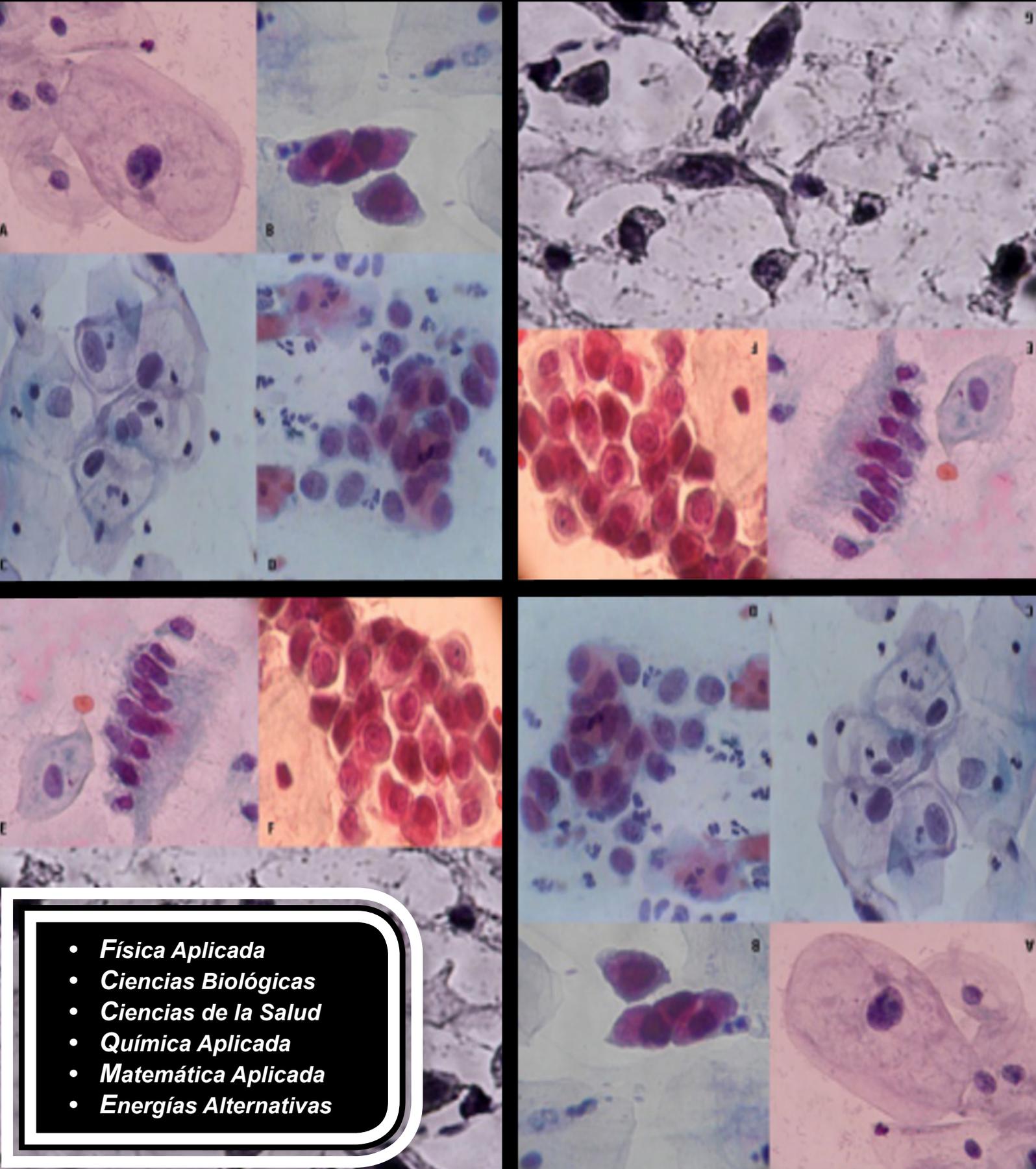


# Perfiles

Perf: Número 21  
Vol. 1 - 2019  
ISSN: 2477-9105  
Enero - Junio 2019



- *Física Aplicada*
- *Ciencias Biológicas*
- *Ciencias de la Salud*
- *Química Aplicada*
- *Matemática Aplicada*
- *Energías Alternativas*



### **Autoridades de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo**

Ing. Byron Ernesto Vaca Barahona Ph.D.  
Rector

Dra. Gloria Elizabeth Miño Cascante Ph.D.  
Vicerrectora Académico

Ing. Luis Rafael Fiallos Ortega Ph.D.  
Vicerrector de Investigación y Posgrado

Dra. Rosa Del Carmen Saeteros Hernández Ph.D.  
Vicerrectora Administrativo

Ing. Hugo Moreno A., Ph.D.  
Director Instituto de Investigaciones

Revista Internacional Arbitrada  
Distribución libre

### **CORRESPONDENCIAS Y SUSCRIPCIONES**

Revista Perfiles  
Panamericana Sur, km 1½  
Riobamba, Ecuador  
Telef.: (593) (03) 2998200 ext. 161  
e-mail: [revistaperfiles@epoch.edu.ec](mailto:revistaperfiles@epoch.edu.ec)

PERFILES (ISSN 2477-9105) es una revista científica semestral publicada por la  
Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

ESPOCH  
Riobamba – Ecuador  
Año XIX  
Número 21

## CUERPO EDITORIAL

### EDITOR

Celso Guillermo Recalde Moreno.  
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo  
Facultad de Ciencias (Chimborazo, Ecuador). [crecalde672000@yahoo.com](mailto:crecalde672000@yahoo.com)

### CO EDITOR

Manuel Morales Yuste.  
Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia (Granada, España). [manumorayus@hotmail.com](mailto:manumorayus@hotmail.com)

## COMITÉ EDITORIAL

Elio Giroletti  
University of Pavia (Pavia PV, Italia). Email: [elio.giroletti@unipv.it](mailto:elio.giroletti@unipv.it)

Sabino Menolasina  
Universidad de los Andes  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Mérida-Venezuela). Email: [menolasina1960@gmail.com](mailto:menolasina1960@gmail.com)

Benito del Castillo García  
Universidad Complutense de Madrid  
Académico Numerario de la Real Academia de Farmacia (Madrid, España). Email: [b.delcastillo@academiadefarmacia-castillayleon.es](mailto:b.delcastillo@academiadefarmacia-castillayleon.es)

Salvador González Carcedo  
Universidad de Burgos  
Facultad de Ciencias(Burgos,España). Email: [salva@ubu.es](mailto:salva@ubu.es)

Andrés León Leal  
Universidad de los Andes  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Mérida, Venezuela). Email: [leonand@ula.ve](mailto:leonand@ula.ve)

Plácido Moreno Beltrán  
Universidad de Sevilla  
Departamento de Manejo de Gestión Industrial.(Sevilla, España). Email: [placidomorenobeltran@gmail.com](mailto:placidomorenobeltran@gmail.com)

Francisco Morillas Márquez  
Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia (Granada, España). Email: [fmorilla@ugr.es](mailto:fmorilla@ugr.es)

César A. Cisneros Ramírez  
Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría  
Centro de Estudios de Tecnologías Energéticas Renovables (La Habana, Cuba). Email: [cesar@ceter.cujae.edu.cu](mailto:cesar@ceter.cujae.edu.cu)

David Jaramillo Abril  
Universidad Nacional de Chimborazo  
Instituto de Ciencia e Innovación, Tecnología y Saberes (Chimborazo, Ecuador). Email: [djaramillo@unach.edu.ec](mailto:djaramillo@unach.edu.ec)

Jorge L. Mírez Tarrillo  
Universidad Nacional de Ingeniería (Lima, Perú). Email: [jmirez@uni.edu.pe](mailto:jmirez@uni.edu.pe)

Carlos F. Ávila Vega  
Escuela Politécnica Nacional  
Facultad de Ingeniería Mecánica (Quito, Ecuador). Email: [cavila67@caltech.edu](mailto:cavila67@caltech.edu)

Jenny M. Moreno Mora  
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo  
Facultad de Ciencias (Riobamba, Ecuador). Email: [jennymorenom@yahoo.com](mailto:jennymorenom@yahoo.com)

Washington N. Logroño  
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ (Leipzig, Alemania). Email: vintilog@gmail.com

## COMITÉ CIENTÍFICO

### Director

Juan Marcelo Ramos Flores  
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo  
Facultad de Ciencias (Riobamba, Ecuador). Email: jmarceloramos@gmail.com

### Miembros

Gerardo E. Medina Ramírez  
Universidad de los Andes  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Mérida, Venezuela). Email: medinag47@gmail.com

Adriana C. Rincón Alarcón  
Universidad de los Andes  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Mérida, Venezuela). Email: rinconadri@yahoo.com

Morella L. Guillén Ferraro  
Universidad de los Andes  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Mérida, Venezuela). Email: morellaguillen@hotmail.com

José Mejía López  
Pontificia Universidad Católica de Chile  
Facultad de Física (Santiago, Chile). Email: jmejia@puc.cl

Rubén Mario Caffera  
Universidad de la República  
Facultad de Agronomía (Montevideo, Uruguay). Email: rmcaffera@yahoo.com

John Martin Evans  
Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Arquitectura (Buenos Aires, Argentina). Email: evansjmartin@gmail.com

Silvia de Schiller  
Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Arquitectura (Buenos Aires, Argentina). Email: sdechiller@gmail.com

Natali Alejandra Chávez Oleas  
Ministerio de Electricidad y Energía Renovable  
Dirección de Aplicaciones Nucleares (Quito, Ecuador). Email: natali.chao@gmail.com

Freddy Benalcázar  
Hospital José Carrasco Arteaga (Cuenca, Ecuador). Email: f.benalcazar@yahoo.es

Robert Guzmán  
Universidad de la Frontera  
Departamento de Ciencias Físicas (Temuco, Chile). Email: robert.guzman@ufrontera.cl

### Revisor Texto en Inglés

Jorge Juan Villarroel Santillán. Email: jjvillarroels@outlook.com

### Diseño, Diagramación, Maquetación

Luis Mullo Chicaiza. Email: luis\_mulloch@yahoo.com

Carina Yaucán Villa. Email: carina\_yaucan@yahoo.com

## CONTENIDO

### **ESTUDIO DE POTENCIA DE PRUEBAS DE NORMALIDAD USANDO DISTRIBUCIONES DESCONOCIDAS CON DISTINTOS NIVELES DE NO NORMALIDAD.**

Pablo Flores Muñoz, Laura Muñoz Escobar, Tania Sánchez Acalo.....4

### **EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL SISTEMA DE AGUA QUE ABASTECE A LAS PLANTAS PROCESADORAS DE QUESO FRESCO ARTESANAL DE LA PARROQUIA QUIMIAG-RIOBAMBA-ECUADOR**

Paola Arguello-Hernández, Ligia Carrillo, Sandra Escobar-Arrieta, Nelly Guananga-Díaz, Félix Andueza, AnaAlbuja-Landi.....12

### **Evaluación de la actividad cicatrizante de hierba mosquera (*Cronton elegans Kunth*) en ratones (*Mus musculus*)**

Cecilia Toaquiza Aguagallo, Cristina Tigse Moposita, Elizabeth Escudero Vilema, Aída Miranda Barros, Víctor Guangasig Toapanta.....20

### **ELECTRORREMEDIACIÓN DE CADMIO Y NÍQUEL DE PASIVOS AMBIENTALES DE SUELO CONTAMINADO POR DERRAMES DE PETRÓLEO**

Fausto Yaulema Garcés, Andrés Beltrán, Jenner Baquero, Cristian Carrera, Alex Gavilanes Montoya.....26

### **OBTENCIÓN DE DETERGENTE LÍQUIDO USANDO SAPONINA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd*), CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) CABUYA (*Sisalana perrine*) Y SU DISEÑO DE PRODUCCIÓN**

Mario-Gustavo Villacrés Alvarez, Cristina-Gabriela Calderón Tapia, Lourdes-María Cauja Moyón, Talía-Manuela Arcos Guamán.....37

### **HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON $\beta$ -galactosidasa DE *Kluyveromyces lactis* PARA LA OBTENCIÓN DE JARABE DE LACTOSUERO**

Mabel Parada Rivera, Zoila Tapia González, Evelyn Llerena Toledo, Francisco Carreras García, Paúl Manobanda Pinto.....44



# ESTUDIO DE POTENCIA DE PRUEBAS DE NORMALIDAD USANDO DISTRIBUCIONES DESCONOCIDAS CON DISTINTOS NIVELES DE NO NORMALIDAD.

