

**Efecto del procesamiento y
almacenamiento en el contenido de vitamina
B₁₂ de pasta de harina de trigo con espirulina
(*Arthospira plantensis*)**

Gabriela Lorena Salazar Orbea

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

Efecto del procesamiento y almacenamiento en el contenido de vitamina B₁₂ de pasta de harina de trigo con espirulina (*Arthospira plantensis*)

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria
en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Gabriela Lorena Salazar Orbea

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

La autora 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.

Gabriela Lorena Salazar Orbea

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

**Efecto del procesamiento y almacenamiento en el contenido de
vitamina B₁₂ de pasta de harina de trigo con espirulina
(*Arthospira plantensis*)**

Presentado por:

Gabriela Lorena Salazar Orbea

Aprobado:

Francisco J. Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria Alimentaria

Julio R. López, M.Sc.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios por ser la guía de mi vida.

A mis amados padres Miguel Salazar y Mercedes Orbea por ser mi ejemplo de vida.

A mis hermanos Katherine Alexandra y Anthony Miguel.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme regalado cada uno de los días de mi vida, por acompañarme en todo momento, por todas las oportunidades y regalos recibidos.

A mis padres por el apoyo incondicional, por todos los sacrificios que significaron estos cuatros años, por sus consejos y amor durante mi vida.

A mis hermanos, por ser mis mejores amigos quienes me han dado la fuerza para alcanzar mis metas, por todo lo que hemos vivido juntos y por estar siempre a mi lado.

A mis familiares y amigos en Ecuador por creer en mí y que a pesar de la distancia me apoyaron y nunca me dejaron sola.

A mis amigos zamoranos Jéssica Valverde, Vanessa Salcedo, Marcela Romero, Marcelino Guachambala, Jenny Orozco, Axel Morales, Sandra Sotelo e Irene Rubiano por su cariño y todos los momentos compartidos.

Al grupo católico PROMESAS por brindarme la fuerza necesaria para cada semana y a todos sus miembros por su amistad.

Al Dr. Francisco Bueso y al Ing. Julio López por toda su asesoría técnica en este proyecto.

Al ingeniero Víctor Taleón, por toda su colaboración técnica y amistad.

RESUMEN

Salazar, G. 2007. Efecto del procesamiento y almacenamiento en el contenido de vitamina B₁₂ de pasta de harina de trigo con espirulina (*Arthospira plantensis*). Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano”, Honduras. 35 p.

El alga espirulina (*Arthospira plantensis*) es una fuente rica en cianocobalamina (vitamina B₁₂). El objetivo de este estudio fue determinar la cantidad de cianocobalamina en la pasta de harina de trigo con espirulina después del procesamiento y evaluar su degradación durante el almacenamiento. Se desarrolló un método cromatográfico para detección y cuantificación de vitamina B₁₂ usando HPLC de fase reversa con detector DAD a 360 nm y se validó internamente siguiendo el método de Fernández. T, *et al.* (2001). En la curva de calibración se usó un rango entre 0.4 y 10 µg/ml de cianocobalamina con tres repeticiones por concentración. Para la validación de la curva se utilizaron concentraciones de 0.5 a 15 µg/ml. Se calculó mediante regresión lineal. Se estableció exactitud mediante la relación entre la concentración de estándar inyectado y el área obtenida bajo la curva y precisión a través del porcentaje de coeficiente de variación. Se evaluaron tres formulaciones de pasta de harina de trigo con 3, 7 y 10% de espirulina elaboradas mediante extrusión en frío (38°C) y secado (24°C por 6 horas). Se utilizó una prueba de Kramer para seleccionar el tratamiento preferido según el panel sensorial. Para evaluar la pérdida de vitamina B₁₂ después del procesamiento durante el almacenamiento se utilizó un diseño completo al azar. El modelo de regresión de la curva de calibración y la validación presentaron un $R^2 = 0.999$. El coeficiente de variación fue menor a 5% y la desviación estándar menor a 1. Después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina se perdió 40% de cianocobalamina. Existió una pérdida significativa ($P < 0.05$) de vitamina B₁₂ a partir de los 14 días de almacenamiento. El método de cuantificación de vitamina B₁₂ por HPLC demostró alta precisión y exactitud desde la concentración de 0.4 µg/ml.

Palabras clave: cromatografía líquida, extrusión en frío, cianocobalamina.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xi
Índice de anexos.....	xii
 1. INTRODUCCIÓN.....	 1
1.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.2. ANTECEDENTES.....	2
1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	2
1.4. OBJETIVOS.....	2
1.4.1. Objetivo general.....	2
1.4.2. Objetivos específicos.....	3
 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	 4
2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPIRULINA.....	4
2.2. IMPORTANCIA DE LA VITAMINA B ₁₂ EN LA DIETA HUMANA.....	4
2.3. PROCESAMIENTO PARA PASTA.....	5
2.4. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B ₁₂	6
2.4.1. Método de <i>Lactobacillus leichmanii</i>	6
2.4.2. Cromatografía líquida de alta precisión.....	7
2.5. ANÁLISIS SENSORIAL.....	8
2.5.1. Análisis sensorial de preferencia.....	8
2.5.2. Análisis sensorial de aceptación.....	8
2.5.3. Prueba sensorial triangular.....	8
 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 9
3.1. LOCALIZACIÓN.....	9
3.2. MATERIALES.....	9
3.2.1. Materiales para la cuantificación de vitamina B ₁₂ por HPLC.....	9
3.2.2. Materiales para la elaboración de la pasta de harina de trigo con espirulina.....	9

3.3.	REACTIVOS.....	10
3.3.1.	Reactivos para la cuantificación de vitamina B ₁₂ por HPLC.....	10
3.3.2.	Reactivos para la extracción de vitamina B ₁₂ en pasta de harina de trigo con espirulina.....	10
3.4.	EQUIPO.....	10
3.4.1.	Equipo para la cuantificación de vitamina B ₁₂ por HPLC.....	10
3.4.2.	Equipo para la elaboración pasta.....	11
3.5.	MÉTODO DE FERNÁNDEZ T, et al. (2001) PARA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B ₁₂ POR MEDIO DEL USO DE HPLC.....	11
3.6.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VITAMINA B ₁₂ POR MEDIO DEL USO DE HPLC TOMANDO COMO REFERENCIA EL MÉTODO DE FERNÁNDEZ. T, ET AL. (2001).....	12
3.7.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	12
3.7.1.	Diseño experimental del análisis sensorial de preferencia.....	12
3.7.2.	Diseño experimental de la cuantificación de vitamina B ₁₂ después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina.....	13
3.7.3.	Diseño experimental de la cuantificación de vitamina B ₁₂ durante el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina.....	13
3.7.4.	Diseño experimental del análisis sensorial de aceptación.....	13
3.7.5.	Diseño experimental de la prueba sensorial triangular.....	13
3.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
3.8.1.	Análisis estadístico de la prueba sensorial de preferencia.....	13
3.8.2.	Análisis estadístico de la cuantificación de vitamina B ₁₂ después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina.....	14
3.8.3.	Análisis estadístico de la cuantificación de vitamina B ₁₂ durante el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina.....	14
3.8.4.	Análisis estadístico del análisis sensorial de aceptación.....	14
3.8.5.	Análisis estadístico de la prueba sensorial triangular.....	14
3.9.	PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA PASTA DE HARINA DE TRIGO CON ESPIRULINA.....	14
3.9.1.	Formulación.....	14
3.9.2.	Diagrama de flujo de pasta de harina de trigo con espirulina.....	15
3.10.	ANÁLISIS SENSORIAL DE PREFERENCIA.....	17
3.11.	CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B ₁₂ POR MEDIO DE DE HPLC TOMANDO COMO REFERENCIA EL MÉTODO DE FERNÁNDEZ. T, et al. (2001) PARA PASTA DE HARINA DE TRIGO CON ESPIRULINA.....	17
3.12.	ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEPTACIÓN.....	17
3.13.	PRUEBA SENSORIAL TRIANGULAR.....	18
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1.	CALIBRACIÓN DEL MÉTODO HPLC.....	19
4.1.1.	Análisis cuantitativo de vitamina B ₁₂ por HPLC.....	19
4.1.2.	Análisis cualitativo de vitamina B ₁₂ por HPLC.....	19
4.2.	VALIDACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	20
4.3.	ANÁLISIS SENSORIAL DE PREFERENCIA.....	21

4.4.	CONCENTRACIÓN DE VITAMINA B ₁₂ EN PASTA DE HARINA DE TRIGO CON ESPIRULINA.....	22
4.4.1.	Concentración de vitamina B ₁₂ antes y después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina.....	22
4.4.2.	Cambios en concentración de vitamina B ₁₂ durante el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina.....	23
4.5.	ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEPTACIÓN.....	24
4.6.	PRUEBA SENSORIAL TRIANGULAR.....	24
5.	CONCLUSIONES.....	26
6.	RECOMENDACIONES.....	27
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	28
8.	ANEXOS.....	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Contenido de vitamina B ₁₂ en alimentos.....	5
2. Gradiente de fase móvil para cuantificación de vitamina B ₁₂	7
3. Distribución de tratamientos para evaluar la pérdida de vitamina B ₁₂ por procesamiento en la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina...	13
4. Descripción del análisis de estabilidad de vitamina B ₁₂ en pasta con espirulina almacenada 30 días.....	13
5. Formulación de la pasta de harina de trigo con espirulina.....	15
6. Indicadores de precisión para la calibración con estándares de cianocobalamina.....	19
7. Datos cuantitativos de la curva de validación.....	21
8. Resultados del análisis sensorial de preferencia para muestras de pasta de alga espirulina.....	21
9. Concentración de vitamina B ₁₂ antes y después del procesamiento de pasta con 7% de espirulina.....	22
10. Cambios en concentración de vitamina B ₁₂ en pasta con 7% de espirulina durante 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente...	23
11. Resultados del análisis sensorial de aceptación para la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Flujo de proceso para pasta de harina de trigo con espirulina.....	16
2.	Curva de calibración para cianocobalamina - método HPLC.....	20
3.	Pérdida de vitamina B ₁₂ en el tiempo de almacenamiento de la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina.....	23

