si se deseara aplicar más tiempo o concentración del tratamiento.

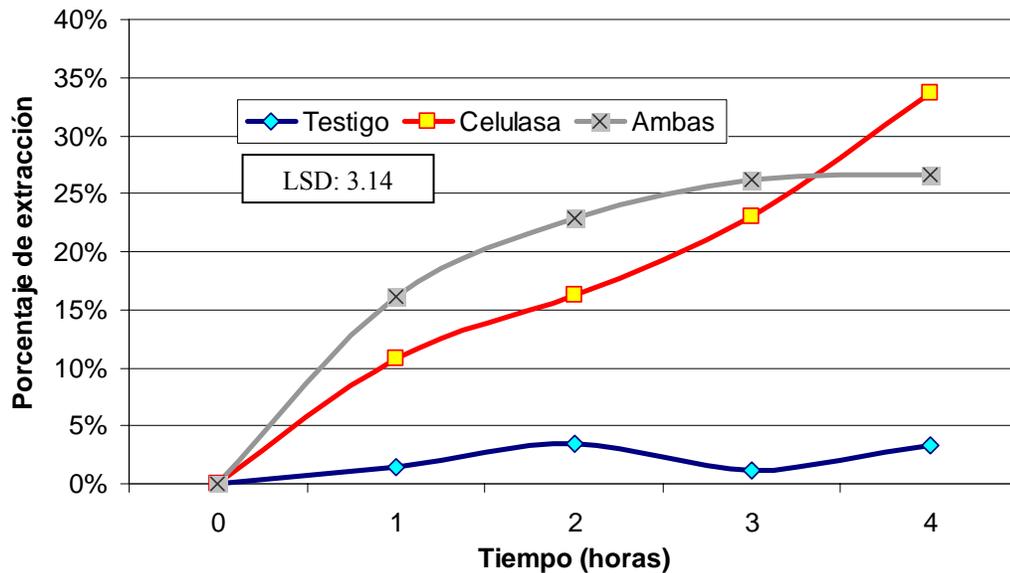


Figura 5. Porcentaje de recuperación de jugo después de 4 horas (ENSAYO 2)

4.2.2 Pérdida de color

La pulpa de açái sin tratamientos enzimáticos mantuvo su concentración de antocianinas a pesar de la exposición térmica durante 4 horas (Figura 6).

El tratamiento de celulasa trabajó mejor respecto a la interacción con las antocianinas del jugo ya que mantuvo la calidad y de alguna forma incrementó la intensidad de color mostrando una lectura final un 30% más alta que las muestras iniciales (Figura 6).

Se ve que, de acuerdo a la separación de medias en el Cuadro 5, hubo diferencias significativas entre las tres muestras. Esto significa que de alguna manera el tratamiento con celulasa no sólo mantuvo si no que incrementó la percepción de rojo por parte del equipo (Spectromax) indicando que hubo un color rojo más intenso sin un aumento en cantidad de antocianinas.

La combinación pectinasa-celulasa no fue estadísticamente diferente al testigo pero se ve una disminución en concentración de antocianinas (Figura 6) de un 7.64% comparado con el porcentaje inicial.