## STUDY OF THE POWER OF TEST FOR NORMALITY USING UNKNOWN DISTRIBUTIONS WITH DIFFERENT LEVELS OF NON NORMALITY.

<sup>1</sup>Pablo Flores Muñoz\*, <sup>2</sup>Laura Muñoz Escobar, <sup>1</sup>Tania Sánchez Acalo

<sup>1</sup>Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Grupo de Investigación en Ciencia de Datos, Riobamba, Ecuador

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias de la Educación, Humanas y Tecnologías, Riobamba, Ecuador

\* p\_flores@epoch.edu.ec

### Resumen

La mayoría de pruebas de hipótesis paramétricas están sujetas al cumplimiento de normalidad. Debido a la gran variedad de opciones para contrastar este supuesto, se considera como mejor alternativa el test que presente una mayor potencia. Investigaciones preliminares estiman este valor a partir de muestras provenientes de distribuciones no normales conocidas pero cuyo alejamiento o contaminación respecto a la normalidad se desconoce. En el presente estudio seleccionamos siete pruebas que además de ser las más comunes parecen ser las mejores. Mediante un proceso de simulación, estimamos la potencia de cada una de ellas usando muestras provenientes de distribuciones desconocidas, pero con un alejamiento medible de la normalidad. Parece ser que el test de Shapiro – Wilk es la mejor opción, su potencia es muy elevada, pero solo para muestras no normales grandes y alejamientos fuertes. Para distribuciones con alejamientos débiles y muestras pequeñas parece ser que ninguna de las pruebas tradicionales en estudio es buena. Se discute un posible mal planteamiento de estos test y su incidencia en los resultados obtenidos. Finalmente se introduce la posibilidad de incluir pruebas basadas en el enfoque de equivalencia, las cuales quizás podrían resultar mejores que las pruebas estudiadas.

**Palabras claves:** Pruebas de normalidad, Potencia, Coeficientes de Fleishman, Equivalencia, Simulación.

### Abstract

Most parametric tests are subject to normality. There are forty different tests to prove this assumption. Preliminary researches to determine the best tests are based on the estimation of their power using samples from known non-normal distributions but whose distance or contamination from normality is unknown. In the present study, we selected seven better and more known tests. Through a simulation process, we estimate the power of each one using samples from unknown distributions but with a measurable distance from normality. It seems that Shapiro - Wilk test is the best option, its power is very high, but only for large non-normal samples and strong distances. For distributions with weak distances and small samples it seems that none of the traditional tests are good. We discuss a possible poor approach to these tests and their impact on the results obtained. Finally, the possibility of including a hypothesis test based on the equivalence approach is analyzed; perhaps this option is better than the traditional tests introduced.

**keywords:** Normality test, Power, Fleishman Coefficients, Equivalence, Simulation.

Fecha de recepción: 27-12-2018

Fecha de aceptación: 25-01-2019

## I. INTRODUCCIÓN

La mayoría de técnicas utilizadas para realizar inferencia estadística (pruebas de hipótesis, análisis de regresión, modelos de pronósticos, etc.) se basan en modelos paramétricos, los cuales a su vez están sujetos principalmente al cumplimiento del supuesto de normalidad. En la literatura estadística, varias pruebas de hipótesis se han propuesto con la finalidad de probar si un grupo de datos provienen o no de esta distribución teórica, de hecho, los trabajos de revisión reportan aproximadamente 40 test diferentes desarrollados con este fin (1,2,3).

Ante esta diversa gama de opciones, suponemos que la interrogante más frecuente con la que se encuentra un investigador que usa instrumentos estadísticos paramétricos tiene que ver con cuál es la mejor alternativa para probar el supuesto de normalidad en sus datos. En este sentido, múltiples investigaciones se han desarrollado con el fin de establecer un criterio de comparación que permita determinar objetivamente cuál opción es la más adecuada (4,5,6,7).

El criterio de comparación que usan estas investigaciones se basa en estimar mediante un proceso de simulación la potencia que tienen las distintas pruebas con el fin de recomendar aquellas cuya potencia resulte ser la más alta, es decir aquella prueba que maximice la probabilidad de rechazar la hipótesis nula de existencia de normalidad cuando realmente esta es falsa. Para asegurar esta condición de no normalidad, los trabajos mencionados usan muestras provenientes de distribuciones conocidas (gamma, exponencial, t - Student, uniforme, etc.)

En (6), se estimó la potencia de 33 pruebas de normalidad para distintos

tamaños muestrales ( $n=25,50,100$ ) y niveles de significancia ( $\alpha=0.05,0.10$ ), además con el fin de asegurar la condición de no normalidad en las muestras generadas utilizó distintas distribuciones no normales simétricas (Beta, Cauchy, Laplace, Logística, t - Student), asimétricas (chi - cuadrado, Gamma, Gumbel, Log - Normal, Weibull) y normales modificadas (normal truncada, normal contaminada, normal mezclada y normal con atípicos).

La potencia estimada en todos estos casos no se altera significativamente cuando el nivel de significancia es diferente y no se pudo definir alguna prueba en específico como más potente, puesto que existen varias opciones diferentes que dependen de la naturaleza de la no normalidad. Otro estudio más detallado que el anterior, el cual usa las mismas distribuciones teóricas para simular muestras no normales, determinó que para muestras simétricas, Shapiro - Wilk junto con Jarque - Bera son los test más potentes, mientras que para muestras asimétricas Shapiro - Wilk y Anderson - Darling parecen ser la mejor opción (7). En esta investigación, usando tamaños muestrales ( $n=20,30,40,50$ ), se determinó que si se generan muestras a partir de una Distribución Beta, el test más potente es Anderson - Darling, si las muestras son generadas por una Gamma o por una Log - normal, el test más potente es Jarque - Bera (5).

Todos estos estudios, tienen en común que para estimar la potencia generan muestras de distribuciones de probabilidad que, aunque es verdad que no son normales, muchas de ellas tienden a serlo de manera asintótica, lo cual creemos puede estar afectando de alguna manera los resultados encontrados. Además, pensamos que en un análisis real no necesariamente los datos disponibles deben ajustarse a alguna distribución no normal conocida como las presentadas en estudios previos, sino que en algunos casos (o quizás en la mayoría) tendrán una distribución totalmente desconocida. Aunque la generación de muestras desconocidas, a nuestro parecer es tan importante como aquellas que provienen de distribuciones conocidas, estas no se han presentado en ninguna de las investigaciones antes mencionadas. Es así que proponemos el siguiente estudio, donde mediante un proceso de simulación estocástica estimamos la potencia de siete pruebas de normalidad, usando el sistema de Fleishman (8) para la creación de muestras de distribución desconocida (pero que se sabe se encuentran en datos reales) con distintos niveles de alejamiento o contaminación de la normal.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### REVISIÓN DE PRUEBAS DE NORMALIDAD

Tomando en cuenta los resultados de investigaciones previas y considerando los test de normalidad más comunes en la mayoría de libros y software estadístico, proponemos el estudio de potencia de las siguientes pruebas para contrastar las hipótesis:

$H_0$  : Los datos provienen de una distribución normal

$H_1$  : Los datos no provienen de una distribución normal

#### Prueba de Kolmogorov – Smirnov (9; 10)

Sea  $X_{(1)}, X_{(2)}, \dots, X_{(n)}$  una muestra ordenada aleatoria, con función de distribución acumulada  $F(x_{(i)})$ , con  $1 \leq (i) \leq n$ , y sea  $Z_i$  la distribución de probabilidad acumulada de una distribución normal estándar. El estadístico de prueba para este test viene dado por:

$$D = \max(D^+, D^-)$$

Donde,  $D^+ = \max\{F(x_{(i)}) - Z_i\}$  y

$D^- = \max\{Z_i - F(x_{(i)})\}$ . Se rechaza  $H_0$  cuando  $D \geq d$  siendo  $d$  los puntos críticos que se encuentran en la tabla tabulada (9).

#### Test de Lilliefors (11)

Esta prueba es una modificación de Kolmogorov-Smirnov. Se sabe de antemano que KS es apropiada cuando se conoce los parámetros de la distribución hipotética (normal), sin embargo a veces o casi siempre es difícil conocer estos valores. En este sentido, el test Lilliefors usa las estimaciones de  $\mu$  y  $\sigma$  en función de los datos de la muestra. El estadístico y los valores críticos siguen siendo los mismos que KS.

#### Test de Shapiro – Wilk (12).

Sea  $X_1, X_2, \dots, X_n$  una muestra aleatoria, el estadístico de prueba para este test viene dado por:

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Con  $b = \sum_{i=1}^n a_i [X_{(n-i-1)} - x_i]$  y

$a_i = m'V^{-1}(m'V^{-1}m)^{-1/2}$ . Donde,

$[X_{(n-i-1)} - x_i]$  son las diferencias sucesivas que se obtiene al restar el primer valor al último valor, el segundo al antepenúltimo y así sucesivamente.  $a_i$ , son

los coeficientes tabulados en la tabla de Shapiro,  $m = (m_1, \dots, m_n)$  son los valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

Se rechazará  $H_0$  si  $W \leq W_{\alpha, n}$ , donde  $W_{\alpha, n}$  son los puntos críticos tabulados en (12).

#### Test de Anderson – Darling (13)

Sea  $X_1, X_2, \dots, X_n$  una muestra aleatoria de tamaño mayor que 5, el estadístico de prueba para este test viene dado por:

$$A^2 = - \frac{\sum_{i=1}^n (2i-1)(\ln(Z_i) + \ln(Z_{n+1-i}))}{n} - n$$

Donde  $Z_i$  es el cuantil de una distribución de probabilidad acumulada de una distribución normal estándar. De acuerdo al nivel de significancia y tamaño de muestra, rechazamos la hipótesis de normalidad cuando  $A^2$  es mayor que  $A_{c, \alpha}^2$ , donde  $A_{c, \alpha}^2$  son los puntos críticos tabulados en (14).

#### Test de Jarque – Bera (15)

Sea  $X_1, X_2, \dots, X_n$  una muestra aleatoria, el estadístico de prueba para este test viene dado por:

$$JB = n \left( \frac{S^2}{6} + \frac{(k-3)^2}{24} \right)$$

Donde,  $S$  representa el coeficiente de asimetría y  $k$  el coeficiente de curtosis. La hipótesis nula de normalidad se rechaza cuando  $JB > JB_{c,\alpha}$ , donde  $JB_{c,\alpha}$  es el valor crítico de una distribución chi – cuadrado, que deja a la derecha un área de  $\alpha$  con 2 grados de libertad.

### Test de Bondad de Ajuste $\chi^2$ (16)

Sea  $X_1, X_2, \dots, X_n$  una muestra aleatoria de tamaño mayor que 5, el estadístico de prueba para este test viene dado por:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde,  $k$  es el número de clases existentes,  $O_i$  son las frecuencias observadas en cada clase y  $E_i$  son las frecuencias esperadas. La hipótesis nula de normalidad se rechaza cuando  $\chi^2 > \chi_a^2$ , donde  $\chi_a^2$  es el valor crítico de una distribución chi cuadrado con  $k-1$  grados de libertad que deja a la derecha un área de  $\alpha$ .

### Test de Cramer – Von Mises (17).

Sea  $X_1, X_2, \dots, X_n$  una muestra aleatoria de tamaño mayor que 5, el estadístico de prueba para este test viene dado por:

$$W = \frac{1}{12n} + \sum_{i=1}^n \left( p_i - \frac{2i-1}{2n} \right)^2$$

Donde  $p_i = \Phi \left( \frac{x_i - \bar{x}}{s} \right)$ , siendo  $\Phi$  la función de distribución acumulada de una distribución normal estándar y además  $\bar{x}$  y  $s$  representan respectivamente la

media y desviación estándar muestral. Los valores críticos son calculados a partir del estadístico modificado

$Z = W \left( 1 + \frac{0.5}{n} \right)$ , de acuerdo a la Tabla 4.9 presentada en (2).