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración de 10µg/ml.....	32
2. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración de 5µg/ml.....	32
3. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración de 1µg/ml.....	33
4. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración de 0.6µg/ml.....	33
5. Hoja para evaluación sensorial de preferencia.....	34
6. Hoja para evaluación sensorial de aceptación	35
7. Hoja para evaluación sensorial prueba triangular.....	36

1. INTRODUCCIÓN

El alga espirulina (*Spirulina spp.*) es una fuente rica en vitamina B₁₂ presentando un contenido promedio de 0.15-0.25 mg/ 100g de alga fresca. Aunque la vitamina B₁₂ es sintetizada activamente por un gran número de bacterias intestinales que se hallan de modo habitual en el organismo humano, el aprovechamiento de ésta es mínimo.

La F.D.A. (Food and Drugs Administration, U.S.A.), ha aprobado y auspiciado desde 1981, la utilización de la Spirulina como complemento dietario natural de uso masivo y sin contraindicaciones, aún en muy altas dosis (Stembel, 2004).

Debido a que la espirulina después de su extracción en el cultivo, contiene un 3% de humedad, es necesario secar para mantener sus propiedades en el tiempo. Por facilidades de consumo se originan tres tipos de productos: espirulina seca en forma de grandes galletas, en forma de polvo y en tabletas, sabiendo que durante el procesamiento se puede perder vitaminas (Burkin, 2006).

El procesamiento de alimentos en la industria tiene como objetivo preservar los alimentos y como consecuencia se presenta el deterioro en los valores nutricionales de compuestos como vitaminas (FAO, 2002). Éste es el caso de la vitamina B₁₂ que es sensible a la luz y calor por lo que el procesamiento de los alimentos que la contienen puede provocar pérdidas considerables de cianocobalamina (Alimentación Sana, 2006).

La pérdida de nutrientes durante el procesamiento varía mucho, dependiendo de cada proceso individual (FAO, 2007). En promedio se pierde de un 10 a 15 por ciento de nutrientes en procesamiento a un producto pre-cocido, descontaminado y limpio (INTA, 2004).

Además de las pérdidas debidas al procesamiento mismo, existen factores previos a éste que también influyen sobre el contenido de vitaminas como condiciones climáticas, uso y tipo de químicos en el manejo del cultivo, grado de madurez al cosechar y almacenamiento post cosecha (INTA, 2004).

1.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ) ofrece una amplia gama de análisis con la limitante de no ofrecer análisis para vitaminas hidrosolubles. Para ampliar sus servicios el LAAZ pretende introducir análisis para determinar y cuantificar vitaminas hidrosolubles, empezando por la B₁₂.

1.2. ANTECEDENTES

En el LAAZ actualmente se realizan análisis físicos de color, textura, viscosidad y tamaño de partícula, así como también análisis químicos. En los últimos años se han incrementado los análisis en lo referente a la identificación y cuantificación de vitaminas A, C, D y E por medio de análisis cromatográficos.

Los servicios ofrecidos por el LAAZ son utilizados en Honduras, El Salvador y Guatemala. Con la diversificación de análisis se pretende abarcar más parte del mercado aumentando las utilidades y llegar ofrecer éstos servicios en toda Centro América, además de aportar al aprendizaje de los estudiantes y permitir la investigación en áreas que necesiten la identificación y cuantificación de vitamina B₁₂.

1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los clientes del LAAZ buscan obtener análisis nutricionales completos ya que son una herramienta de competitividad. Además de brindar la información nutricional necesaria en los productos con el objetivo que el cliente obtengan datos que sirvan como base para consumir la ingesta recomendada diaria de cada nutriente y evitar enfermedades causadas por deficiencias.

Al incrementar la oferta de análisis se obtuvo una mayor participación en el mercado. Logrando que el incremento del análisis de vitamina B₁₂ por cromatografía produzca un impacto positivo sobre los ingresos que percibe anualmente el LAAZ. Además de contribuir a la enseñanza de los estudiantes aumentando su conocimiento y aportar a investigaciones en diferentes áreas que necesiten la medición de vitamina B₁₂.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto del procesamiento y almacenamiento en el contenido de vitamina B₁₂ de pasta de harina de trigo con espirulina (*Arthospira plantensis*).

1.4.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un método cromatográfico para determinar y cuantificar vitamina B₁₂.
- Validar el método cromatográfico de vitamina B₁₂ con extractos de concentración conocida.
- Evaluar cambios en concentración de B₁₂ durante 30 días de almacenamiento de la pasta con espirulina.
- Determinar la preferencia y aceptación de la pasta de harina de trigo con espirulina sensorialmente.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPIRULINA

La *Arthospira plantensis* es una cianobacteria considerada como una microalga por su estructura filamentosa, crece en condiciones alcalinas (pH 8.5 – 10.5) y a una temperatura promedio de 25 a 35°C (Ramírez y Olivera, 2006).

Las principales poblaciones de espirulina en América se encuentran en Estados Unidos, Cuba, México, Perú y Uruguay, en cuerpos de agua poco profundos (Vonshak y Tomaselli, 2000).

Bioquímicamente está compuesta por 50-70% de proteína, 15-20% de carbohidratos, 7% de minerales, 6% de pigmentos, 3-6% de ácidos grasos, y vitaminas.

Es la fuente más rica en vitamina B₁₂ conocida en la naturaleza (más de tres veces el contenido de la carne bovina); así como también contiene vitaminas B₁, B₂, B₃, B₆ en muy importantes cantidades. Completan su composición, considerables dosis de vitaminas E, inositol, ácido fólico, biotina y ácido pantoténico (Ramírez y Olivera, 2006).

Tres gramos de espirulina al día proporciona una cantidad suficiente de vitamina B₁₂ incluso a las personas que no coman ningún producto de origen animal (Roeper, 2004).

2.2. IMPORTANCIA DE LA VITAMINA B₁₂ EN LA DIETA HUMANA

La vitamina B₁₂ o cianocobalamina es una vitamina hidrosoluble. En el ser humano es sintetizada en el colon, pero no se encuentra disponible para su absorción por lo que es preciso que su consumo sea a través de productos animales en la dieta (Alimentación Sana, 2006). Las principales fuentes de vitamina B₁₂ en una dieta equilibrada son la carne, los huevos y los lácteos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Contenido de vitamina B₁₂ en alimentos

ALIMENTOS	µg vit B₁₂/100gr alimento
Alga espirulina	140
Hígado	75
Sardinas	28
Atún	5
Bacalao	5
Conservas en aceite	5
Cerdo	3
Carne de res	2
Huevo	1.7
Queso de bola	1.4
Embutidos	1
Leche fluida de vaca	0.3

(Universidad de Navarra, 2002)

Según (A.D.A.M. Inc., 2004), organización acreditada por la Comisión Norteamericana de Certificación de la Atención Médica, el consumo de vitamina B₁₂ es importante para el metabolismo dentro del cuerpo, procesos que implican generación y uso de energía, nutrición, digestión, absorción, eliminación, respiración, circulación y regulación de la temperatura.

En 1948, en los laboratorios de la compañía Merck, Rickes y Folkers se logró aislar la vitamina B₁₂, después del descubrimiento de la misma entre 1824 y 1855 por Combe y Adison cuya investigación fue impulsada por casos de una misteriosa enfermedad llamada anemia megaloblástica.

Según Office Dietary Supplements of National Institutes of Health el RDA (Recommended Dietary Allowances), avalado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A), las recomendaciones específicas de vitamina B₁₂ para hombres y mujeres a partir de los 10 años es de 2.4 µg/día. Ésta necesidad puede variar de acuerdo a la presencia de factores especiales como el embarazo que incrementa el RDA a 2.6 µg/día (ODS, 2002).

2.3. PROCESAMIENTO PARA PASTA

Se define pasta como los productos constituidos por mezclas de sémolas de trigo y/o harina con agua potable, no fermentadas, sin cocción y que han sido sometidos a un proceso de desecación. Podrán adicionarse huevos, hortalizas y otros ingredientes y aditivos autorizados.

La aparición de la pasta se dio en Italia entre los siglos, XI y XII traída por los árabes desde Sicilia. Originalmente se trataban de tiras de masas enrolladas en torno a hilos de paja o similares que se dejaban secar.

En el siglo XIX se introdujeron en Nápoles las primeras gramoladoras que hacían más resistente y elástica la masa previamente elaborada con las maquinas amasadoras. Más tarde vino el turno de la primera prensa hidráulica hasta llegar a nuestros días con la tecnología de fabricación de pastas (Alimentación Sana, 2003).