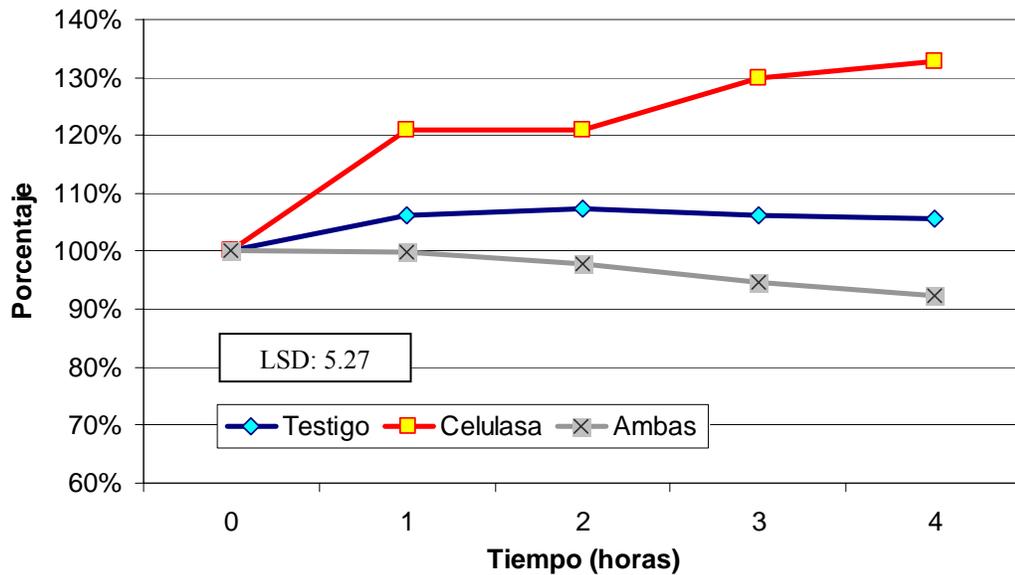


Figura 6. Porcentaje de antocianinas en jugo de açái con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 2)

4.2.3 Capacidad Antioxidante

En este análisis se ve claramente (Figura 7) que el testigo no cambió su capacidad antioxidante a pesar del tratamiento térmico aplicado. También se observó una alteración causada por la combinación pectinasa-celulasa en la capacidad antioxidante. El tratamiento con celulasa mantuvo su capacidad antioxidante cercana al 100%.

De acuerdo al Cuadro 5 el testigo y la celulasa fueron no fueron estadísticamente diferentes. Mientras que pectinasa-celulasa fue significativamente menor en alrededor de 20%.

La pulpa de açái se vio afectada por la combinación pectinasa-celulasa cuando se duplicó el contenido enzimático (Figura 7) ya que en el primer ensayo la capacidad antioxidante se mantuvo por 2 horas con un tratamiento enzimático de 25U/mL de concentración (Figura 4).

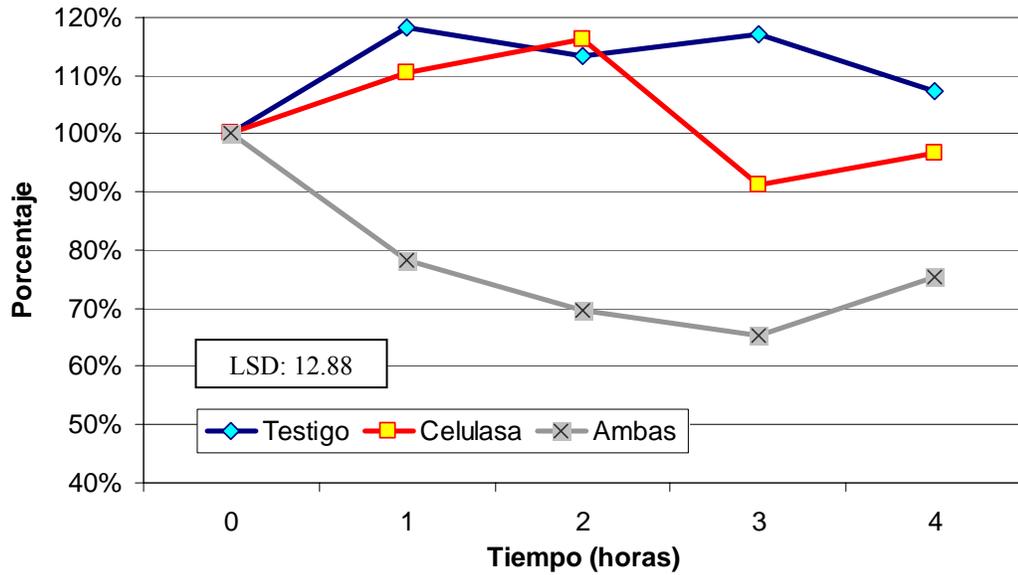


Figura 7. Porcentaje de μmol de Trolox en jugo de açai con tratamientos enzimáticos. (ENSAYO 2)

4.2.4 Análisis cualitativo de antocianinas

Una vez concluido el segundo ensayo del estudio surgió la interrogante acerca de cómo se incrementó la intensidad de color y que cambió en la composición de las antocianinas para producir este efecto.