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS PROVENIENTES DE DISTRIBUCIONES DESCONOCIDAS.

Allen Fleishman, en el año 1978, desarrolló un método mediante el cual se pueden generar muestras aleatorias no normales cuya distribución se desconoce (8). Partiendo de una normal estándar  $Z$  ( $Z \sim N(\mu = 0, \sigma = 1)$ ), el autor demostró que una transformación lineal de esta variable, de la forma  $Y = a + bZ + cZ^2 + dZ^3$ , sigue una distribución totalmente desconocida de parámetros  $(\mu = 0, \sigma = 1, \gamma_1, \gamma_2)$ , donde  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  representan respectivamente los coeficientes poblacionales de simetría y curtosis, los cuales a su vez definen los grados de separación o contaminación de la normal.

En una posterior investigación (18), donde se recopiló 693 variables con distribución desconocida, provenientes de bases de datos reales (de las cuales 193 correspondieron a poblaciones diferentes), se estimó los coeficientes  $\gamma_1$  de simetría y  $\gamma_2$  de curtosis basados en el tercer y cuarto momento no central respectivamente. Los resultados mostraron un rango de valores para  $\gamma_1$  comprendido entre -2.49 y 2.33, mientras que para  $\gamma_2$  los valores encontrados fluctuaban en un intervalo de -1.92 a 7.41. Establecer puntos de corte para valores combinados de estos coeficientes permitió determinar diferentes niveles de alejamiento o contaminación de la normalidad.

Con la ayuda de funciones existentes en el software estadístico R (19), en el presente estudio utilizamos la transformación de Fleishman para generar muestras provenientes de distribuciones desconocidas. Los valores para los coeficientes (a,b,c,d) son determinados de acuerdo a los valores  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  propuestos a partir de las investigaciones desarrolladas en (18,20). Estos coeficientes se obtuvieron con la función “fleishman.coef” del paquete “BinNonNor” (21). Los valores de simetría, curtosis y coeficientes de Fleishman calculados con sus respectivos niveles de alejamiento de la normalidad, se muestran en la Tabla 1.

Nivel de Contaminación	Simetría	Curtosis	Coefficientes de Fleishman
Leve	0.25	0.7	(-0.037, 0.933, 0.037, 0.021)
Moderada	0.7	1	(-0.119, 0.956, 0.119, 0.0098)

<b>Alta</b>	1.3	2	(-0.249, 0.984, 0.249, -0.016)
<b>Severa</b>	2	6	(-0.314, 0.826, 0.314, 0.023)

Tabla 1. Simetría, Curtosis y coeficientes de Fleishman usados para generar muestras no normales.

### MÉTODO DE ESTIMACIÓN DE LA POTENCIA.

La potencia fue estimada a partir de una función propia de R, la cual implementa un algoritmo de simulación de montecarlo para dicho fin. El algoritmo consiste en crear muestras no normales de tamaño  $n=5,10,15,20,30,50,100$ , a partir de la transformación de Fleishman (usando los coeficientes dados en la Tabla 1.), luego las siete técnicas descritas en la Sección II para probar la hipótesis de normalidad son aplicadas sobre estas muestras, finalmente nos interesará guardar en un vector, un valor lógico que indique “TRUE” si la hipótesis se rechaza o “FALSE” en caso contrario. Este proceso se repite  $m=100000$  veces y la potencia queda estimada como la proporción de rechazos de la hipótesis nula. Dado que en investigaciones previas se comprobó que los resultados de la potencia son independientes del nivel de significancia, el valor  $\alpha$  usado en cada una de las pruebas fue de **0.05**.

### III. RESULTADOS

La Figura 1, resume la potencia determinada para cada una de las pruebas de normalidad para diferentes alejamientos de la distribución y distinto tamaño muestral.

De manera general, en todos los escenarios analizados se puede observar un comportamiento casi invariante de las potencias calculadas. Esta potencia se incrementa conforme aumenta el grado de alejamiento de la normal y el tamaño muestral crece, de este modo, por ejemplo para una contaminación leve y un tamaño muestral de 5, la potencia de todas las siete pruebas es demasiado baja (tiende al nivel de significancia 0.05), mientras que en el otro extremo, es decir cuando existe una contaminación severa y el tamaño muestral es 100, la potencia de todas las pruebas tiende a 1 (nivel de potencia más grande que puede alcanzar una prueba).

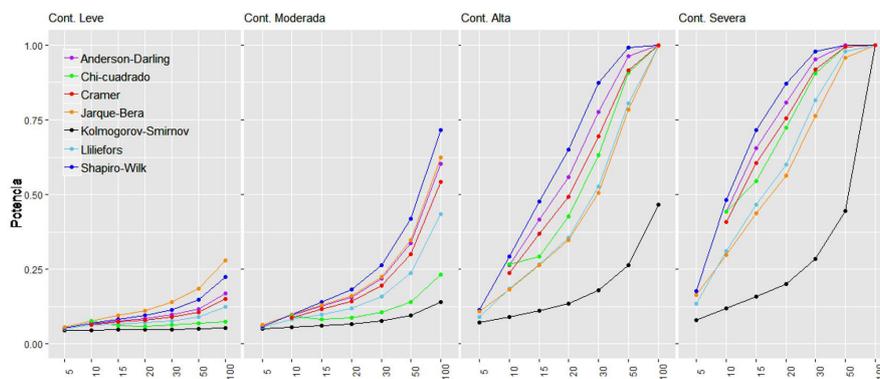


Figura 1. Potencia para diferentes niveles de contaminación, distintos tamaños muestrales y  $\alpha=0.05$

De manera específica, cuando la contaminación es leve, se puede observar que no muy distante de la Prueba de Shapiro – Wilk, el test de Jarque – Bera parece tener la potencia más alta independientemente del tamaño muestral usado, sin embargo, esta potencia decrece conforme el nivel de contaminación aumenta y a partir de un alejamiento moderado, la prueba de Shapiro Wilk parece ser la más potente de todas, por lo se recomienda su uso. Contrario a esto, independientemente del alejamiento y el tamaño muestral, la prueba de Kolmogorov – Smirnov

resulta ser siempre la peor y se desaconseja su uso. Los demás test analizados (Anderson D, Chi – cuadrado, Cramer y Lilliefors), siempre se encuentran entre los dos test más y menos potentes descritos.

### IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran evi-

dencia a favor del uso del test de Shapiro Wilk, el cual parece tener una mayor potencia respecto a los otros test analizados. Sin embargo, es muy importante hacer notar que, aunque este test es relativamente alto en todos los tamaños muestrales, en realidad en el intervalo  $[0, 1]$  donde toma valores, nunca supera un valor que podría ser aceptable (mínimo de 0.8) para muestras pequeñas. A partir de una contaminación alta, solo se observa una potencia elevada para el tamaño muestral  $n \geq 30$ . Esto parece ser razonable y coherente ya que solo estamos confirmando algo que en estadística suele ser muy común “todas las cosas mejoran cuando aumenta el tamaño muestral”.

Llama la atención, lo poco (o casi nada) potentes que resultan ser todas las pruebas analizadas cuando existe una contaminación leve o moderada, en este sentido podemos concluir que los test de normalidad solo pueden ser buenos cuando el alejamiento de la distribución teórica es fuerte, mientras que, para muestras con alejamientos débiles, estas pruebas tradicionales están lejos de ser efectivas. A nuestro criterio, lo que podría estar ocurriendo es que las muestras generadas con alejamiento leve y moderado, presentan un grado de contaminación tan pequeño que podría considerarse despreciable o irrelevante como para ser consideradas no normales.

Si analizamos un poco más a fondo, la hipótesis nula de los test en estudio sugiere que los datos siguen una normalidad perfecta, al respecto George Box en 1979 dijo “En la vida real no existe una distribución perfectamente normal, sin embargo, con modelos que se sabe que son falsos, a menudo se puede derivar resultados que coinciden, con una aproximación útil a los que se encuentran en el mundo real” (22). Entonces, según este enunciado, no tiene sentido realizar test de hipótesis que prueben una perfecta normalidad (ya sabemos que esto no existe). A nuestro criterio y de acuer-

do al enunciado de Box, tendría más sentido que en lugar de probar normalidad perfecta, se contraste una hipótesis que pruebe la existencia de una normalidad aproximada, es decir una normalidad que acepte desviaciones tan pequeñas que se puedan considerar despreciables o irrelevantes. Aunque es nuevo y no tan común, este enfoque para contrastar hipótesis, distinto al enfoque tradicional, estudiado en la mayoría de la literatura estadística existe y se denomina “pruebas de equivalencia” (23). Entendemos por equivalencia a una forma dilatada de una relación de identidad, la cual se induce al añadir en la hipótesis tradicional una zona de irrelevancia alrededor del correspondiente punto en el espacio paramétrico que denota perfecta normalidad, este enfoque conduce a diseñar un estudio que pretende demostrar ausencia de una diferencia relevante entre los efectos de dos distribuciones comparadas (una de ellas podría ser la normal), es decir equivalencia. En este sentido, resulta interesante la realización de investigaciones futuras sobre estimación de la potencia pero incorporando el criterio de equivalencia, de hecho existen ciertos estudios donde ya se demuestra la superioridad de este enfoque sobre el tradicional (24). Podría ser, que este criterio de equivalencia sea más potente, pero eso no lo sabremos hasta que se realicen las mediciones respectivas.

## V. CONCLUSIONES

A diferencia de otras investigaciones, donde para asegurar la no existencia de normalidad teórica, se usa distribuciones no normales conocidas, en el presente trabajo se usó el sistema de Fleishman, el cual nos permitió crear muestras no normales con un grado medible del alejamiento o contaminación. Este nuevo aporte para estudiar la potencia de las pruebas de normalidad, permitió tener la seguridad de que las muestras provienen de una distribución desconocida, independientemente del tamaño muestral, lo cual podría influir en una normalidad asintótica. Además, de esta forma se pudo obtener grados de contaminación a partir de los cuales se presenta una potencia relativamente alta, lo cual permitió detectar grados de alejamientos que se pueden considerar irrelevantes. Luego de comparar la potencia de siete pruebas de hipótesis para contrastar normalidad, hallamos que Shapiro – Wilk es el test más potente. Por tanto, esta prueba maximiza la probabilidad de cometer un acierto en el sentido de rechazar la hipótesis de normalidad perfecta dado que teóricamente esta es falsa. Sin embargo, la potencia de esta prueba es óptima siempre y cuando el tamaño muestral sea mayor que 30 ( $n \geq 30$ ) y para contaminaciones de

normalidad alta y severa.

Para contaminaciones leves y moderadas, a pesar que la potencia del test de Shapiro – Wilk es la más alta, no se puede considerar que es óptima, puesto que en ningún caso supera al menos un valor razonable de 0.80. Parece ser que estas dos contaminaciones de la normalidad, son

alejamientos que podrían considerarse tan irrelevantes que se podrían despreciar.

Un planteamiento hipotético de normalidad irrelevante en lugar de normalidad perfecta podría ser una mejor alternativa.