Actualmente la harina para elaborar pasta proviene del endospermo del trigo duro, lo que le confiere una mayor capacidad de moldeado. Estas harinas son pobres en vitaminas del grupo B, las cuales se localizan en la cubierta del cereal.

La preparación de la masa consiste en el mezclado de los ingredientes, amasado para eliminar las burbujas de aire, extrusión y cortado de la masa que consiste en hacerla pasar a presión por rodillos que le dan su forma típica, seguido del secado y endurecimiento de la pasta en la que se controla temperatura y humedad relativa del ambiente (EROSKI, 2003).

Los efectos en la estabilidad de las vitaminas durante la extrusión son complicados debido a la acción de la humedad, fricción, cambio de temperaturas y presiones. Las vitaminas liposolubles A, D y E son estables durante la extrusión. Las vitaminas hidrosolubles, como la vitamina C o del grupo B, pueden perder estabilidad durante la extrusión (Valls, 1993).

2.4. MÉTODOS DE CUANTIFICACION DE VITAMINA B₁₂

2.4.1. Método de *Lactobacillus leichmanii*

Según la AOAC (Association of Oficial Analytical Chemist) 2005, para la determinación de la vitamina B₁₂, se aprobó el método de *Lactobacillus leichmanii* de cuantificación microbiológica (AOAC 952.20). Las técnicas analíticas utilizadas para éste tipo de método son técnicas turbidimétrica y por titulación. El rango analítico de detección de esta técnica es $\geq 0.1 \mu\text{g}$ de vitamina B₁₂/g o ml.

Este método permite cuantificar cianocobalamina utilizando *Lactobacillus leichmannii* Atcc 7830 microorganismo que no puede sintetizar esta vitamina. Relaciona directamente el crecimiento celular con la concentración de cianocobalamina presente.

Para preparar la muestra y la curva estándar se utiliza un medio comercial libre de cianocobalamina, el crecimiento celular se mide turbidimétricamente y por interpolación en la curva se determina la concentración de la muestra. El análisis debe realizarse con baja intensidad de luz porque la vitamina B₁₂ es fotosensible (ISSSTE, 1997).

2.4.2 Cromatografía líquida de alta precisión

La cromatografía fue desarrollada y definida por el botánico ruso Mikhail Tswett en 1903 que produjo una separación colorida de los pigmentos de la planta usando una columna del carbonato de calcio (tiza). La cromatografía viene de las palabras griegas "chroma" para el color y "graphein" escribe. La cromatografía significa “escribir con color” (Nuyttens, 2004).

Actualmente el método de cuantificación con HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ha sido la principal vía de análisis de mezclas de vitaminas, empleado tanto en preparaciones farmacéuticas como en fuentes naturales. La cromatografía de fase reversa ha sido muy utilizada en el estudio de estos compuestos. Para mejorar los resultados de los análisis cromatográficos se ha incorporado la utilización de pares iónicos (Férez. T, *et al.*, 2001).

Según Gratzfeld de HPLC Technologies (1997), las vitaminas hidrosolubles son compuestos lábiles sensibles a la luz, altas temperaturas y oxígeno, que pueden encontrarse en los alimentos en bajas cantidades. Por tanto el método de cuantificación con HPLC es recomendado pues se pueden separar y detectar éstos compuestos controlando la temperatura, oxígeno y luz. La detección se realiza a través de información espectral por un detector Ultravioleta Visible - Detector de Arreglo de Diodos (UV-DAD) con longitud de onda 220nm - 230nm, columna Hypersil BDS 100mm x 4 mm x 5µm (longitud x diámetro x tamaño de partícula), con una fase móvil binaria (A) agua a pH 2,1 (H₂SO₄) y (B) acetonitrilo (ACN) + 10% A, con aumento en gradiente (Cuadro 2), flujo de 0.5 ml/min, temperatura de 30°C y volumen de inyección de 2-5µl, dejando un tiempo de lavado final de 6 minutos. Éste método de detección y cuantificación es óptimo para obtener concentraciones de vitaminas en alimentos al tener alta sensibilidad para detectar cantidades de ≥ 0.01 µg de vitamina B₁₂/g o ml.

Cuadro 2. Gradiente de fase móvil para cuantificación de vitamina B₁₂

TIEMPO (min)	(A) H ₂ O a pH 2.1 (H ₂ SO ₄)	(B) ACN + 10% A
0 - 3.5	99%	1%
3.6 - 11	75%	25%
11.1 - 19	10%	90%

En el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana se desarrolló el proyecto “Determinación de vitaminas del complejo B en *Arthrospira maxima* por cromatografía líquida de alta resolución” que consiste en el diseño de dos métodos de extracción de las vitaminas del complejo B en muestras de espirulina cubana. Para la determinación se emplea un sistema HPLC formado por una columna de octadecilsilano (C18) y fases móviles de metanol-agua-ácido fosfórico 0.1mol-L (20:79.5:0.5) para el análisis de cianocobalamina. La velocidad de flujo fue 1 ml/min. La detección se realizó con un Detector de Arreglo de Diodos (DAD) con longitud de onda 362nm (Férez. T, *et al.*, 2001).

2.5. ANÁLISIS SENSORIAL

El Instituto de Tecnólogos de Alimentos de EEUU (IFT) (2000), define la evaluación sensorial como la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto y oído.

El análisis sensorial se puede definir como un conjunto de técnicas que miden, evalúan, analizan e interpretan lo más objetivamente posible las características organolépticas de los alimentos. En la percepción sensorial intervienen tres componentes: uno cualitativo (la naturaleza del estímulo), otro cuantitativo (la intensidad) y, por último, el afectivo (de aceptación o rechazo) (Picallo, 2002).

2.5.1. Análisis sensorial de preferencia

La prueba de preferencia sensorial es una prueba cuantitativa afectiva que fuerza al panelista a seleccionar una muestra sobre otra u otras. Es indicado en proyectos en que se requiere elegir un producto de otros en situaciones como mejora del producto o pruebas de preferencia pareada. Se clasifican en diferentes tipos, preferencia pareada, ordenación de preferencia pareada y preferencia pareada múltiple. En estas pruebas no se busca determinar si el panelista puede distinguir entre dos muestras, se requiere saber si les gusta más una determinada muestra que otra (Anzaldúa, 1994).

2.5.2. Análisis sensorial de aceptación

La prueba de aceptación sensorial es una prueba cuantitativa afectiva que se utiliza cuando se busca obtener resultados de cuanto gusta o disgusta un producto a los consumidores.

La prueba de aceptación es muy similar a la prueba de diferencia de atributos, excepto que los atributos (aspecto, olor, color, gusto, textura) son evaluados en aceptación o gusto, en la prueba se utiliza escalas hedónicas (con escalas que vayan de muy malo a muy bueno) que indican los grados de aceptación o no aceptación de la muestra (Civille, 1999).

2.5.3. Prueba sensorial triangular

La prueba triangular o “triangle test” se utiliza cuando el objetivo es determinar si existe diferencia sensorial entre dos muestras. Este método es usado particularmente en situaciones donde existen efectos de cambios en los ingredientes, procesamiento, empaque, almacenamiento que pueden producir cambios en la muestra los cuales no pueden ser caracterizados por unos o dos atributos (Civille, 1999).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ). La elaboración de la pasta de harina de trigo con espirulina fue realizada en la Planta Agroindustrial de Investigación y Desarrollo (PAID) y los análisis de evaluación sensorial se realizaron en el Laboratorio de Análisis Sensorial de Alimentos de la Universidad Zamorano, ubicada a 35 Km. de Tegucigalpa, en el Departamento Francisco Morazán, en las siguientes coordenadas: N 14° Y O 87°, con temperatura promedio anual de 24 °C.

3.2. MATERIALES

3.2.1 Materiales para la cuantificación de vitamina B₁₂ por HPLC

- Papel aluminio
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Bulbo
- Beakers de 125 ml
- Mortero
- Filtros 0.2 µm de nylon
- Agua destilada filtrada al vacío
- Erlenmeyer de 250 ml
- Viales de 2 ml color topacio
- Parafilm

3.2.2 Materiales para la elaboración de la pasta de harina de trigo con espirulina

- Muestra seca de alga espirulina *Arthrospira plantensis*, originaria de Quito-Ecuador: obtenida de la empresa ORGASP S.A. cosechada el 28 de abril de 2007 con redes de plástico, secada al sol y posteriormente pasada por tambores rotatorios para disminuir su tamaño y obtener partículas uniformes más pequeñas. 50 g. de alga fue pesada y empacada al vacío, así se transportó por vía aérea hasta Tegucigalpa, Honduras y posteriormente hasta Zamorano para su uso en el presente estudio.

- Harina de trigo durum, marca GoldStar
- Huevos
- Agua grado alimenticio
- Vasos de plástico
- Hojas de evaluación sensorial
- Galletas soda
- Platos

3.3. REACTIVOS

3.3.1. Reactivos para la cuantificación de vitamina B₁₂ por HPLC

- Estándar de vitamina B₁₂ (cianocobalamina) SUPELCO, pureza 98.5%, catálogo 47869 (1).
- Solución ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N: Disolver 8.2 ml de HCl en 1000 ml de agua destilada.