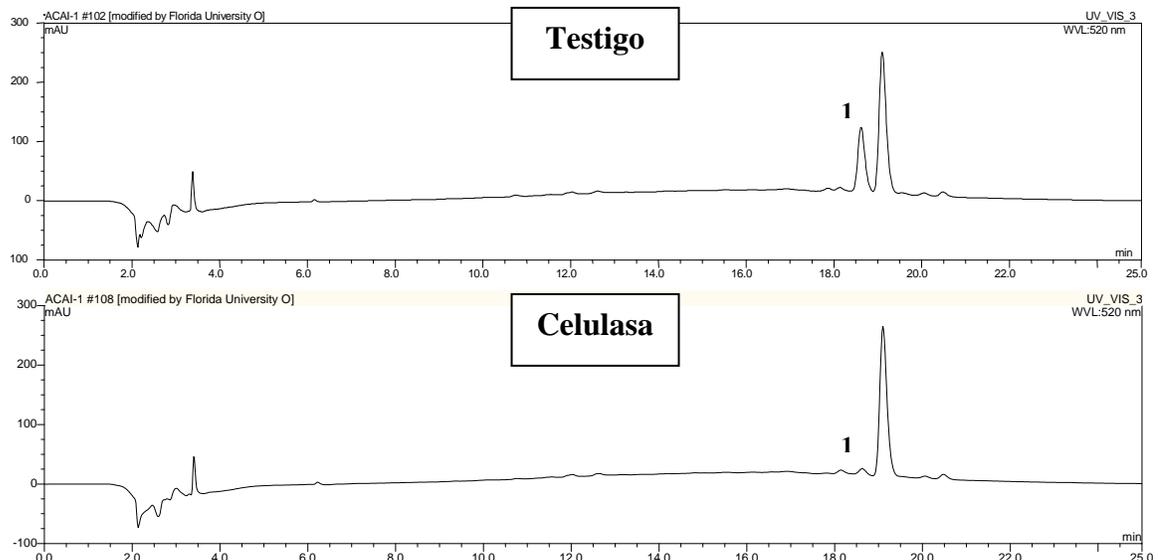


Figura 8. Cromatograma de antocianinas de açai (Control y Celulasa a las 0 horas).

Como se observa en las Figuras 8, uno de los picos más importantes (1) (**no se puede distinguir si es cianidina 3-glucósido o pelargonidina 3-glucósido**) se redujo drásticamente con celulosa incluso sin haber pasado tiempo de incubación. Lo más extraño en esta observación es que no transcurrió un tiempo considerable.