## Referencias

1. Recent and classical tests for normality-a comparative study. Baringhau, L, Danschke, R y Henze, N. 1, 1989, Communications in Statistics-Simulation and Computation, Vol. 18.
2. D'Agostino, Ralph y Stephens, Michael. Goodness-of-fit techniques (Statistics, a series of textbooks and monographs. New York : Marcel Dekker, 1986.
3. Tests of univariate and multivariate normality. Mardia, Kanti. 1980, Handbook of statistics, Vol. 1.
4. Simulation based finite sample normality test in linear regressions. Dufour, Jean-Marie, y otros. 1998, Econometrics Journal, Vol. 1.
5. A comparison of various tests of normality. Yazici, Berna y Yolacan, Senay. 2, 2007, Journal of Statistical and Simulation, Vol. 77.
6. An empirical power comparison of univariate goodness of fit test for normality. Romao, Xavier, Delgado, Raimundo y Costa, Aníbal. 5, May de 2010, Journal of Statistical Computation and Simulation, Vol. 80.
7. Comparisons of various types of normality tests. Yap, B y Sim, C. 12, December de 2011, Journal of Statistical Computation and Simulation, Vol. 81.
8. A method for simulating non-normal distributions. Fleishman, Allen. 4, 1978, Psychometrika, Vol. 43.
9. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. Kolmogorov, Andrey. 1933, Inst. Ital. Attuari, Giorn., Vol. 4.
10. Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions. Smirnov, Nickolay. 2, 1948, The annals of mathematical statistics, Vol. 19.
11. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. Lilliefors, Hubert. 318, 1967, Journal of the American statistical Association, Vol. 62.
12. An analysis of variance test for normality. Shapiro, SS y Wilk, MB. 3, 1965, Biometrika, Vol. 52.
13. Asymptotic theory of certain "goodness of fit" criteria based on stochastic processes. Anderson, Theodore y Darling, Donald. 1952, The annals of mathematical statistics, Vol. 23.
14. EDF statistics for goodness of fit and some comparisons. Stephens, Michael. 347, 1974, Journal of the American statistical Association, Vol. 69.
15. Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals. Jarque, Carlos y Bera, Anil. 3, 1980, Economics Letters, Vol. 6.
16. Greenwood, Priscilla y Nikulin, Michael. A guide to chi-squared testing. 280. s.l. : John Wiley & Sons, 1996.
17. On the composition of elementary errors: First paper: Mathematical deductions. Cramér, Harald. 1928, Scandinavian Actuarial Journal, Vol. 1.
18. Skewness and kurtosis in real data samples. Blanca, María, y otros. 2013, Methodology.
19. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Team, R Core. 2018, R Foundation For Statistical Computing. <https://www.R-project.org>.

20. Comparison of the procedures of Fleishman and Ramberg et al. for generating non-normal data in simulation studies. Bendayan, Rebecca, y otros. 1, 2014, *Annals of Psychology*, Vol. 30.
21. BinNonNor: Data Generation with Binary and Continuous Non-Normal Components. Inan, Gul y Demirtas, Hakan. 2018, R package version 1.4.
22. Robustness in the strategy of scientific model building. Box, George. 1979, *Army res off Work Robustness*, Vol. 1.
23. Wellek, Sthepan. Testing St atistical Hypothesis of equivalence and non Inferiority. 2010.
24. Heteroscedasticity Irrelevance when Testing Means Difference. Flores, Pablo y Ocaña, Jordi. 1, June de 2018, *SORT*, Vol. 42.
25. EDF statistics for goodness of fit and some comparisons. Stephens, Michael. 1974, *Journal of the American statistical Association*, págs. 730--737.



# EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL SISTEMA DE AGUA QUE ABASTECE A LAS PLANTAS PROCESADORAS DE QUESO FRESCO ARTESANAL DE LA PARROQUIA QUIMIAG-RIOBAMBA-ECUADOR

## PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT OF WATER SUPPLY SYSTEM, THAT PROVIDES WATER TO HANDMADE FRESH CHEESE FACTORIES LOCATED IN QUIMIAG-RIOBAMBA-ECUADOR

<sup>1</sup>Paola Arguello-Hernández\*, <sup>1</sup>Ligia Carrillo, <sup>1,2</sup>Sandra Escobar-Arrieta, <sup>2</sup>Nelly Guananga-Diaz, <sup>3</sup>Félix Andueza, <sup>1,2</sup>Ana Albuja-Landi

<sup>1</sup>Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo “SAGID”, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador

<sup>2</sup>Leishmaniosis y otras Parasitosis en el Ecuador “LEISHPAREC”, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador

<sup>3</sup>Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

\*p\_farguello@esepoch.edu.ec

### Resumen

La calidad del agua utilizada en las plantas de procesamiento de alimentos, influye en la calidad del producto final, siendo necesario su análisis y control. Este estudio analizó los parámetros físico-químicos y microbiológicos del sistema de agua que abastece a las queseras artesanales, ubicadas en la parroquia rural Quimiag. Las muestras fueron tomadas por triplicado en época de verano en 14 puntos del sistema de abastecimiento de agua. Estos puntos fueron las vertientes de agua natural, los tanques de almacenamiento y los grifos en las queseras y sus tanques de reserva. Los análisis efectuados fueron: turbiedad, color, pH, conductividad, sólidos totales, nitratos, nitritos, fluoruros, coliformes fecales, y parásitos, según las normas técnicas ecuatorianas y una norma mexicana. Los resultados evidencian que el agua proveniente de todos los puntos de muestreo cumple con los parámetros físico-químicos que exige la norma NTE INEN 1108 (requisitos agua potable), sin embargo, sólo las fuentes naturales de agua (vertientes) presentan calidad microbiológica aceptable, y a medida que el agua continúa en el sistema de abastecimiento, ésta presenta mayor carga bacteriana y presencia de parásitos. Al no contar con una planta de tratamiento que garantice la calidad del agua utilizada en las queseras, ésta debe ser clorada adecuadamente para eliminar los microorganismos y prevenir la contaminación cruzada.

**Palabras claves:** queseras artesanales, calidad de agua, coliformes fecales, parásitos.

### Abstract

The quality of the water used in food processing plants, affects the quality of the final product, therefore its analysis and control are needed. This study analyzed the physico-chemical and microbiological parameters of the water supply system that provides to the handmade cheese factories located in Quimiag, a rural area in Ecuador. Fourteen points were sampled along the system water supply (3 natural water sources, 3 catchment tanks, 1 storage and delivered tank, 5 faucets and 2 storage tanks located in the handmade cheese factories). At each point triplicate samples were taken. The analyses carried out were: turbidity, color, pH, conductivity, total solids, nitrates, nitrites, fluorides, fecal coliform bacteria, and parasites. These were done according to Ecuadorian and Mexican technical standards. The results show that water from all sampling points meets the physico-chemical parameters required by the standard NTE INEN 1108 (Ecuadorian drinking water requirements), but only the samples from the natural water sources meet microbiological parameters, but it keeps increasing the bacteria and parasites counting when the water flows along the system. As long as Quimiag does not have a water treatment plant, the

handmade cheese factories and the population in general should chlorinate the water in order to kill microorganisms and avoid cross-contamination.

**Keywords:** handmade cheese factories, water quality, fecal coliform bacteria, parasites.

**Fecha de recepción:** 11-07-2018

**Fecha de aceptación:** 23-01-2019

## I. INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos es un aspecto fundamental de salud pública y uno de los temas de mayor atención para los gobiernos, productores y consumidores (1).

Estudios realizados indican la relación de contaminación microbiana de los alimentos con las condiciones higiénicas de las instalaciones de fabricación (2), siendo necesaria la evaluación de todos los factores más influyentes sobre la calidad microbiológica del producto final. En una quesera, los principales puntos críticos de control son: la leche (materia prima), salmuera (adición de sal a los quesos una vez elaborados), ambiente, superficies vivas e inertes, medidas de higiene y el agua (3).

En Ecuador, las queseras artesanales generalmente están ubicadas en las zonas rurales; en la parroquia de Quimiag del cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, existen 12 queseras identificadas por el Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial y el Ministerio de Industria y Productividad (MIPRO). El sistema de agua que abastece a Quimiag no es potable, el líquido proviene de dos vertientes, este se almacena en tanques y posteriormente se distribuye a los usuarios sin un control de calidad que garantice su seguridad.

La calidad del agua de abastecimiento es un factor importante que puede afectar la seguridad de los alimentos procesados; en esta industria, el agua es utilizada en el proceso de limpieza y desinfección de áreas en contacto con el alimento, y

como ingrediente en la preparación de salmuera. El uso de agua que no ha recibido un tratamiento que garantice las características de agua potable, sumado a las condiciones de manipulación en las queseras artesanales, la convierten en un factor de contaminación del queso fresco (3,4) un producto que por su alta actividad de agua y su valor nutricional es catalogado como un alimento de alto riesgo microbiológico (5).

En un estudio previo (6) en el que fue evaluada la calidad microbiológica de la materia prima, suero y producto terminado en las queseras artesanales ubicadas en la parroquia rural Quimiag, indican que a pesar de que la leche tratada térmicamente que se utiliza para la elaboración cumple con la normativa el producto final presentó deficiente calidad microbiológica, existiendo lo que sugiere que existe contaminación en las siguientes etapas de elaboración y considerando que la industria de alimentos usa cantidades substanciales de agua en todos sus procesos, particularmente la industria de la leche, esta se puede convertir en un vector de contaminación del alimento (7).

Por lo anterior el propósito de este estudio fue evaluar la calidad físico-química y microbiológica del sistema de agua que abastece a las queseras del sector, proporcionando información relevante sobre la relación entre manipulación del agua (desde su fuente natural hasta su uso en la planta de producción) y la calidad del producto final.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio analizó la calidad físico-química y microbiológica del sistema de agua que abastece a la parroquia Quimiag. La población se aprovisiona de dos fuentes naturales las cuales se encuentran ubicadas en las quebradas: Paquisha, Balcashi y Guntus. (Imagen 1)

Esto se realizó mediante análisis in situ y en el laboratorio, las muestras de agua fueron tomadas en 14 puntos del sistema de abastecimiento de agua. Tres provinieron de las vertientes (VA, VB y VC), tres de los tanques de captación asociados cada uno a una vertiente (TCA, TCB, TCC), otra muestra correspondió al tanque general de

almacenamiento y distribución que recolecta el agua de los tres tanques de captación (TG), cinco muestras de los grifos de cinco queseras(Q1-Q5) y dos de tanques reservorios existentes en dos queseras (TRQ4 y TRQ5).

Se realizó el muestreo considerando la norma NTE INEN 2169:2013 (Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras) (8) y la norma NTE INEN 1105 (muestreo para el análisis microbiológico) (9). Durante el muestreo in situ se determinó pH, temperatura, conductividad y sólidos totales con el multiparámetro CONSORT C562®. Las cuantificaciones de color, turbidez, flúor, nitritos y nitratos se realizaron por el método espectrofotométrico con el uso del equipo HAHC DR/2800®.

Los procedimientos se describen detalladamente en los manuales de cada equipo. El análisis de coliformes fecales se ejecutó con la técnica de fermentación de tubos

múltiples, usando pruebas presuntivas y confirmativas para la cuantificación del número más probable (NMP), según lo descrito en la norma Mexicana NMX-AA-042-SCFI-2015 (10). El análisis de los parásitos (Ameba coli, Giardia lamblai, Cryptosporidium sp. y otros parásitos) se realizó por el método de centrifugación y flotación de Willis, para la determinación de Cryptosporidium sp. el producto obtenido se observó al microscopio óptico tras tinción de Ziehl-Neelsen (11,12).

Todos los resultados fueron comparados con los requisitos establecido en la norma de requisitos de agua potable NTE INEN 1108:2014 (13).