3.3.2. Reactivos para la extracción de vitamina B₁₂ en pasta de harina de trigo con espirulina

- Muestra de pasta de harina de trigo con alga espirulina sin procesar y procesada.
- Solución de cianuro de sodio (CNNa) al 1%, Reagenzien Merck Cod. 6438, pureza 97%.
- Ácido clorhídrico FISHER SCIENTIFIC, pureza 37.8%
- Acetona FISHER SCIENTIFIC, pureza 37.8%

3.4. EQUIPO

3.4.1. Equipo para la cuantificación de vitamina B₁₂ por HPLC

- HPLC AGILENT 1100 (High Performance Liquid Chromatography)
Desgasificador G1379A JP40724067
Bomba cuaternaria G1311A DE43633284
Detector UV-VIS de arreglo de diodos G1315B DE43626255
Inyector Manual Rheodyne G1328B DE11405091
- Columna SUPELCOSIL™ LC-18 (15cm x 4.6 mm x 5µm) con precolumna
- Jeringa Agilent # 5182-9619,
- Balanza ADVENTURER™, marca OHAUS, modelo AR2140.
- Potenciómetro ORION RESEARCH modelo 701A
- Campana LABCONCO, Patente 6461233
- Centrífuga IEC modelo K
- Rotavapor HAAKEBUCHLER N° 91295

- Estufa FISHER SCIENTIFIC, Catálogo 11-498-7SH
- Bomba de vacío GAST, modelo N° 1HAB-25-M100X

3.4.2. Equipo para la elaboración de pasta

- Rodillo extrusor para pasta y conjunto cortador, marca Kitchen Aid modelo KPRA.
- Mezclador, marca Kitchen Aid modelo FPPA.
- Batidor plano, marca Kitchen Aid modelo K5AB.
- Gancho de amasar, marca KitchenAid modelo K5ADH.
- Parrillas y bandejas

3.5. MÉTODO DE FERNÁNDEZ. T, *et al.* (2001) PARA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B₁₂ POR MEDIO DEL USO DE HPLC

El presente estudio se desarrolló por el método de determinación de vitamina B₁₂ por HPLC recomendado por Fernandez T. *et al.* (2001).

Se desarrolló una curva de calibración para determinar la cantidad de vitamina B₁₂ en alimentos, usando extracciones químicas de estándares puros de cianocobalamina.

Para la curva de calibración se eligió cuantificar cianocobalamina a concentraciones desde 10 hasta 0.4 µg/ml que fue el nivel mínimo al que las diluciones fueron exactas para que el HPLC demuestre precisión en los resultados. El patrón de cianocobalamina se empleó a concentraciones de 0.41, 0.60, 1.02, 3.02, 5.03 y 10.1 µg/ml, desde una solución madre de 20 µg/ml (concentraciones de 0.4 -10µg/ml).

El procedimiento de preparación de soluciones estándares fue el siguiente:

- Se pesó 100 mg de estándar de cianocobalamina en 50 ml de HCl 0.1N y se obtuvo una solución de 2000 µg/ml.
- De la solución de 2000 µg/ml se pesó 5g y se disolvió en un volumen total de 50 ml, para obtener una solución de 200 µg/ml.
- De la solución de 200 µg/ml se pesó 10g y se disolvió en un volumen total de 100 ml, para obtener una solución de 20 µg/ml, solución de la cual se tomaron los diferentes niveles para la curva de calibración.
- Se filtró al vacío con filtros de 0.2 µm y se protegió de la luz cada concentración de estándar.
- Se colocó el filtrado en viales topacio rotulados con la concentración correspondiente.

Las condiciones cromatográficas para el HPLC utilizadas fueron:

- Fase estacionaria: columna SUPELCOSILTM LC-18 (15cm x 4.6 mm x 5µm) con precolumna C-18.

- Fase móvil, solvente A agua filtrada, solvente B metanol, solvente C ácido fosfórico.
- Bomba cuaternaria con condiciones: Flujo 1.6 ml/min, 69.5% de solvente A, 30 % de solvente B y 0.5% de solvente C.
- Detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de detección de 360nm.
- Se empleó un volumen de inyección de 20 µl realizándose cinco repeticiones por cada concentración para determinar el rango de tiempo de elusión de la cianocobalamina que fue 2.5-3 min y un tiempo posterior de lavado de 5 minutos, estableciendo el método en 8 minutos por cada muestra.

El límite de detección, cuantificación, precisión y exactitud del método se determinó a partir del modelo de regresión lineal establecido por la curva de calibración. Los estadígrafos utilizados para evaluar éstos parámetros fueron media, coeficiente de variación y desviación estándar.

Los cromatogramas fueron evaluados para determinar el área promedio bajo la curva para cada concentración de vitamina. Se realizó el análisis de regresión lineal mediante el programa Statistical Analysis System (SAS ®) para determinar la linealidad del método así como para generar la ecuación de la curva de calibración: $y = mx + b$; donde “y”: es el área bajo el pico de vitamina B₁₂, “x” la concentración de estándar de vitamina B₁₂ en ug/ml, “m” la pendiente y “b” el intercepto.

3.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VITAMINA B₁₂ POR MEDIO DEL USO DE HPLC TOMANDO COMO REFERENCIA EL MÉTODO DE FERNÁNDEZ. T, *et al.* (2001).

Para la validación interna del método de identificación y cuantificación de cianocobalamina se inyectaron concentraciones conocidas de estándar a 0.53, 0.71, 2.1, 7.01 y 15.03 µg/ml, realizándose las diluciones en HCl 0.1N. Las muestras fueron inyectadas en el HPLC por triplicado bajo las mismas condiciones cromatográficas con que se realizó la curva de calibración. Se realizó la validación con las mismas condiciones cromatográficas que la curva de calibración. Se realizaron tres repeticiones por concentración.

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.7.1 Diseño experimental del análisis sensorial de preferencia

La evaluación de tres tratamientos de pasta de harina de trigo con 3, 7 y 10% espirulina se realizó con la tabla estadística G-23 (prueba de Kramer), con una probabilidad de 0.05.

3.7.2. Diseño experimental de la cuantificación de vitamina B₁₂ después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina

Como se describe en el Cuadro 3, para evaluar el efecto del procesamiento (extrusión en frío, cortado y secado) sobre la vitamina B₁₂ en la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina se utilizaron tres repeticiones de la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina antes y después del procesamiento.

Cuadro 3. Distribución de tratamientos para evaluar la pérdida de vitamina B₁₂ por procesamiento en la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina.

MUESTRA	TRATAMIENTO	
Repetición 1	Mezcla sin procesar	Pasta procesada
Repetición 2	Mezcla sin procesar	Pasta procesada
Repetición 3	Mezcla sin procesar	Pasta procesada

3.7.3. Diseño experimental de la cuantificación de vitamina B₁₂ durante el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina

En el diseño experimental se utilizaron tres repeticiones de la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina y se evaluó a los días 0, 7, 14 y 30. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción del análisis de estabilidad de vitamina B₁₂ en pasta con espirulina almacenada 30 días

MUESTRA	DIAS			
Repetición 1	0	7	14	30
Repetición 2	0	7	14	30
Repetición 3	0	7	14	30

3.7.4. Diseño experimental del análisis sensorial de aceptación

El análisis sensorial de aceptación se realizó con la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina a los 0 y 30 días de almacenamiento evaluada por 10 panelistas.

3.7.5. Diseño experimental de la prueba sensorial triangular

Para la prueba sensorial triangular se utilizó la pasta de harina de trigo con espirulina a los 0 y 30 días de almacenamiento evaluada por 10 panelistas.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.8.1. Análisis estadístico del análisis sensorial de preferencia

Para realizar el análisis estadístico de la prueba sensorial de preferencia se utilizó la tabla G-23 o de Kramer con una probabilidad de 0.05.

3.8.2. Análisis estadístico de la cuantificación de vitamina B12 después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina

El análisis estadístico de la cuantificación de vitamina B12 después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina se realizó con un diseño completo al azar y separación de medias LSD.

3.8.3. Análisis estadístico de la cuantificación de vitamina B12 durante el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina

El análisis estadístico de la cuantificación de vitamina B12 durante el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina se realizó con un diseño completo al azar con medidas repetidas en el tiempo y separación de medias DUNCAN.

3.8.4. Análisis estadístico del análisis sensorial de aceptación

La prueba sensorial de aceptación se analizó estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANDEVA) desarrollado en SAS®.

3.8.5. Análisis estadístico de la prueba sensorial triangular

La prueba sensorial triangular se analizó estadísticamente con el chi cuadrado con una probabilidad de 0.05.

3.9. PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA PASTA DE HARINA DE TRIGO CON ESPIRULINA

El desarrollo de la pasta se realizó con la muestra preferida (concentración de 7%). El experimento se realizó con un tratamiento (extrusión en frío, cortado y secado) y tres repeticiones.

3.9.1. Formulación

Cuadro 5. Formulación de la pasta de harina de trigo con espirulina

Ingredientes	g/100g
Harina de trigo	56.54
Huevo	31.41
Agua	4.99
Alga espirulina	7.07

3.9.2. Diagrama de flujo de pasta de harina de trigo con espirulina

El proceso que se utilizó para realizar la pasta de harina de trigo con de espirulina se efectuó conforme la formulación del Cuadro 5.