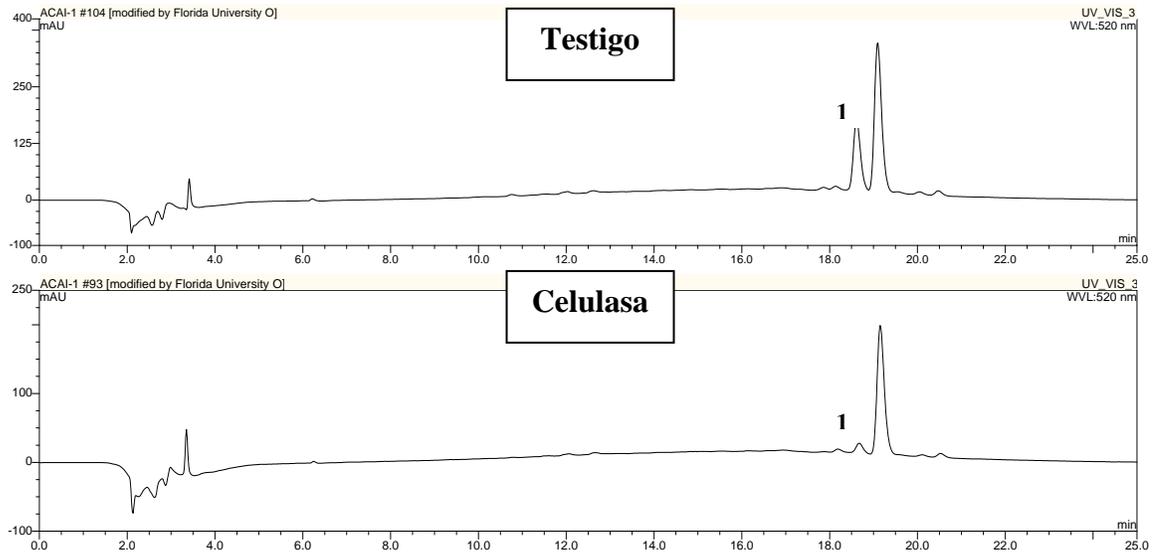


Figura 9. Cromatograma de antocianinas de açái (Testigo y Celulosa a las 2 horas).

Una vez más el tratamiento mostró una inferioridad en la concentración de antocianinas ya que uno de los picos importantes no mostró gran área bajo la curva del cromatograma. (Figura 9).

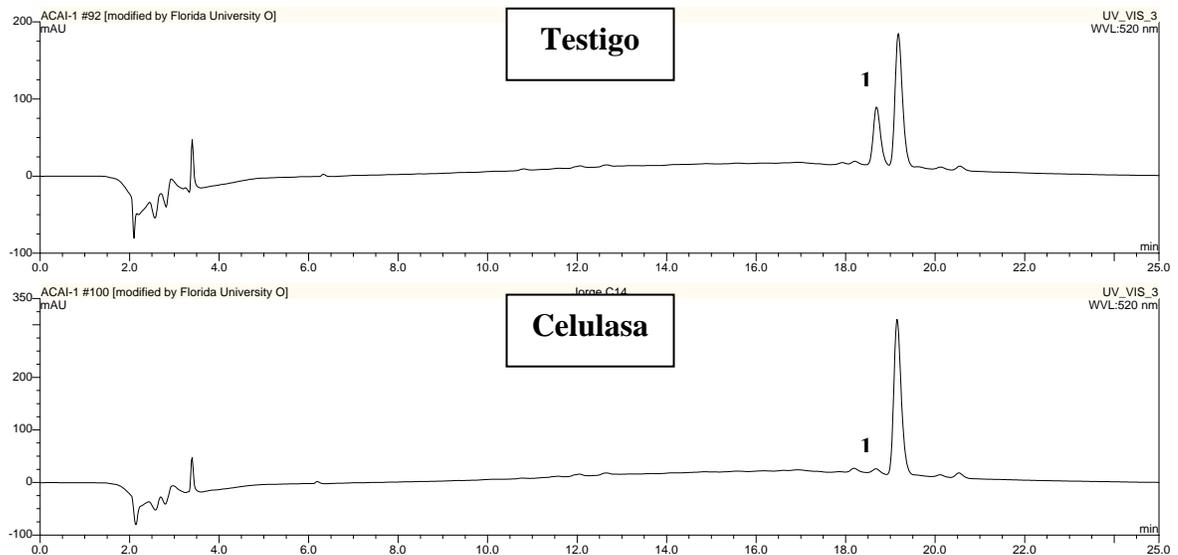


Figura 10. Cromatograma de antocianinas de açái (Testigo y Celulosa a las 4 horas).

Finalmente en la Figura 10 se observa la misma situación que en las dos figuras anteriores y se demuestra que el color es una percepción que no estaba totalmente ligada a las antocianinas del testigo, sino a alguna interacción entre el tratamiento enzimático con los compuestos del jugo.