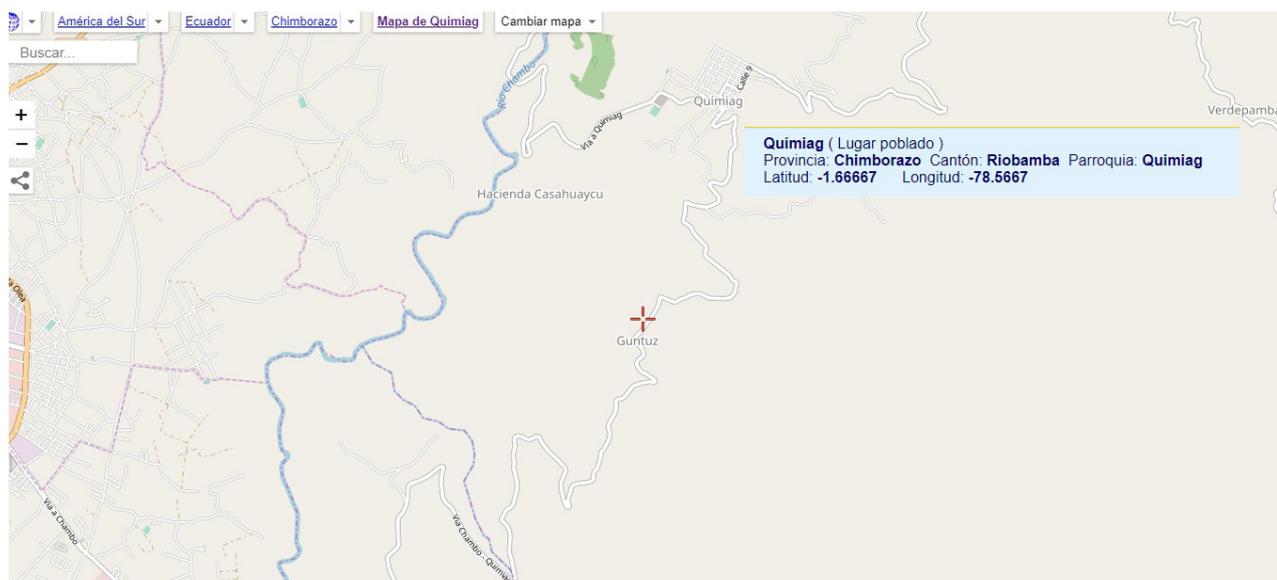


Imagen 1. Ubicación geográfica Parroquia rural Quimiag  
Fuente: Google map

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad microbiológica del agua de consumo en la parroquia Quimiag se evaluó en términos del NMP de coliformes fecales y ausencia o presencia de parásitos. En la tabla 1 se observan los resultados de los 14 puntos de muestreo. Se evidencia que únicamente en las vertientes (VA, VB y VC) no hubo presencia de microorganismos, por tanto, cumplen con los requisitos de la norma técnica ecuatoriana INEN 1108:2014. (Agua Potable. Requisitos); cuyos límites permitidos se muestran en las Tablas 1 y 2. Comparando la normativa nacional con lo establecido en

el Real Decreto 140/2013 del 7 de febrero en el que se indican los criterios sanitarios de la Calidad de Agua de consumo humano en España, los límites permitidos para los parámetros evaluados son similares a excepción del valor para nitritos, en España corresponde a 0,5 mg/L y 0.1 mg/L en la red de distribución y en el tanque de depósito respectivamente, y únicamente analizan parásitos cuando hay presencia de *Clostridium perfringens* (incluidas las esporas).

A pesar de que existen datos de estudios realizados en vertientes y manantiales que indican que estas fuentes están contaminadas con coliformes fecales debido al pastoreo, maleza y cruce con aguas residuales (14), en las vertientes analizadas en Quimiag no se detectó estos microorganismos. Siendo estas vertientes el inicio del sistema de distribución del agua en la comunidad son las únicas muestras que cumplen con el parámetro microbiológico por tratarse de un tipo de fuente natural que se ubica en una zona montañosa, donde no existe presencia de animales de sangre caliente ni poblaciones aledañas por su acceso limitado, esto se pudo evidenciar durante el muestreo.

Considerando que el grupo de bacterias denominado coliformes fecales, están siempre presentes en la flora intestinal de animales de sangre caliente (14) y aunque algunas especies están ampliamente distribuidas en la naturaleza, su presencia indica tratamiento inadecuado del agua o su contaminación posterior (15), esto concuerda con los resultados de los siguientes puntos de muestreo a medida que el fluido avanza por las tuberías de PVC hasta el tanque de almacenamiento y distribución (TG), se observa aumento de coliformes fecales.

En las muestras de los grifos y los tanques reservorios de las dos queseras, los resultados son inferiores al TG, esto puede deberse a que no fueron tomadas las muestras en el mismo día, siendo las condiciones climáticas diferentes, concordando con la investigación (17) donde analizaron la Presencia de indicadores microbiológicos en agua para consumo humano en la localidad de San Cosme, Provincia de Corrientes (Argentina), los resultados de NMP de coliformes fecales varió según los distintos puntos de muestreo y entre las diferentes fechas de toma de muestra del agua de pozo. Los puntos de muestreo consecutivos a las vertientes pudieron haberse contamina-

do a causa de los hábitos de defecación a campo abierto y a la presencia de animales domésticos y silvestres en las zonas rurales que actúan como reservorios de agentes patógenos, y contaminarse por fugas en las tuberías, además de que los tanques no tienen barreras que eviten contacto con el medio externo (17).

En referencia a los resultados hallados en las muestras de los grifos de las queseras, según estudios sobre la calidad del agua en la industria alimentaria, aun cuando el agua potable empleada tiene calidad sanitaria aceptable, el producto final puede no cumplir con la normativa correspondiente tras la contaminación del líquido al ingreso del sistema de distribución (18).

En este contexto, la calidad de la leche cruda y sus derivados puede verse comprometida por la calidad del agua de suministro que se utiliza para todas las actividades en la comunidad (19) ya que no cumple con los requisitos de la norma para agua potable (NTE INEN 1108 Requisitos Agua Potable) (11); es importante indicar que los tanques reservorios podrían considerarse foco de contaminación si este no tiene el manejo adecuado.

La norma pertinente en requisitos microbiológicos indica también la evaluación de *Cryptosporidium* y de *Giardia lamblia*, estos parásitos no deben estar presentes en agua potable, adicional se determinó la presencia de *Ameba coli* y de otros parásitos que se describen en la Tabla 1. *Cryptosporidium*, un parásito que está globalmente distribuido y un número de especies son reconocidas como patógenos humanos (20), los resultados muestran ausencia en todas las muestras analizadas, no obstante, existió la presencia de otros parásitos en todas las muestras a excepción de las provenientes de las vertientes. En el 82 % de muestras hay presencia de *Giardia lamblia*, 65 % de *Ameba coli* y 59 % de otros parásitos. *Giardia lamblia*, es el que más influye en la salud de los consumidores, especialmente en la población infantil, ya que se adosa en las microvellosidades del intestino delgado y evita la absorción de los alimentos, provocando desnutrición (21).

Estos parásitos ingresan por vía oral, por tanto, existe la probabilidad que se encuentre en el producto elaborado por las queseras artesanales, ya que el agua en estas condiciones es la que utilizan para todos los procesos en la planta procesamiento, teniendo consecuencias negativas no solamente para los consumidores de la comunidad sino también para los consumidores de los productos elaborados en las queseras.

MUESTRA/ MICROOR- GANIMOS	Coliformes *Fecales (NM- P/100mL)	<i>Ameba Coli</i> (Muestra 5L)	** <i>Cryptosporidium</i> (Muestra 2L)	** <i>Giardia lamblia</i> (Muestra 5L)	OTROS PARÁSITOS (Muestra 4L)
VA	1,1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
TCA	2,6	Ausencia	Ausencia	Presencia	Hifas de Hongos, Tri- churis parvum
VB	1,1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
TCB	2,6	Presencia	Ausencia	Presencia	Hifas de hongos, Para- mecio
VC	1,1	Presencia	Ausencia	Ausencia	Entoameba histolytica, hongos,
TCC	2,6	Presencia	Ausencia	Presencia	Hongos, paramecio
TG	8,0	Presencia	Ausencia	Presencia	Entoameba histolytica, Paramecio, hongos, Trichuris trichura
GQ1	4,6	Presencia	Ausencia	Presencia	Paramecio
GQ2	4,6	Presencia	Ausencia	Presencia	Entoameba histolytica, Paramecio
GQ3	2,6	Ausencia	Ausencia	Presencia	Paramecio
TRQ4	4,6	Ausencia	Ausencia	Presencia	Entoameba histolytica Paramecio, Hifas de Hongos
GQ4	4,6	Presencia	Ausencia	Presencia	Entoameba histolytica
TRQ5	2,6	Ausencia	Ausencia	Presencia	Entoameba histolytica, Paramecio, Hongos
GQ5	4,6	Ausencia	Ausencia	Presencia	Entoameba histolytica

Vertiente (V), tanque de captación (TC), tanque general (TG), grifo quesera (GQ), tanque reservorio (TR).  
Máximo permitido según la norma NTE INEN 1108: \* < 1,1 ; \*\* Ausencia

Tabla 1. Resultados del análisis microbiológico del sistema de agua que abastece a las queseras artesanales de la parroquia rural de Quimiag.

Los resultados del análisis físico-químico del agua que se presentan en la Tabla 2 indican que todas las muestras cumplen con los parámetros evaluados, lo que sugiere una homogeneidad entre los diferentes puntos de muestreo (8). Sin embargo, los datos sobre la carga microbiana sugieren la necesidad de la desinfección del agua tanto para uso doméstico como para las queseras.

Históricamente, la cloración es la tecnología más utilizada en la desinfección de agua; el cloro es un poderoso agente oxidante con acción germicida de amplio espectro (22), es económico, fácil de aplicar, con efecto residual y relativamente seguro en las dosis recomendadas (23, 24).

Pese a que los desinfectantes como el cloro/lejía pueden matar a la mayoría de los virus y bacterias que causan enfermedades, no son tan efectivos en el control de or-

ganismos más resistentes, por lo que es necesario que el agua consumida en la comunidad deba ser tratada para eliminar o evitar la contaminación con estos parásitos.

Los quesos, aunque se caracterizan por ser seguros para el consumo, se han visto implicados en brotes transmitidos por los alimentos asociados con afecciones a la salud (26), por tanto, las deficiencias en los protocolos de limpieza y desinfección, sumados a la calidad del agua, son factores que no permitirán obtener un producto que garantice calidad e inocuidad, cumpliendo con los requisitos legales.

PARÁMETRO	TURBIEDAD (U.N.T.)	COLOR (Und Pt-Co)	pH	CONDUCTIVIDAD (µS/cm)	SÓLIDOS TOTALES (mg/L)	NITRATOS (mg/L)	NITRITOS (mg/L)	FLORUROS (mg/L)
*MUESTRA/ **MÁXIMO PERMITIDO	5	15	6,5-8,5	1500	1000	50	3	1,5
V1	1,18 ± 0,02	0,00 ± 0,00	8,74 ± 0,06	280,33 ± 1,52	124,33 ± 3,21	1,33 ± 0,06	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,02
TC1	1,15 ± 0,12	0,00 ± 0,00	8,57 ± 0,50	193,67 ± 5,13	138,67 ± 3,21	1,57 ± 0,12	0,01 ± 0,00	0,58 ± 0,04
V2	3,31 ± 0,34	2,33 ± 0,58	8,30 ± 0,36	281,33 ± 3,06	93,33 ± 5,03	1,87 ± 0,15	0,01 ± 0,00	0,44 ± 0,03
TC2	0,77 ± 0,07	3,67 ± 0,58	8,37 ± 0,32	178,00 ± 2,65	107,0 ± 2,00	1,37 ± 0,06	0,017 ± 0,006	0,25 ± 0,05
V3	2,70 ± 0,58	3,60 ± 2,08	8,07 ± 0,12	110,67 ± 1,15	128,33 ± 3,06	2,33 ± 0,06	0,027 ± 0,006	0,59 ± 0,006
TC3	3,20 ± 0,21	13,53 ± 0,50	8,00 ± 0,0	117,33 ± 2,52	131,33 ± 2,52	2,37 ± 0,06	0,28 ± 0,03	0,60 ± 0,00
TR	2,60 ± 0,26	9,67 ± 1,53	8,10 ± 0,10	156,67 ± 2,08	121,00 ± 2,00	1,57 ± 0,12	0,01 ± 0,006	0,57 ± 0,03
GQ1	1,10 ± 0,08	8,67 ± 2,08	7,23 ± 0,21	202,33 ± 2,31	122,67 ± 2,08	0,40 ± 0,10	0,10 ± 0,006	0,00 ± 0,00
GQ2	1,30 ± 0,04	1,32 ± 0,04	7,14 ± 0,14	195,33 ± 1,53	123,00 ± 1,00	0,67 ± 0,12	0,003 ± 0,006	0,00 ± 0,00
GQ3	2,40 ± 1,37	2,53 ± 0,33	7,04 ± 0,40	185,00 ± 1,73	122,54 ± 2,00	0,63 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
CQ4	1,10 ± 0,61	1,13 ± 0,66	7,26 ± 0,32	180,00 ± 1,00	103,67 ± 4,93	1,47 ± 0,06	0,003 ± 0,006	0,00 ± 0,00
GQ4	1,10 ± 0,66	1,15 ± 0,66	7,41 ± 0,02	220,33 ± 10,12	105,67 ± 1,53	1,00 ± 0,10	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CQ5	2,30 ± 0,09	2,26 ± 0,09	7,59 ± 0,03	222,67 ± 1,53	124,00 ± 2,00	1,17 ± 0,15	0,01 ± 0,00	0,004 ± 0,004
GQ5	1,60 ± 0,15	1,57 ± 0,15	7,15 ± 0,05	243,67 ± 11,50	118,33 ± 3,06	1,13 ± 0,06	0,003 ± 0,006	0,003 ± 0,003

\*Vertiente (V), tanque de captación (TC), tanque general (TG), grifo quesera (GQ), tanque reservorio (TR). \*\*NTE INEN 1108 (Agua potable-requisitos)

Tabla 2. Resultados del análisis físico-químico del sistema de agua que abastece a las queseras artesanales de la parroquia rural de Quimiag.