- Se mezcló la harina, huevos, alga espirulina y agua en el recipiente mezclador firme con el implemento batidor plano en velocidad 2 por 30 s.
- Se cambió del implemento al gancho amasador y se mezcló en velocidad 2 por 2 min.
- Se mezcló manualmente por 2 min.
- Se dividió la mezcla en 8 porciones iguales y se pasó cada porción 5 veces por el rodillo extrusor para pasta con el grosor ajustado primero a 1 hasta llegar a 5.
- Se pasó la pasta extruida al implemento cortador obteniendo la pasta cortada, posteriormente se puso a secar por 6 h y se empacó.
- El almacenamiento de la pasta se realizó en bolsas transparentes ziploc de polietileno con cierre deslizable, medidas 27 x 28cm de 0.01524cm (6 mil) de grosor. La temperatura de almacenamiento fue de 24°C y humedad relativa de 45%.

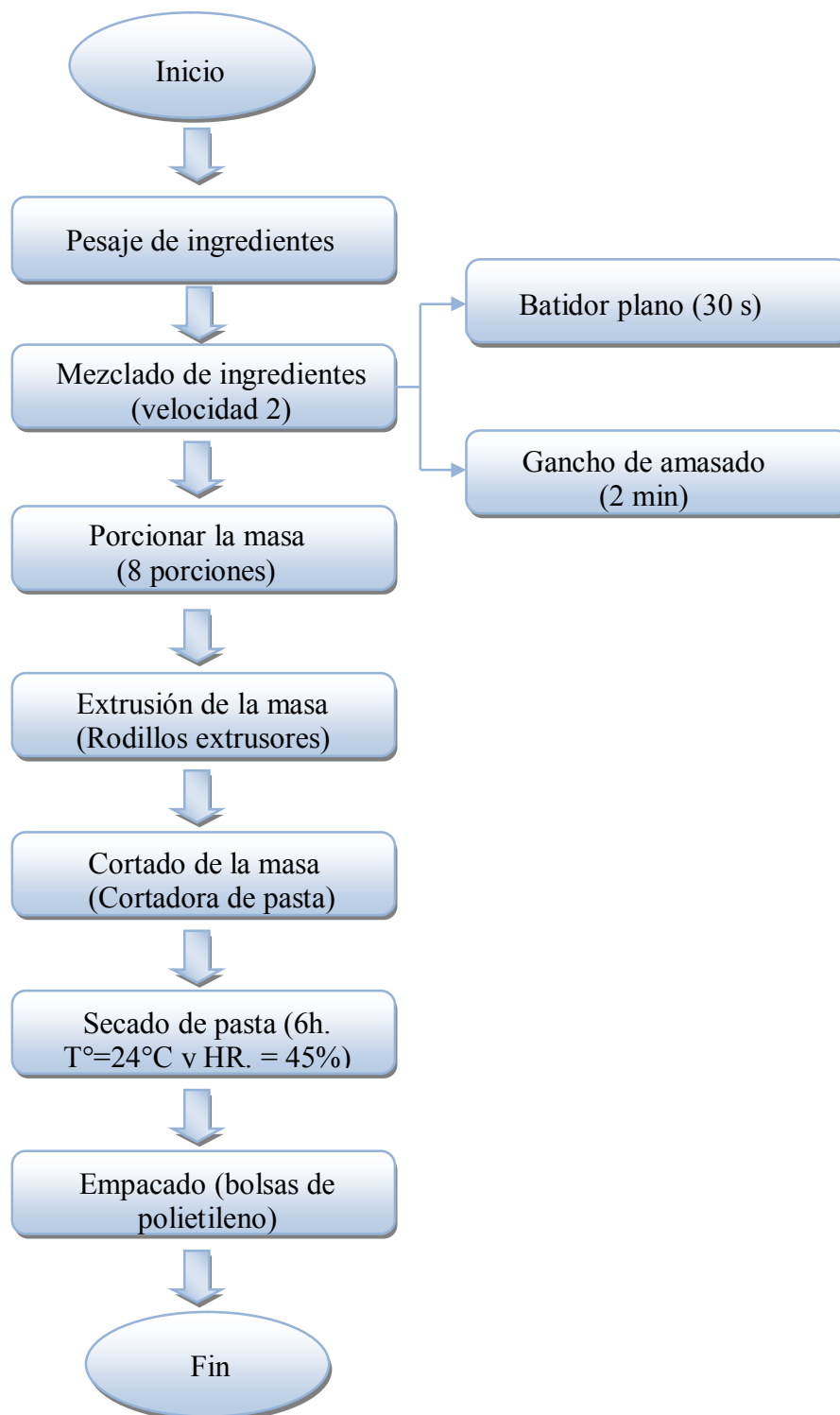


Figura 1. Flujo de proceso para pasta de harina de trigo con espirulina

3.10. ANÁLISIS SENSORIAL DE PREFERENCIA

Se realizó un análisis sensorial de prueba de escala preferencial simple, se solicitó a los panelistas elegir la muestra preferida, medianamente preferida y la menos preferida. Se utilizó una escala hedónica ordinal, otorgándole un valor de 1 a la muestra preferida, 2 medianamente preferida y 3 menos preferida. El análisis fue realizado el mismo día del procesamiento mediante una hoja de evaluación con las instrucciones y características a evaluar (Anexo1).

3.11. CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B₁₂ POR MEDIO DE HPLC TOMANDO COMO REFERENCIA EL MÉTODO DE FERNÁNDEZ. T, *et al.*, (2001) PARA PASTA DE HARINA DE TRIGO CON ESPIRULINA

- Se molió con un mortero muestra seca de la pasta de harina de trigo con espirulina.
- Se pesó en un beaker cubierto con papel aluminio 10g de muestra seca molida.
- Se agregó 50 ml de agua destilada y con una pipeta se añadió 6ml de la solución de cianuro de sodio al 1%.
- Se ajustó y midió el pH entre 4.6-5 con una solución de ácido clorhídrico 1N.
- Se colocó la muestra en baño de agua a 60° C por una hora.
- Se agregó 50ml de acetona para purificar el extracto.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, posteriormente se recolectó el sobrenadante y se evaporó en rotavapor con 137.9 Kpa de vacío por 20 minutos a 65°C para eliminar la acetona remanente.
- Se filtró al vacío la muestra evaporada y después se colocó en un vial topacio.

Se encendió la bomba cuaternaria y se dejó fluir la fase móvil durante aproximadamente 15 minutos hasta que la línea base del cromatógrafo se estabilizara para poder inyectar y realizar la lectura de la muestra.

Se inyectó cada muestra en el HPLC y se realizaron 3 inyecciones por cada repetición de pasta con espirulina. De esta manera se identificó el área y consecuentemente la concentración de vitamina B₁₂ (µg/ml).

3.12. ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEPTACIÓN

Se empleó un grupo de diez panelistas no capacitados. Los panelistas recibieron una inducción acerca de la forma de evaluar y procedieron a calificar las muestras según su criterio.

1. Se preparó el lugar de la prueba, cada muestra de pasta con alga espirulina fue rotulada con números aleatorios para no influir en los resultados.

2. Se proporcionó a cada panelista su propio material de degustación, agua y galletas de soda como limpiadores del paladar entre cada una de las muestras. Así también, una hoja de evaluación con las instrucciones y características a evaluar en cada muestra.

Se realizó prueba afectiva de aceptación de pasta de harina de trigo con 7% de espirulina al día 0 y 30 de procesamiento, utilizando una escala hedónica de 5 puntos (5 me gusta mucho). Se obtuvo resultados mediante una hoja de evaluación con las instrucciones y características a evaluar (Anexo 2).

3.13. PRUEBA SENSORIAL TRIANGULAR

Se realizó una prueba sensorial triangular discriminatoria con tres muestras: dos con 30 días de almacenamiento (A) y una procesada el día de la evaluación (B). Las muestras se presentaron siguiendo el esquema de aleatoriedad ABA. A través de una hoja de evaluación sensorial (Anexo 3) se solicitó a los panelistas determinar la muestra de pasta con espirulina diferente de las tres muestras presentadas. Se utilizó el análisis estadístico de chi cuadrado para obtener resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO HPLC PARA VITAMINA B₁₂

Para la calibración del método HPLC para vitamina B₁₂ se consideraron parámetros cuantitativos y cualitativos con los que se determinó las áreas promedio de las concentraciones conocidas inyectadas en el HPLC.

4.1.1. Análisis cuantitativo de vitamina B₁₂ por HPLC

Se obtuvo un coeficiente de variación de las áreas obtenidas en el cromatograma correspondiente a cada nivel de inyección menor a 5%, lo que indica una precisión aceptable del instrumento bajo las condiciones establecidas, a excepción del nivel de 0.41 µg de cianocobalamina, que presentó un coeficiente de variación de 12.54% debido al grado de dificultad para realizar una dilución con una baja concentración (Cuadro 6).

Cuadro 6. Indicadores de precisión para la calibración con estándares de cianocobalamina

µg de cianocobalamina [^]	Área promedio ^Δ	% Coeficiente de variación
10.01	96.78	1.02
5.03	47.69	1.30
3.02	27.67	2.15
1.02	8.93	3.76
0.60	4.71	4.05
0.41	2.55	12.54

[^] Microgramos de cianocobalamina inyectados en el HPLC

^Δ Área bajo la curva promedio correspondiente a su respectivo nivel de cianocobalamina.