Cuadro 6. Integraciones de área bajo la curva del HPLC para el tratamiento con Celulasa y el testigo de 0, 2 y 4 horas (mg/L de jugo de açaí)

Muestra	Tiempo de retención (min)						
	12.0445	12.6447	17.8807	18.1803	18.6557	19.1417	20.5165
Contenido (mg/L)							
B 0	0.7531	0.5513	0.5975	0.7694	20.2302	44.7574	1.3280
B 2	0.9128	0.7315	0.7145	1.1129	28.9674	62.1003	1.9065
B 4	0.4739	0.3742	0.2986	0.6245	14.0379	32.7660	1.0104
C 0	0.5867	0.4452	0.1284	0.7198	6.4634	34.4793	1.0763
C 2	0.4620	0.3908	0.1220	0.8141	2.7141	36.0831	1.0957
C 4	0.4018	0.3258	0.0762	0.5961	0.6022	28.5865	0.7829

De acuerdo con el Cuadro 6, a los 18.66 minutos hubo un compuesto que en promedio tuvo 28.01 mg/L comparado con la celulasa que tuvo un promedio de 3.26 mg/L lo que no representa ni el 12% del testigo.

Además de lo mencionado anteriormente, en general todas las concentraciones de antocianinas bajaron. Esto apoya lo que muestran las Figuras 8, 9 y 10 y deja una incógnita acerca de la interacción enzima-pulpa de açaí.

5. CONCLUSIONES

- Al igual que en otras frutas, los tratamientos enzimáticos incrementaron el porcentaje de jugo extraído.
- El tratamiento que mejor se comportó en general fue el de celulasa (50 U/mL durante 4 horas) al incrementar el porcentaje de jugo sin afectar significativamente la capacidad antioxidante ni el color de las muestras.
- El tratamiento de la mezcla de ambas enzimas (pectinasa-celulasa) 50 U/mL logró extraer el jugo sin dañar el color, pero causó efectos negativos en la capacidad antioxidante de las muestras.
- El testigo no tuvo una disminución significativa en el contenido de fenoles totales pero sí una disminución significativa en la concentración de antocianinas en la fase inicial.
- Luego del análisis con HPLC no se pudo determinar exactamente que interacción tuvo la celulasa con las antocianinas para aumentar la intensidad del color rojo.

6. RECOMENDACIONES

- Retomar la presente investigación ensayando con el HPLC para determinar la interacción enzima-jugo y encontrar las causas del mantenimiento de los factores de calidad habiendo cambiado el contenido de antocianinas.
- Repetir el experimento y aumentar el tiempo y la concentración de enzimas para llegar al punto en que este tratamiento no genere más extracción de jugo y disminuya la calidad, para así determinar el máximo uso de enzimas para la industria.
- Probar otras combinaciones de enzimas para determinar no sólo cuanto porcentaje se puede extraer sino también que enzima específicamente realiza mejor esta labor.
- Realizar un análisis de costo-beneficio cuando se haya encontrado el mejor tratamiento enzimático y las cantidades óptimas a usar.
- Desarrollar un análisis sensorial para determinar si los tratamientos enzimáticos causaron algún cambio organoléptico en el producto final.

7. BIBLIOGRAFIA

Del Pozo-Insfran, D. Brenes, C. Talcott, S. 2004. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe Oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52. p.1539-1545.

Demir, N. Acar, J. Sarioglu, K. Mutlu. 2001. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of Food Engineering*. vol. 47 p. 275-280.

Mihalev, K. Schieber, A. Mollov, P. Carle, R. 2004. Effect of Mash Maceration on the Polyphenolic Content and Visual Quality Attributes of Cloudy Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52 p. 7306-7310.

Murrieta, R. Doufour, D. Siqueira, A. 1999. Food Consumption and Subsistence in three Caboclo Populations on Marajó Island, Amazonia, Brazil. *Human Ecology*. vol. 27 p. No.3.

Pardo, F. Salinas, M. Alonso, G. Navarro, G. Huerta, M. 1999. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry*. vol. 67 p. 135-142.

Parr, A. Bolwell, G. 2000. Review Phenols in the plant and in man. The potencial for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. vol. 80 p. 985-1012.

Pereira, E. Queiroz A. Figueiredo, R. 2002. Massa específica de polpa de açai em função do teor de sólidos totais e da temperatura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 6, n. 3, p. 526-530.

Rogez, H. 2000. Açai: prepare, composição e melhoramiento a conservação, EDUFPA, Belém-PA, Brasil, 313p.