#### IV. CONCLUSIONES

El agua que abastece a la población de la parroquia Quimiag a pesar de cumplir 100 % con los parámetros físico-químicos (color, conductividad, sólidos totales, turbiedad, nitratos, nitritos y fluoruros), sin embargo, no puede ser denominada potable ya que existen recuentos supe-

riores a 1,1 respecto a coliformes totales y el 86% de las muestras presentan contaminación por *Giardia lamblia*.

Estos resultados inciden sobre la inocuidad de los quesos frescos artesanales elaborados en las queseras del sector, ya que se convierte en una fuente de contaminación microbiana. Se recomienda realizar un tratamiento previo con hipoclorito de sodio al 5 o 10 % antes de consumirla y utilizarla en la producción de quesos.

#### Referencias

1. Arispe I, Tapia M. Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalimentaria*. 2017; 13: 105-117.
2. Fente-Sampayo C, Vazquez-Belda B, Franco-Abuin C, Quinto-Fernandez E, Cepeda-Saez A. Influencia de las buenas prácticas de fabricación en la contaminación fúngica del queso de Arzúa. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2001; 3: 169-172.
3. Godi K. The Microbiological quality of raw milk after introducing the two day  $\hat{\text{e}}\text{T}\text{M}$  s milk collecting system. 2008; 1: 61-74.
4. De Silva S, Kanugala K, Weerakkody N. Microbiological quality of raw milk and effect on quality by implementing good management practices. *Procedia Food Science*. 2016;6: 92-6.
5. Arguello P, Lucero O, Castillo G, Escobar S, Albuja A, et al. Calidad microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba (Ecuador). *Perspectiva*. 2015; 16: 65-74.
6. Arguello P, Escobar S, Espinoza C, Albuja A. Calidad microbiológica de la materia prima, suero y producto terminado en las queseras artesanales: Quimiag-Ecuador. En: Sin editor. Libro de Memorias. VII Congreso iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas (COIFFA); 29 y 30 noviembre, 1

- diciembre 2017, Riobamba. Ecuador: Sin editor; 2018. P. 156-162.
7. Nerín C, Aznar M, Carrizo D. Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 48: 63-68.
  8. NORMA NTE. INEN 2169:2013. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.
  9. NORMA NTE. INEN 1105:2012 Aguas. Muestreo para exámen microbiológico.
  10. NORMA MEXICANA NMX-AA-042-SCFI-2015. Análisis de agua - enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* – método del número más probable en tubos múltiples.
  11. Arnedo I, Bracho M, Díaz-Suárez O, Botero L. Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* sp. en sistemas de tratamiento de agua residual. *Kamera* [Internet]. 2008 [citado 1 Enero 2018]; 3: 120-128. Disponible en: [http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222008000200004&lng=es](http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222008000200004&lng=es).
  12. Pérez-Cordón Gregorio, Rosales María J., Valdez Renzo A., Vargas-Vásquez Franklin, Cordova Ofelia. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública* [Internet]. 2008 [citado 15 Mayo 2018]; 25: 144-148. Disponible en: [http://www.scielo.org/pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342008000100018&lng=es](http://www.scielo.org/pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000100018&lng=es).
  13. NORMA NTE. INEN 1108:2014. Agua potable requisitos.
  14. Abu R. *Water Chemistry and Microbiology*. En: Chormey D, Bakirdere S, Turan N, Engin G, editores. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol 81. Netherlands: Elsevier; 2018. p. 1-56.
  15. Silva E, Murillo C, Nava G, Cárdenas O, Peralta A, et al. Microbiological and chemical quality of water used in Colombian food industries. *Biomédica*. 2010; 30: 421-431.
  16. García RR, Muñoz CM, Vizcaino DH, Veguillas DL, Acevedo L. Calidad del agua de fuentes de manantial en la zona básica de salud de Sigüenza. *Rev Esp Salud Pública* [Internet]. 2003 [citado 30 Julio 2018]; 77: 423-32. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/170/17077312.pdf>
  17. Rodríguez S, Asmundis C, Ayala M, Arzú, O. Presencia de indicadores microbiológicos en agua para consumo humano en San Cosme (Corrientes, Argentina). *Revista veterinaria* [Internet]. 2018 [citado 25 Junio 2018]; 29: 9-12. Disponible en: <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/2779/2460>
  18. Arcos D, Ávila S, Estupiñán M, Gómez A. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova* [Internet]. 2005 [consultado 25 Julio 2018]; 3: 69-79. Disponible en: [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTREVIS2\\_4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf)
  19. Daivila J, Reyes G, Corzo O. Evaluación microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda en una industria venezolana. *Arch Latinoam Nutr* [Internet]. 2006 [consultado 30 Julio 2018]; 56: 1-10. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/6996893\\_Microbiological\\_assessment\\_of\\_the\\_Gouda-type\\_cheese-making\\_process\\_in\\_a\\_Venezuelan\\_industry](https://www.researchgate.net/publication/6996893_Microbiological_assessment_of_the_Gouda-type_cheese-making_process_in_a_Venezuelan_industry)
  20. Caccio S, Chalmers R. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016; 22: 471-480.
  21. Ryan U, Cacciò S. Zoonotic potential of *Giardia*. *International journal for parasitology*. 2013; 43: 943-956.
  22. Cerqueira M, Picinin L, Fonseca L, Souza M, Leite M, et al. Microbiological quality of milk through preventive techniques in the handling of production. *Ciênc. agrotec.* [Internet]. 2005 [consultado 30 Julio 2018]; 29: 216-222. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v29n1/a27.pdf>
  23. Clasen T, Schmidt W, Rabie T, Roberts I, Cairncross S. Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2007; 334: 782-782.
  24. Burke N, Dwyer J, Southern M, Adley C. An analysis of the microbial quality of water in a milk production plant. *Food Sci Technol* [Internet]. 2017 [citado 15 Septiembre 2018]; 78: 41-46. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816307277>

25. Morán M, Ochoa T. Prevención, diagnóstico y tratamiento de infecciones pediátricas en desastres naturales. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2017 [citado 15 Octubre 2018]; 34: 723-730. Disponible en: [https://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S172646342017000400723&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S172646342017000400723&script=sci_arttext&tlng=en)
26. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos E. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*. 2010; 21: 805-815.



## Evaluación de la actividad cicatrizante de hierba mosquera (*Croton elegans Kunth*) en ratones (*Mus musculus*)

### Evaluation of the cicatrising activity of hierba mosquera (*Croton elegans Kunth*) in mice (*Mus musculus*)

<sup>1</sup>Cecilia Toaquiza Aguagallo\*, <sup>2</sup>Cristina Tigse Moposita, <sup>1</sup>Elizabeth Escudero Vilema, <sup>1</sup>Aída Miranda Barros, <sup>3</sup>Víctor Guangasig Toapanta

<sup>1</sup>Grupo de Investigación de Tecnología y Atención Farmacéutica – Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

<sup>2</sup>Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. Ministerio de Salud Pública, Quito, Ecuador

<sup>3</sup>Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador

\*cecytoaquiza@gmail.com

#### R esumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad cicatrizante del extracto de Hierba mosquera (*Croton elegans Kunth*) en ratones (*Mus musculus*). Con el extracto etanólico concentrado se realizó cuantificaciones espectrofotométricas para flavonoides totales expresados en porcentaje de rutina y de compuestos fenólicos mediante el micrométodo de Folin-Ciocalteu, y determinación colorimétrica de tanino expresado como ácido tánico. En la evaluación de actividad cicatrizante se utilizaron 18 ratones (*Mus musculus*) albinos con peso de 35 a 40g, dos meses de edad, 12 machos y 6 hembras provenientes del bioterio de la facultad de Ciencias (ESPOCH). Divididas en 6 grupos experimentales, 3 para cada tratamiento: extracto etanólico de hierba mosquera en concentraciones del 20%, 40% y 80%, el control negativo fueron ratones con heridas sin tratamiento, y para controles positivos se aplicaron eterol y crema base de acetato de prednisolona con sulfato de neomicina. Se midió la longitud de la herida y examen histopatológico del corte de piel del lugar de lesión. El contenido total de flavonoides fue 80µg, contenido total de fenoles 2.07µg y la concentración de compuestos tánicos 24,36µg. El test Tukey con nivel de significancia 0,05% reveló que el extracto etanólico al 80% tuvo mayor efectividad. El extracto etanólico al 80% de hierba mosquera expone reconstitución total de tejido en menor tiempo demostrando actividad cicatrizante.

**Palabras Claves:** Hierba Mosquera (*Croton elegans Kunth*), ratones (*Mus musculus*), actividad cicatrizante, extracto etanólico

#### A bstract

The objective of the present study was to evaluate the cicatrizing activity of hierba mosquera extract (*Croton elegans Kunth*) in mice (*Mus musculus*). With the concentrated ethanolic extract, spectrophotometric quantifications performed for total flavonoids expressed as a percentage of rutin and phenolic compounds by means of the Folin-Ciocalteu micromethod, and colorimetric determination of tannin expressed as tannic acid. In the evaluation of healing activity, 18 albino mice (*Mus musculus*) weighing 35 to 40g, two months old, 12 males and 6 females from the faculty of sciences (ESPOCH). Divided into 6 experimental groups were used, 3 for each treatment: ethanolic extract of hierba mosquera in concentrations of 20%, 40% and 80%, the negative control were mice with wounds without treatment, and for positive controls, eterol and prednisolone acetate base cream were applied with neomycin sulfate. The length of the wound and the histopathological examination of the skin cut at the site of injury measured. The total content of flavonoids was 80µg, total phenol content 2.07µg and the concentration of tannic compounds 24.36µg. The Tukey test with significance level 0.05% revealed that the 80% ethanolic extract was more effective. The 80%

ethanolic extract of hierba mosquera exposes total tissue reconstitution in less time, demonstrating cicatrizant activity.

**Keywords:** Hierba Mosquera (*Croton elegans Kunth*), mice (*Mus musculus*), healing activity, ethanolic extract

**Fecha de recepción:** 03-10-2018

**Fecha de aceptación:** 31-01-2019

## I. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de la flora ecuatoriana ha sido reconocida y estudiada desde hace mucho tiempo, y desde siempre reconocida por ser inmensamente rica en plantas útiles (5172 especies) de las cuales el 60% son medicinales. Según la enciclopedia de plantas útiles del Ecuador en el país existen 144 familias (17%) que incluyen 825 especies de plantas que son utilizadas para aliviar heridas y lesiones (1).

Las familias de mayor uso para aliviar heridas y lesiones son Asteraceae, Solanaceae y Euphorbiaceae, numerosas de las especies incluidas favorecen la pronta cicatrización, sobre todo de heridas causadas por objetos corto-punzantes, entre ellas son muy conocidos el matico (*Aristeguietia glutinosa*), en la Sierra, y la sangre de drago (*Croton lechleri*), en la Amazonía. La hierba mosquera (*Croton elegans kunth*) incluida también en esta categoría no reporta estudios previa comprobación científica de esta actividad farmacológica (1).

Según el catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador *Croton elegans Kunth* es una especie endémica del Ecuador perteneciente a la familia Euphorbiaceae (2). De acuerdo a la literatura botánica, esta planta es un arbusto de la vegetación seca interandina, que crece entre 1500 y 3500 msnm (3). Presenta muchas aplicaciones en la medicina tradicional ecuatoriana, se utiliza como antiinflamatorio, en el tratamiento de dolor de muela, heridas amigdalitis y verrugas. También se ha utilizado en el tratamiento de reumatismo, gota, neuralgia y bronquitis (4).

Se atribuye a compuestos fenólicos actividades antiinflamatorias y cicatrizantes; y se ha identificado la presencia de los mismos en

hierba mosquera (4). El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad cicatrizante del extracto de *Croton elegans Kunth* en ratones (*Mus musculus*).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La identificación taxonómica de la hierba mosquera (*Croton elegans Kunth*) se lo realizó en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) y fue recolectada en la parroquia Picaihua de la provincia de Tungurahua a 2600 msnm y temperatura promedio de 15 °C.