4.1.2. Análisis cualitativo de vitamina B₁₂ por HPLC

En los estándares corridos por triplicado en el HPLC se identificó que todos los niveles de cianocobalamina presentaron la pendiente máxima del pico a un tiempo de retención promedio de 2.50 minutos con una desviación estándar de 0.07 (Anexo 1-4).

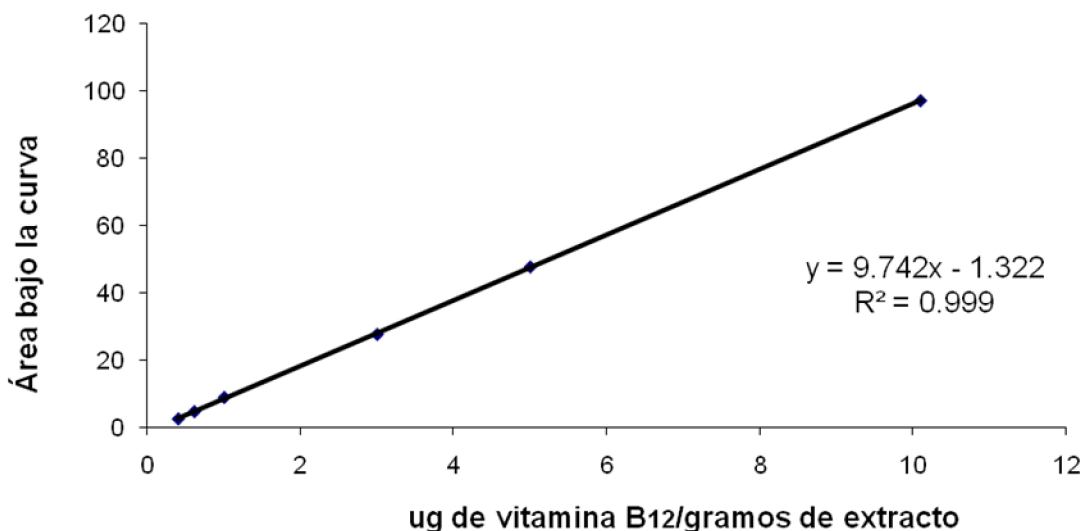


Figura 2. Curva de calibración para cianocobalamina – método HPLC

En la Figura 2 se observa que el modelo estadístico presentó una tendencia lineal alta ($R^2 = 0.999$) entre la concentración de vitamina B₁₂ y el área bajo la curva obtenida por el HPLC. Este alto grado de ajuste del modelo se permitió predecir la concentración de vitamina B₁₂ en alimentos con la precisión requerida para ser usada en el laboratorio con la ayuda de la ecuación $y = 9.742x - 1.322$, en la que “y” es el área bajo la curva obtenida del HPLC y “x” es la concentración de vitamina B₁₂ presente en el alimento.

4.2. VALIDACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Según los datos de la Cuadro 7 al realizar la prueba T-student se obtuvo $Pr > |t|$ 0.4064, resultado que demuestra que la concentración conocida de la dilución de vitamina B12 es estadísticamente igual a la concentración reportada por el HPLC. Con este resultado queda validada la curva de calibración.

Cuadro 7. Datos cuantitativos de la curva de validación

Concentración conocida (µg/ml)	Concentración reportada (µg/ml)	Promedio (µg/ml)	%C.V.
15.04	15.08	15.03	0.04
	14.97		
	15.04		
7.02	7.11	7.09	0.018
	7.08		
	7.07		
2.08	2.05	2.02	0.09
	2.03		
	1.99		
0.70	0.71	0.72	0.02
	0.73		
	0.72		
0.51	0.69	0.55	0.18
	0.55		
	0.40		

4.3. ANÁLISIS SENSORIAL DE PREFERENCIA

Las muestras con 3 y 10% de alga espirulina se juzgaron con valores dentro del rango de (13-27) / (14-26) obtenidos de la tabla G-23 por lo que estas muestras se determinaron como no preferidas, la muestra con 7% de alga espirulina fue juzgada con valores fuera del rango de la tabla G-23 para las condiciones evaluadas por lo que fue elegida como la muestra preferida por los panelistas. La pasta de harina de trigo con 7% de espirulina fue seleccionada para la cuantificación de vitamina B₁₂ después del procesamiento y durante el almacenamiento por ser calificada por los panelistas como la muestra preferida (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultado del análisis sensorial de preferencia para muestras de pasta de alga espirulina

MUESTRAS	PREFERENCIA ^
Pasta con 3 % de alga espirulina	24 ^a
Pasta con 7 % de alga espirulina	11 ^b
Pasta con 10 % de alga espirulina	25 ^a

^ Preferencia de pasta con alga espirulina, siendo 1 la más preferida y 3 la menos preferida. Separación de medias DUNCAN.

La tendencia de los panelistas a escoger la concentración intermedia de los tres tratamientos, se debió a la baja intensidad del color que presentó la pasta de harina de trigo con 3% de espirulina mientras que la pasta con 10% de espirulina tuvo un color muy oscuro. Además, la textura más hulosa de la pasta de harina de trigo con concentraciones de 3 y 10% de espirulina contribuyó a que fueran menos preferidas. Según los panelistas la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina fue la que presentó el mejor color, textura e intensidad de sabor a espirulina, parámetros por los que fue preferida.

4.4. CONCENTRACIÓN DE VITAMINA B₁₂ EN PASTA DE HARINA DE TRIGO CON ESPIRULINA

4.4.1. Concentración de vitamina B₁₂ antes y después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina

La pérdida de vitamina B₁₂ después del procesamiento de la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración de vitamina B₁₂ antes y después del procesamiento de pasta con 7% de espirulina

MUESTRA	µg de vitamina B₁₂ [^] ± D.E.
Pasta antes del procesamiento	5.642 ± 0.557 _a *
Pasta después del procesamiento	3.776 ± 0.241 _b *

[^] Cantidades en µg de vitamina B₁₂/10 gramos de alimento.

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Separación de medias LSD.

Durante el proceso de extrusión la mezcla pasta de harina de trigo con espirulina pasa por un aumento de temperatura debido a la fricción producida por la velocidad de los rodillos y es sometida a un período de secado. Estos dos subprocesos causan una disminución de 65% de agua que es uno de los agentes causantes de la pérdida de vitamina B₁₂ después del procesamiento, además que la vitamina B₁₂ se degrada en presencia de luz y durante el procesamiento está expuesta a la luz. Estos factores son probables causantes de la pérdida del 40% de vitamina B₁₂ después del procesamiento.

Los parámetros de extrusión que afectan la calidad nutritiva en alimentos son la composición del material de la alimentación, contenido de agua, caudal de alimentación del material, velocidad del tornillo, configuraciones del tornillo, temperatura del cilindro (Guy, 2002).

Según Valls (1993) la pérdida de vitamina B₁₂ después del procesamiento puede ser causa de la pérdida de humedad debido al proceso de elaboración.

4.4.2. Cambios en concentración de vitamina B₁₂ durante el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina

Se observó una pérdida estadísticamente significativa ($P < 0.05$) de cianocobalamina entre el día 7 y 14 de almacenamiento y posteriormente entre el día 14 y 30 de almacenamiento (Cuadro 10).

Cuadro 10. Cambios en concentración de vitamina B₁₂ en pasta con 7% de espirulina durante 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

TIEMPO	µg de vitamina B ₁₂ ^{±D.E.}
Día 0	3.776 ± 0.241 ^{a*}
Día 7	3.392 ± 0.191 ^{a*}
Día 14	2.518 ± 0.244 ^{b*}
Día 30	1.904 ± 0.629 ^{c*}

[^] Cantidades en µg de vitamina B₁₂ por 10 gramos de alimento.

* Letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Separación de medias DUNCAN.

Según ODS (2002) la vitamina B₁₂ es sensible a la luz y calor por lo que estos factores pueden provocar pérdidas considerables de cianocobalamina.

La luz y temperatura (24°C) a los que estuvo expuesta la pasta de harina de trigo con espirulina durante el almacenamiento fueron factores determinantes en la pérdida de vitamina B₁₂.

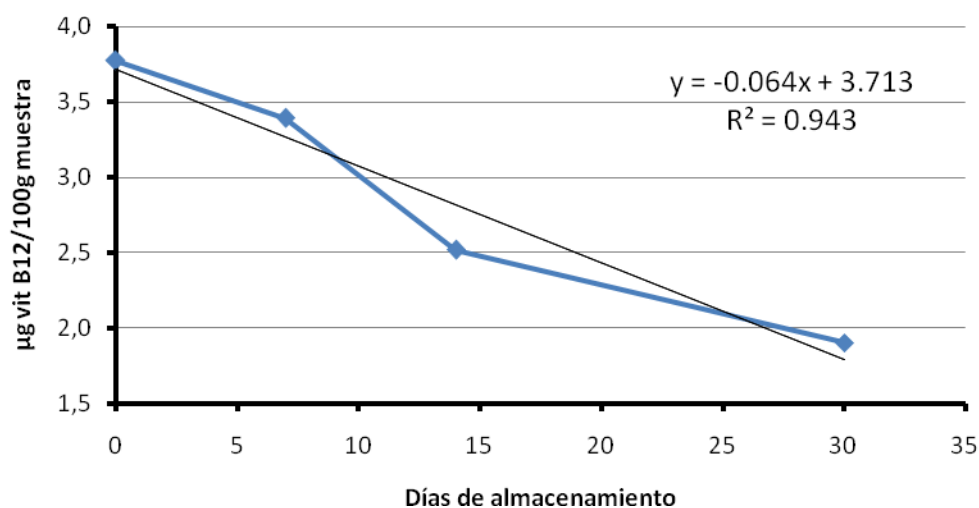


Figura 3. Pérdida de vitamina B₁₂ en el almacenamiento de la pasta de harina de trigo con espirulina

Como se observa en la Figura 3 la pérdida de vitamina B₁₂ presenta una tendencia lineal negativa con $R^2=0.943$ que indica una disminución lineal de cianocobalamina durante los 30 días de almacenamiento.