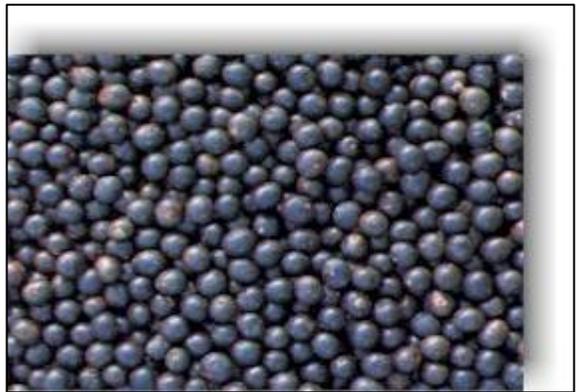
Sambazon. 2002. Amazon, Açai a Technical Position Paper.

Sreenath, H. Sudarhanakrishna, K. Santhanam, K. 1994. Improvement of Juice Recovery from Pineapple Pulp/Residue Using Cellulases and Pectinases. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. vol 78, No. 6, 486-488.

Talcott, S. 2005. Situación actual del açáí y su impedimento de ingreso a USA como fruta fresca. (comunicación personal). Universidad de Florida, Gainesville, FL, USA.

8. ANEXOS

Anexo 1. Ilustraciones de Açáí (*Euterpe oleracea* Mart.)



Fuente: Sambazon (2002)

Anexo 2. Ficha Técnica de las enzimas.**Certificado de Análisis****Descripción del producto:** Celulasa**Número de catálogo:** 150584**Lote:** 2182H**Fórmula:** N/A**CAS #:** 9012-54-8**Descripción física:** Polvo fino**Peso de la fórmula:** N/A**Almacenamiento:** +4°C

Prueba	Especificación	Resultado
Prueba de Identidad	Aprobado	Aprobado
Fuente	<i>Trichoderma virde</i>	<i>Trichoderma virde</i>
Actividad	≥1 u/mg solid	11.2 u/mg solid

Definición de unidad: Una unidad liberara 1.0 μmol de glucosa proveniente de la celulosa en 1 hora a pH 5.0 y 37°C.

Pérdida en secado 2.4%

Certificado de Análisis**Descripción del producto:** Pectinasa**Número de catálogo:** 198979**Lote:** R2162**Fórmula:** N/A**CAS #:** 9032-75-1**Descripción física:** Polvo blanco**Peso de la fórmula:** N/A**Almacenamiento:** +4°C, seco

Prueba	Especificación	Resultado
Prueba de Identidad	Aprobado	Aprobado
Fuente	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Actividad	>1000 u/g	3500 u/g
Tiempo de secado	<8.0%	2.26%

Unit Definition: Una unidad libera 1.0 μmol de ácido galacturónico proveniente del ácido polygalacturónico por minuto a pH 4.0 y 25°C.

Anexo 3. Cálculos para la preparación de las muestras.

ENSAYO 1			ENSAYO 2		
Celulasa			Celulasa		
1mg	→	11.2 U	1mg	→	11.2 U
Xmg	→	25 U	Xmg	→	50 U
X = 2.23mg para obtener 25 U/mL 223.21mg para 100 mL			X = 4.46mg para obtener 25 U/mL 446.42mg para 100 mL		
Pectinasa			Pectinasa		
1mg	→	3.5 U	1mg	→	3.5 U
Xmg	→	25 U	Xmg	→	50 U
X = 7.14mg para obtener 25 U/mL 714.28mg para 100 mL			X = 14.28mg para obtener 25 U/mL 1428.57mg para 100 mL		
Ambas			Ambas		
1mg	→	11.2 U	1mg	→	11.2 U
Xmg	→	12.5 U	Xmg	→	25 U
1mg	→	3.5 U	1mg	→	3.5 U
Ymg	→	12.5 U	Ymg	→	25 U
X = 1.12mg para obtener 12.5 U/mL Y = 3.57mg para obtener 12.5 U/mL 468.75mg para 100 mL			X = 2.23mg para obtener 12.5 U/mL Y = 7.14mg para obtener 12.5 U/mL 937.5mg para 100 mL		

Anexo 4. Flujo de proceso general de inoculación y baño maría.