### Material de laboratorio

**PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS:** Se pesaron para cada extracto 30 g de material vegetal secado en estufa (Memmert) con circulación forzada de aire a 40 °C ± 1 °C, el material seco se pulverizó hasta un tamaño de partícula máximo de 0.5 mm, y fueron macerados con éter, etanol (40 %) en zonicador (Branson 3510) durante 3 horas a temperatura de 25 °C ± 1 °C, luego se filtró y conservó los extractos para los análisis en frascos ámbar a 4 °C (5) (6).

**ENSAYO FITOQUÍMICO:** La identificación cualitativa de metabolitos secundarios de los extractos se realizó según tamizaje fitoquímico general (7).

**CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO:** Se identificaron las características organolépticas del extracto, y se realizó el análisis microbiológico para lo se utilizó placas petrifilm con 1 mL del extracto etanólico (20, 40 y 80 %), incubados a 30 ± 1 °C durante 72 ± 2 horas.

**ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS PARA FLAVONOIDES:** Se realizó en placas de silica gel (2 cm x 10 cm), el sistema de solventes utilizado fue cloroformo - acetona - ácido fórmico (7.5:1.7:0.8), y revelado con sulfato de cerio (8).

**CONTENIDO DE FLAVONOIDES:** Se realizó cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresado

en porcentajes de rutina, según el método de Shinet al con ligeras modificaciones. Se tomó 250  $\mu\text{L}$  de extracto con 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada, se adicionó 38  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10 % p/v, se agitó y dejó a 25 °C durante 6 min; se agregó 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1M y completó el volumen final de 1250  $\mu\text{L}$  con agua destilada. La absorbancia de la reacción fue medida a 400nm en espectrofotómetro UV visible Hewlett Packard. La concentración de flavonoides fue establecida empleando una curva de calibración con un estándar de rutina a diferentes diluciones. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de rutina/ g de muestra (9) (10).

**CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS:** Se realizó cuantificación espectrofotométrica mediante el micrométodo de Folin- Ciocalteau. Una alícuota 10  $\mu\text{L}$  de extracto se aforó a 100 mL. A 10 mL de la dilución se añadieron 1.5  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteau (ácido fosfotúngico con ácido fosfomolibdico) en la oscuridad, se adicionó 2  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 20 %. Se midió la absorbancia a 700 nm (11).

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó empleando una curva de calibración con ácido gálico como estándar. Fue expresado en  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/mL de extracto (12) (13).

**DETERMINACIÓN DE TANINOS:** Se realizó determinación colorimétrica de taninos expresados como ácido tánico por el método de Folin- Ciocalteau. A 0.1 $\mu\text{L}$  de extracto etanólico se aforó a 100 mL con agua destilada. A 10 mL de la dilución se añadió 2  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin - Ciocalteau, protegido de la luz para evitar la oxidación. La concentración de taninos se determinó utilizando ácido tánico a diferentes diluciones. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de ácido tánico/gramo de tejido vegetal (14).

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE:** Se utilizó 18 ratones albi-

nos (*Mus musculus*) distribuidos al azar en 6 grupos de 3 ratones, con un peso entre 35 y 40 g, de 2 meses de edad provenientes del bioterio de la ESPOCH, a condiciones ambientales: humedad relativa de  $50 \pm 10$  % , temperatura de  $22 \pm 2$  °C, con periodos de fotoluminiscencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se alimentaron con dieta balanceada y agua clorada. El período de ambientación fue durante 15 días. Se conservó normas asépticas durante el periodo del ensayo (15) (16).

Terminado los días de aclimatación se procedió a depilar la mitad del tercio superior del lomo (dorso del animal) de cada ratón, a las 48 horas al no observarse irritación en la piel, se procedió a realizar las heridas de 2 cm de longitud por 2 mm de profundidad con la ayuda de un bisturí en condiciones asépticas. Posteriormente se administraron los tratamientos a los grupos experimentales de la siguiente manera (17) (18).

- CN (control negativo) ratón con herida sin tratamiento.
- CL (control positivo) se aplicó con la ayuda de un hisopo crema dérmica comercial a base de acetato de prednisolona/sulfato de neomicina).
- CE (control positivo) se aplicó eterol (fenol 1g, violeta de genciana 0.4g, excipiente alcohólico 100 mL) (19).
- EC1 se aplicó 3 gotas del extracto al 20%
- EC2 se aplicó 3 gotas del extracto al 40%
- EC3 se aplicó 3 gotas del extracto al 80%

Se midió la longitud de la herida por el lapso de 16 días cada 48 horas. Al término del ensayo se procedió a la eutanasia de los animales de experimentación. Se realizó un corte de la piel en el lugar de la herida y fueron conservados en formol para su análisis histopatológico.

El análisis de datos se realizó por el programa IBM SPSS® Statics versión 20.0 aplicando pruebas de estadística descriptiva e inferencial paramétrica ANOVA de un factor y estudios post hoc (test Tukey)

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis cualitativo (Tabla 1) se observó en el extracto etanólico la presencia de compuestos con actividad cicatrizante, flavonoides y fenoles. (20)

Metabolitos secundarios	Ensayo	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Aceites – grasas	Sudan	+		
Lactonas – cumarinas	Baljet	+ (↓)		
Alcaloides	Dragendorff		+++ (↓)	+
Alcaloides	Mayer		+	
Alcaloides	Wagner	(↓)	+	
Flavonoides	Shinoda		+	+
Azúcares reductores				(↓)
Grupo de flavonoides antocianos	Antocianos		+	

(↓) precipitación, (+) baja evidencia, (+++) alta evidencia

Tabla 1. Análisis Cualitativo del extracto alcohólico de *Croton elegans kunth*

El extracto etanólico presentó características organolépticas propias de *Croton elegans Kunth* con un color combinado de verde con café oscuro, de aspecto líquido, olor herbal y sabor dulce por la presencia de azúcares.

Los resultados del análisis microbiológico demostraron ausencia de coliformes totales (10 UFC/mL), moho y levaduras (<10 UFC/mL) y aerobios mesófilos (103 UFC/mL) del extracto madre y los extractos al 20 %, 40 % y 80 %, acorde a las especificaciones de la USP 28, el extracto es apto para uso experimental (21).

En el ensayo cromatográfico según el método de Wagner (1996) se evidenció la presencia de flavonoides como la quercetina (Rf 0.3) y compuestos fenólicos como el ácido isoclorogénico (Rf 0.7), metabolitos relacionados con actividad antiinflamatoria y cicatrizante (8)

El contenido total de flavonoides expresado con respecto a la rutina fue en valor de 320 µg/g de muestra.

El contenido de compuestos fenólicos expresados con respecto al ácido gálico fue 2.07 µg/mL de extracto, la concentración de compuestos tánicos totales fue 24.36 µg/g de muestra, siendo estos los compuestos relacionados con actividad antiinflamatoria y cicatrizante (22).

Grupo	Cicatrización (días)	Longitud (cm)
CN	15 ± 0.8	1.16 ± 0.037
CL	13 ± 0.7	1.12 ± 0.035
CE	11 ± 0.7	1.13 ± 0.022
EC1	14 ± 0.7	1.11 ± 0.048
EC2	10 ± 0.5	0.85 ± 0.010
EC3	8 ± 0.4	0.91 ± 0.045

Tabla 2. Efecto cicatrizante del extracto de *Croton elegans kunth*.

En el análisis del efecto cicatrizante del extracto de *Croton elegans Kunth* evaluada mediante la media del tiempo en días para la cicatrización (Tabla 2), el tratamiento EC3 presentó un efecto mayor frente a los otros tratamientos obteniendo un promedio de cicatrización de 8 días, se sugiere que la mayor presencia de compuestos fenólicos en el extracto al 80% consiguió acelerar el proceso. (4)

Origen de variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F <sup>a</sup>	Probabilidad	Valor crítico para F <sup>b</sup>
Entre grupos	96.94	5	19.39	14.54	0.00	3.11
Dentro de los grupos	16	12	1.33			
Total	112.94	17				

a. Fisher tabulado (Ftab)

b. Fisher calculado (Fcal)

Tabla 3. ANOVA de un factor para los días de cicatrización

De acuerdo a los datos de ANOVA (Tabla 3) se pudo observar que existe variación entre grupos de acuerdo al valor de Fcal (3.11) en comparación en Ftab (14.54) lo que indica que el efecto del extracto alcohólico de *Croton elegans* Kunth en las heridas presenta una variación significativa al  $p=0.05$  frente a los entes de control.

HSD Tukey <sup>a</sup>	Tratamiento	N	Días de cicatrización		
			Subconjunto para alfa = 5		
			1	2	3
EC3	3	8.67			
EC2	3	10.00			
CE	3	11.00	11.00		
CL	3		13.3	13.3	
EC1	3			14.3	
Cont. Neg.	3			15.00	
Sig.		2.06	2.06	.518	

Se visualiza las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,00

Tabla 4. Test de Tukey respecto a los días de cicatrización

Según la prueba de subconjuntos de grupos de Tukey (Tabla 4) con un nivel de significancia 0.05, se observaron tres subgrupos, de los cuales el tratamiento EC3 (extracto al 80%) presentó mayor efectividad con 8.67 días en promedio.

En el análisis histopatológico macroscópico de los cortes de las pieles de los animales de experimentación los cinco grupos presentaron coloración blanca y aspecto liso. El grupo EC3 correspondiente al extracto al 80% la piel está cubierta de pelaje y no se observa huella de la herida.

Grupo experimental	MNN	Histocitos	Edema	Fibras de colágeno	Tejido conectivo	Tejido cicatricial
EC3	+	-	++	++	100	90
EC2	+	-	-	++	80	90
EC1	+	-	-	++	50	80
CE	+	-	+	++	80	100
CL	+	-	-	++	100	80
CN	+	-	++	-	60	100

Tabla 5. Análisis microscópico histopatológico de pieles de ratones

Mediante el análisis microscópico (Tabla 5) de las placas elaboradas en base a la piel se observó los tejidos reconstituidos interiormente, siendo favorable el extracto al 80%, pudiendo atribuirse químicamente la actividad cicatrizante a la presencia de compuestos fenólicos de tipo flavonoide porque estos metabolitos intervienen en la cicatrización al evitar la liberación de prostaglandinas e histaminas, evitan la migración de elementos formes (neutrófilos y otros). Además, estabilizan la membrana celular capturando a los radicales libres presentes, evitando así el daño celular y activando el complejo sistema bioquímico para la regeneración del tejido. (20) (23)

#### IV. CONCLUSIONES

Mediante el tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de metabolitos secundarios de interés farmacológico, siendo los flavonoides identificados en el extracto etanólico importantes para la presente investigación.

El ensayo cromatográfico evidenció la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en el extracto etanólico.

El contenido total de flavonoides (320µg/g de muestra), compuestos fenólicos (2.07µg/mL de extracto) y compuestos tánicos totales (24.36µg/g de muestra), lo cual es un indicio de potencial farmacológico relacionados con actividad antiinflamatoria y cicatrizante de *Croton elegans* Kunth.

Mediante el estudio de restauración de heridas provocadas a ratones (*Mus musculus*), el extracto etanólico de al 80% de hierba mosquera presentó una diferencia significativa al ser comparados con la crema base de acetato de prednisolona/sulfato de neomicina, el eterol, y el control, corroborándose con el respectivo estudio histológico, en el que se presentó una reconstitución del tejido más rápida. Se evidenció con bases científicas la actividad cicatrizante de *Croton elegans* Kunth.