4.5. ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEPTACIÓN

En el análisis sensorial de aceptación para los parámetros evaluados apariencia, sabor y textura los resultados obtenidos de los panelistas para la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina con 0 días de almacenamiento fue “no me gusta ni me disgusta”. Para la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina con 30 días de almacenamiento los panelistas la valoraron como “no me gusta ni me disgusta”. En conclusión los panelistas no consiguieron establecer diferencias significativas ($P<0.05$) pasta de harina de trigo con espirulina a los 0 y 30 días de almacenamiento (Cuadro 11).

Cuadro 11. Resultados del análisis sensorial de aceptación para la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina

ATRIBUTOS	Pasta con alga espirulina [^] T=0días	Pasta con alga espirulina [^] T=30días
Apariencia	3.20 _a	3.60 _a
Aroma	2.90 _a	3.10 _a
Sabor	3.40 _a	3.00 _a
Textura	3.50 _a	3.80 _a
Apreciación general	2.90 _a	3.10 _a

[^] Aceptación de pasta con alga espirulina, siendo 5 me gusta mucho y 1 me disgusta mucho.

* Letras iguales no establecen diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$).

Los panelistas también evaluaron los parámetros aroma y apreciación general y los resultados obtenidos para la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina al día 0 de almacenamiento fue “me desagrada poco” mientras que la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina al día 30 de almacenamiento fue valorada como “no me gusta ni me disgusta”. Aunque tienen dos valoraciones generales diferentes al evaluar los resultados de todos los panelistas con programa estadístico SAS® se estableció que los panelistas no encontraron diferencias significativas entre la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina al día 0 y 30 de almacenamiento (Cuadro 11).

4.6. PRUEBA SENSORIAL TRIANGULAR

De acuerdo a la prueba de chi cuadrado en la que el chi cuadrado de lo observado es menor (0.05) al chi cuadrado de la Tabla G-7 (2.71), los panelistas no detectaron diferencias significativas entre las muestras de pasta con espirulina evaluadas el mismo

día de procesamiento y al día 30 de almacenamiento. Según los resultados obtenidos por el panel sensorial, la pasta de harina de trigo con 7% de espirulina no difirió en sabor después de un mes de almacenamiento a las condiciones establecidas en el estudio.

5. CONCLUSIONES

- El método de cuantificación de vitamina B₁₂ por HPLC demostró alta precisión y exactitud desde la concentración de 0.4 µg/ml de estándar de cianocobalamina hasta 10 µg/ml.
- Con el procesamiento de extrusión en frío se presentaron pérdidas de casi la mitad vitamina B₁₂.
- La pasta de harina de trigo con alga espirulina no presentó reducciones significativas en la concentración de vitamina B₁₂ hasta los 14 días de almacenamiento.
- La pasta de harina de trigo con 7% de alga espirulina fue el tratamiento preferido por los panelistas con una calificación intermedia.
- Los panelistas no consiguieron establecer diferencias significativas en las características sensoriales de la pasta con 7% espirulina después de 30 días de almacenamiento.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar la evaluación de pérdida de vitamina B₁₂ por procesamiento durante 3 meses.
- Evaluar la pasta de harina de trigo con espirulina como el desarrollo de un nuevo producto.
- Evaluar las características físicas y microbiológicas de la pasta de harina de trigo con espirulina.
- Realizar un estudio de mercado para cuantificar la demanda y determinar si se puede introducir al mercado como nuevo producto.

7. BIBLIOGRAFÍA

A.D.A.M. Inc., 2004. Vitamina B12. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002403.htm>. Consultado el 20 de julio de 2007.

Alimentación Sana. 2003. Las Pastas .Disponible en: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/Informaciones/Chef/pasta2.htm>. Consultado el 28 de agosto de 2007.

Alimentación Sana, 2006. Vitamina B12. Disponible en: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/vit%20B12.htm>. Consultado el 19 de julio de 2007.

Anzaldúa, A. 1994. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España. Págs 123-125.

AOAC, 2005. Oficial Method vitamin B12. Disponible en: <http://www.aoac.org/vmeth/newsmttd.htm>. Consultado el 10 de julio de 2007.

Civille. M. 1999. Sensory Evaluation Techniques (libro). Meilgaard, N., Civille, G.V. y Carr, B.T. (1999). Sensory evaluation techniques. Ed. CRC Press Inc, Boca Ratón, Florida.

Burkin, A. 2006. Spiruline component. Disponible en: http://www.spirulineburkina.org/component/option,com_frontpage/Itemid,48/lang,es/. Consultado el 27 de agosto de 2007.

Civille, G. 1999. Sensory evaluation techniques. Ed. CRC Press Inc, Boca Ratón, Florida. Págs. 105-108.

EROSKI. 2003. La pasta un alimento básico de la dieta mediterránea. Disponible en: http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/cereales_y_derivados/2003/08/01/63875.php. Consultado el 28 de agosto de 2007.

FAO, 2002. Colección FAO de las Naciones Unidas para la Alimentación y nutrición N° 29. 12p.

FAO. 2007. Procesamiento de frutas y vegetales .Disponible en: http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/new_else/x5691s/x5691s01.htm. Consultado el 28 de agosto de 2007.

Fernandez T, *et al.* 2001. Determinación de vitaminas del complejo B en *Arthospira maxima* por cromatografía líquida de alta resolución. *Ars Pharmaceutica*. Vol 9 (N°3):171-183.

Gratzfeld de HPLC Technologies, 1997. HPLC Análisis of vitamins in tablest using HPLC.

Guy, A. 2002. Principios y técnicas de extrusión. Ed. Anaya, S.A. Andalucía. España. Págs 87-95.

IFT, 2000. Food Industry Resources. Disponible en: <http://www.ift.org/cms/>. Consultado el 17 de agosto de 2007.

INTA. 2004. Alimentos frescos versus enlatados frescos versus enlatados. Disponible en: http://www.inta.cl/revista/detalle.asp?codigo_revista=5&Id=50. Consultado el 28 de agosto de 2007.

ISSSTE. 1997. Determinación de vitamina B₁₂ por el método microbiológico. Disponible en: <http://info4.juridicas.unam.mx/ijure/nrm/1/288/24.htm?s=iste>. Consultado el 25 de agosto de 2007.

Nuyttens. 2004. Principios de cromatografía líquida. Disponible en: <http://openchemist.net/chemistry/chromatography/node1.php>. Consultado el 28 de agosto de 2007.

ODS. 2006. Dietary Supplement Fact Sheet: Vitamin B12. Disponible en: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/vitaminb12.asp>. Consultado el 25 de agosto de 2007.

Picallo. 2002. El Análisis Sensorial como Herramienta de Calidad de Carne y Productos Cárnicos de Cerdo. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/Tecnologia/Jornadas/Resumenes/Resumen%20Conferencia%20Alejandra%20Picallo.doc>. Consultado el 28 de agosto de 2007.

Ramírez y Olivera, 2006. Uso Tradicional y actual de spirulina sp. *Interciencia*. Vol 31 (N°009):65-77.

Roeper, G. 2004. La espirulina como prevención de enfermedades. Disponible en: <http://www.supernatural.cl/prevencionspirulina.asp>. Consultado el 28 de agosto de 2007.

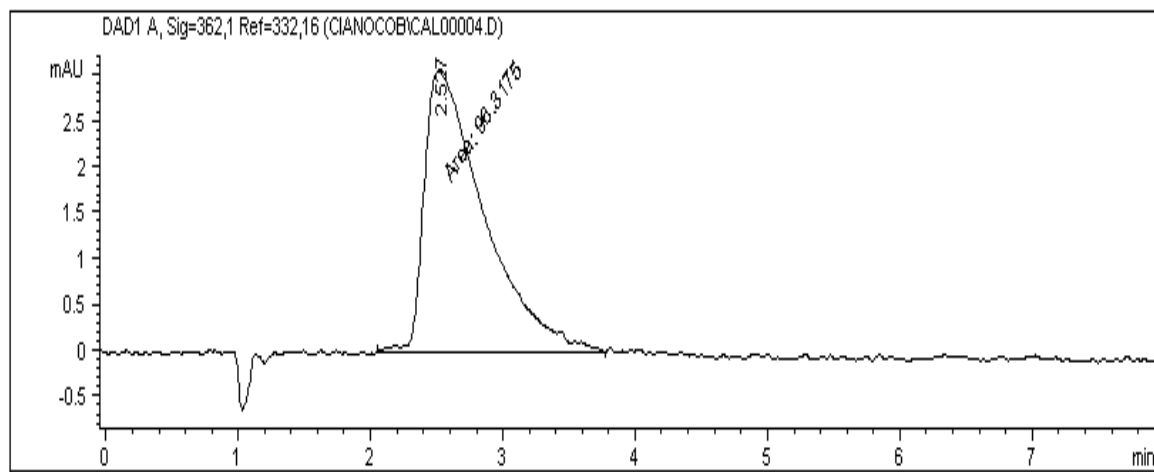
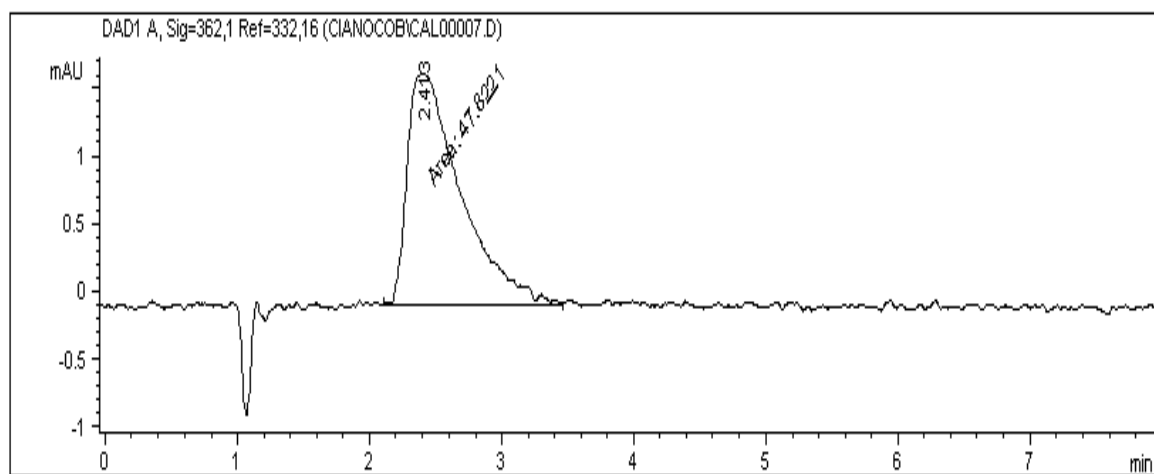
Stembel, C. 2004. Que son las algas espirulina. Disponible en: http://www.andexs.com/doc/ficha_01_que_son_las_algas_spirulina.pdf. Consultado el 27 de agosto de 2007.

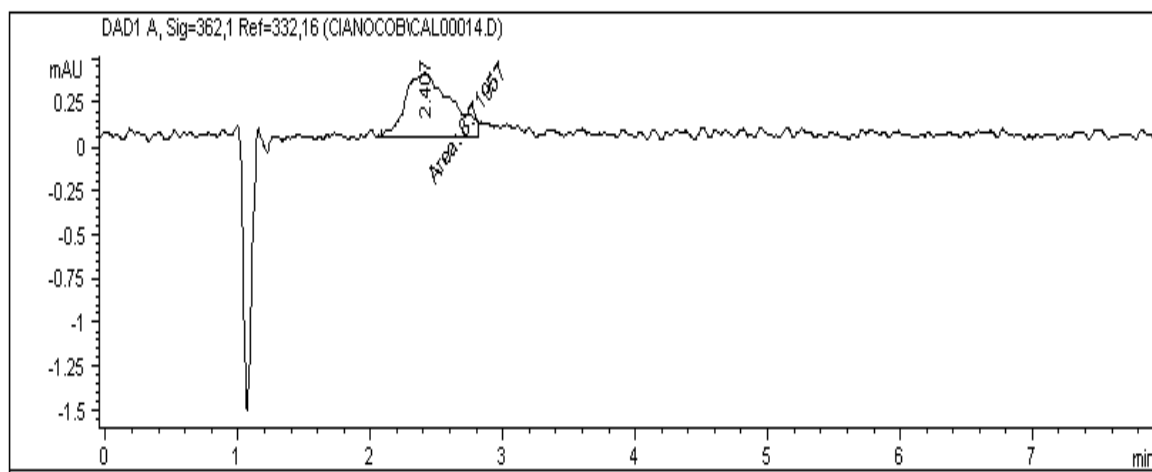
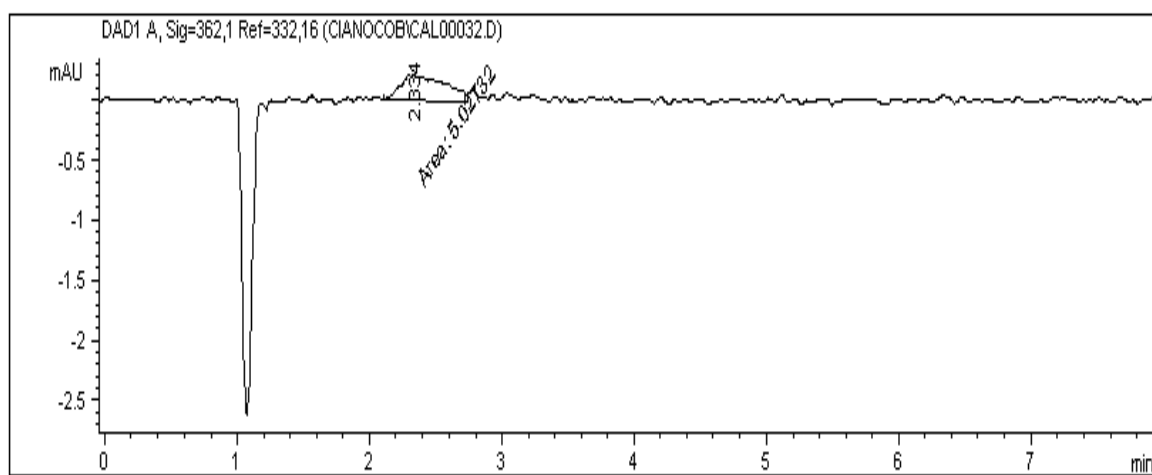
Universidad de Navarra, 2002. Alimentos ricos en vitamina B12. Disponible en: http://www.cun.es/fileadmin/Image_Archive/contenidossalud/ani/vitaminas.swf. Consultado el 27 de septiembre de 2007.

Valls, A. 1993. Efecto de la extrusión sobre la utilización de nutrientes. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/75-extrusion_en_cereales_y_soja_I.htm. Consultado el 28 de agosto de 2007.

Vonshak y Tomaselli, 2000. Future of agricultura. Agricultural and Food Chemistry. Vol 7 (N°1):71-73.

8. ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración 10 µg/ml.**Anexo 2. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración 5 µg/ml.**

Anexo 3. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración 1 µg/ml.**Anexo 4. Cromatograma de estándar de cianocobalamina a concentración 0.6 µg/ml.**

Anexo 5. Hoja para evaluación sensorial de preferencia**PRUEBA POR ORDEN DE PREFERENCIA****Fecha:** 7 de Julio de 2007**NOMBRE:** _____

Pruebe las muestras, siguiendo el orden marcado a continuación:

Primero	693
Segundo	213
Tercero	864

Coloque en la casilla el número de la muestra siguiendo un orden decreciente de preferencia

Más preferida	
Medianamente preferida	
Menos preferida	

Favor comente las razones de su preferencia

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACION

Anexo 6. Hoja para evaluación sensorial de aceptación

Prueba de aceptación para pasta con espirulina

Nombre _____ Fecha _____

Muestra: _____

Instrucciones: Observe y pruebe la muestra de pasta e indique el grado en que le gusta o desagrada cada muestra. Encierre el número correspondiente a la descripción que UD. Considere apropiado de acuerdo a su criterio de aceptación. Recuerde tomar agua y galleta de soda antes de hacer la evaluación.

1.) Apariencia

Observaciones

1	2	3	4	5	
Me desagrada	Me desagrada	No me agrada	Me gusta		_____
Mucho	poco	ni me desagrada	poco		mucho _____

2.) Aroma

1	2	3	4	5	
Me desagrada	Me desagrada	No me agrada	Me gusta		_____
Mucho	poco	ni me desagrada	poco		mucho _____

3.) Sabor

1	2	3	4	5	
Me desagrada	Me desagrada	No me agrada	Me gusta		_____
Mucho	poco	ni me desagrada	poco		mucho _____

4.) Textura

1	2	3	4	5	
Me desagrada	Me desagrada	No me agrada	Me gusta		_____
Mucho	poco	ni me desagrada	poco		mucho _____

6.) Apreciación General

1	2	3	4	5	
Me desagrada	Me desagrada	No me agrada	Me gusta		_____
Mucho	poco	ni me desagrada	poco		mucho _____

GRACIAS POR SU COLABORACION

Anexo 7. Hoja para evaluación sensorial prueba triangular

Prueba de aceptación para pasta con espirulina

Nombre _____ Fecha _____ Muestra: _____

Instrucciones: Observe y pruebe las 3 muestras de pasta e indique la que usted considera diferente. Encierre el número correspondiente a la descripción. Recuerde tomar agua y galleta de soda antes de hacer la evaluación.

Códigos			Muestra Diferente
589	451	872	

GRACIAS POR SU COLABORACION