## Referencias

1. L. de la Torre, H. Navarrete, P. Muriel M., M. J. Macía & H. Balslev (eds.). Enciclopedia de Plantas útiles del Ecuador Quito & Aarhus: Herbario QCA & Herbario AAU; 2008.
2. P.M. Jørgensen SLY. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador St. Louis,; Missouri Botanical Garden Press; 1999.
3. León-Yáñez S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa C. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. 2nd ed. Quito: Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica; 2012.
4. Herrera C, Pérez Y, Morocho V, Armijos C, Malagón O, Brito B, et al. PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL STUDY OF THE ECUADORIAN PLANT. J. Chil. Chem. Soc. 2018; 63(Nº 1).
5. Dominguez X. Métodos de Investigación Fitoquímica. 1st ed. México: Limusa ; 1973.
6. Muñoz J. Guia para el analisis de vegetales Universidad Central del Ecuador , editor. Quito: Universitaria; 1982.
7. Luck O. Investigación Fitoquímica: Métodos de estudios de productos naturales. 3rd ed. Lima: Fondo Editorial Pontifice Universidad Catlica del Perú ; 2016.
8. Bladt S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd ed. Berli-Alemania: Springer; 1996.
9. Játiva C. Texto básico de farmacognosia de los vegetales a las medicinas Riobamba: Editorial ESPOCH; 2010.
10. Makka H, Bluemel M, Borowy N, Becker K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. J. Sci. Food Agrio. 1993;(61): p. 161-165.
11. García E, Fernández I, Fuentes A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu. Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. 2015 Jun.
12. Ricco R, Wagner M, Portmann E, Reides C, Gurdi A, Carballo M. Analisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especie argentinas de Lippia y Aloysia (Verbenaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas. 2010; 9(5): p. 388-396.
13. Maksimovic Z, Malencic D, Covacevic N. Polyphenol contents and antioxidant activity of Mayadics stigma extracts. Biores. Tech. 2005; 96: p. 873 - 877.
14. Kasay MI, Humán J, Guerrero M. Estudio cualitativo y cuantitativo de taninos de la OENOTHERA ROSEAL L'HÉR. EX AITON. Rev.Per.Quím.Ing.Quím. 2013; 16(1): p. 13-19.
15. Mancebo B, Sánchez L, Díaz S, Gouchea C, Regalado A, Escobar A, et al. Efecto cocatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de Pinus caribaea var. sobre heridas abiertas asépticas. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16(1): p. 24-33.
16. Victoria M, Morón F. Bioetica en experimentación animal para validar usos de planas medicinales en el Laboratorio Central de Farmacología. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2010; 15(3): p. 157-158.
17. González r. Modelos experimentales para la evaluación de la acción cicatrizante de medicamentos. Rev Cubana Farm. 2002; 36(189-196).
18. Gallardo J, Barboza L. Efecto cicatrizante del gel elaborado del látex de Croton lechleri "Sangre de Drago". Revista Científica Ciencias Médicas. 2015; 18(1): p. 10 - 16.
19. Manualzz. Veterinario 2015. [Online].; 2015 [cited 2015 06 15. Available from: <https://manualzz.com/doc/5605682/veterinario-2015>.
20. Soriano M, Bonilla P, Arroyo Acevedo J, Pereyra S. Actividad cicatrizante tópica de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de Senecio culcitoides Weed. Folia dermatol. 2004 dic; 15(3): p. 155-159.
21. Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, Inc. USP 28. The united states pharmacopeia. NF 23. The national formulary ; 2005.
22. Sanchez J. Efecto de la quercetina y la rutina frente a daño oxidativo inducido en eritrocitos con distintos contenidos de colesterol. Universidad de Salamanca. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular ed. Salamanca: Tesis Doctoral; 2009.
23. Valencia C. Cicatrización: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. Folia dermatol. 2004; 15(3): p. 155-159.



# ELECTRORREMEDIACIÓN DE CADMIO Y NÍQUEL DE PASIVOS AMBIENTALES DE SUELO CONTAMINADO POR DERRAMES DE PETRÓLEO

## Electrorremediation of cadmium and nickel of environmental liabilities in contaminated soils by petroleum spills

<sup>1</sup>Fausto Yaulema Garcés, <sup>1</sup>Andrés Beltrán, <sup>1</sup>Jenner Baquero, <sup>1</sup>Cristian Carrera, <sup>1,2</sup>Alex Gavilanes Montoya\*

<sup>1</sup>Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

<sup>2</sup>Universidad de Transilvania de Brasov, Brasov, Rumania

\*a\_gavilanes@esPOCH.edu.ec

### R esumen

En el presente artículo se presenta las acciones y resultados de la electroremediación por derrames de petróleo en el cantón Joya de los Sachas, Ecuador. Las acciones para la electroremediación de metales pesados como el cadmio y níquel de los pasivos ambientales de suelo contaminado, generado por derrames de petróleo en el cantón Joya de los Sachas (sector la Parker) consistió en la determinación de las características físicoquímicas y mineralógicas del suelo, además, la identificación de los potenciales óptimos para su remediación durante 48 h a través de soluciones electrolíticas para inmovilizar iones metálicos y el análisis de los fenómenos de transporte de los metales pesados en base a los estudios de espectroscopia de absorción atómica y microscopia de barrido electrónico. Estas acciones, fueron determinantes para definir que los procesos electrocinéticos son más efectivos en suelos arcillosos debido a su carga superficial negativa. Como resultados más importantes se tiene que para el cadmio de 25,55 ppm, permitiendo alcanzar una eficiencia máxima de remoción de 93,71 %, para el níquel una concentración de 37,20 ppm alcanzando una eficiencia del 85,12 %, permitiendo cumplir con la normativa aplicable para actividades hidrocarburíferas. Finalmente, mediante la técnica de microscopia de barrido electrónico se pudo constatar una modificación de los elementos iniciales, que también se vieron desplazados por efectos del campo eléctrico.

**Palabras claves:** Electrorremediación, Joya de los Sachas, Hidrocarburos, Pasivos ambientales, Cadmio, Níquel.

### A bstract

The electroremediation of heavy metals such as cadmium and nickel, from the environmental liabilities of contaminated soil, generated by oil spills in the canton Joya de los Sachas, la Parker sector, consisted of determining the physical-chemical and mineralogical characteristics of the soil; the identification of the optimal potentials for its remediation during 48 hours through electrolytic solutions to immobilize metal ions and the analysis of heavy metal transport phenomena based on the studies of atomic absorption spectroscopy and electron scanning microscopy; which were determinant to define that the electrokinetic processes are more effective in clay soils due to their negative surface charge. For the cadmium of 25.55 ppm, allowing a maximum removal efficiency of 93.71%, for nickel a concentration of 37.20 ppm reaching an efficiency of 85.12%, allowing compliance with the applicable regulations for hydrocarbon activities. Finally, by means of the electronic scanning microscopy technique, we can observe a modification of the initial elements, which were also displaced by effects of the electric field.

**Key words:** Electroremediation, Joya de los Sachas, Hydrocarbons, Environmental liabilities, Cadmium, Nickel

Fecha de recepción: 30-11-2018

Fecha de aceptación: 31-01-2019

## I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador la contaminación por metales pesados se debe principalmente a las actividades mineras (1) e hidrocarburíferas (2), en las principales provincias donde hay diferentes procesos de exploración (3), explotación, transporte (4) y refinación de hidrocarburos (5), accidentalmente se producen roturas en las tuberías causando derrames de petróleo que contaminan el agua, suelo, flora y fauna (6), causando graves problemas ambientales y socioeconómicos (7).

En el sector La Parker cantón Joya de los Sachas, las distintas actividades petroleras cada año generan miles de toneladas de contaminantes sólidos, líquidos y gaseosos (8) en concentraciones mayores a las permitidas por las normativas ambientales vigentes (9), y sin que sobre estos se haya aplicado un correcto tratamiento de remediación (10), generando significativos pasivos ambientales (11).

En el contexto nacional, existen escasos estudios en relación a la remediación de suelos contaminados por metales pesados como el cadmio (Cd) y níquel (Ni) (12).

La exposición a las condiciones climáticas prevalentes del lugar, puede ocasionar una propagación de los contaminantes por medios físicos (13), o bien una transformación de los residuos con el consecuente desplazamiento químico de los elementos potencialmente tóxicos (14), como la lixiviación de metales pesados que alteran la estructura del suelo y los niveles freáticos del agua (15), así afectando al entorno ambiental y la salud de la población expuesta (16)

En los tratamientos físicos y químicos la electrorremediación es una tecnología emergente que se viene desarrollando desde las últimas 3 décadas (17) (18) y prometedora como es el caso como es el

caso de la remoción de plomo (Pb), cercana a un 100% de eficiencia (19) que aprovecha las propiedades conductivas del suelo, cuyo objetivo es separar y extraer los contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en suelos, lodos y sedimentos contaminados (20). Aunque también se ha aplicado en la remoción de cromo, cadmio, mercurio, plomo, manganeso, zinc y arsénico (21-24)

En este estudio, se determinaron las características físico-químicas y mineralógicas del suelo contaminado (25), se identificaron los potenciales óptimos para la remediación de metales pesados (26) y finalmente se analizaron los fenómenos de transporte de los metales pesados en base a los estudios de espectroscopia de absorción atómica (27) y microscopia de barrido electrónico (SEM) (28)

La contaminación por metales pesados se difunde en áreas extensas (29) y de difícil acceso (30), por ende, es difícil transportar estos suelos contaminados a un centro de tratamiento ambiental “ex-situ” (31), viéndose reflejados problemas como: transporte, tiempo, costos y riesgos etc. (32).

Por esta razón se presenta al tratamiento electrocinético como una alternativa viable para tratar suelos contaminados (33), afectados por las actividades hidrocarburíferas (34), mediante la aplicación de una diferencia de potencial y la inyección de soluciones humectantes en el suelo (35), movilizandolos iones presentes hacia los electrodos (36), así aislando el contaminante para su recuperación, tratamiento y/o disposición final (37).

Esta técnica se hace atractiva por ser “in-situ”, amigable con el medio ambiente (38), y principalmente no involucra costos excesivos para su implementación (39) y, aplicación frente a las otras tecnologías de tratamiento (40).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

- El área de influencia se encuentra ubicado en las coordenadas, Este: 291149.11 mE, Norte:9963334.93 mS, z18m; a una altitud de 270 m.s.n.m. Con una longitud: -76.877804° y latitud: -0.333529°.

El área muestreada se inició a 100 m del centro poblado sector la Parker vía Sacha – Coca. Con la finalidad de obtener muestras compuestas de suelo, se realizó un muestreo aleatorio simple a los alrededores de la estación de operaciones central Petroamazonas (PAM), con una longitud de muestreo de 3386 m;



Gráfico 1. Zona de Estudio en el cantón Joya de los Sachas, sector La Parker (Yaulema et al, 2018)  
Fuente: Google Earth, 2018.

Del área delimitada se observan 20 puntos equivalente al número de submuestras de 1 kg cada uno, se realizó un cuarteo donde se tomó una muestra compuesta homogénea, colocadas en una funda ziploc y almacenadas en un termo a baja temperatura evitando la volatilización, para luego ser analizadas en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH; previamente se envió una muestra de 100 g al Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental (AQLAB en Orellana, Ecuador) para determinar la concentración de Cd y Ni en la muestra.

En vista que las concentraciones Cd y Ni originales de las muestras tomadas en el lugar de estudio no tuvieron la concentración suficiente como para llevar a cabo los experimentos de electrorremediación, se procedió a adicionar Cd en el suelo contaminado debido a que, las concentraciones estaban debajo de los límites permisibles para llevar a cabo esta investigación.

### **Caracterización física, fisicoquímica y mineralógica de la muestra de suelo.**

Los principales parámetros físicos y fisico-químicos del suelo que se tomaron en cuenta y se analizaron por triplicado fueron: tamaño de la partícula, densidad aparente, densidad real, porosidad, color, porcentaje de humedad, textura, capacidad de intercambio catiónico (C.I.C) bajo la norma PEE/SFA/14, pH con norma EPA 9045D y conductividad eléctrica (CE) con la norma EPA 9050A. Para el análisis estadístico, se empleó la prueba de Tukey.

### **Determinación del tamaño de partícula**

Se tomaron 500 g de muestra de suelo seco y homogéneo

contaminado con Cd y Ni. Se dispuso de un arreglo de tamices formado por el tamiz #01 (475 mm) y el tamiz #11 (53  $\mu$ m), sobre este se colocó el material, y se agitó durante 15 min; se retiró el arreglo de tamices y se cuantificó el peso del material retenido en cada uno de ellos. El material retenido en el fondo se colocó sobre un segundo arreglo de tamices para luego repetir el proceso anteriormente descrito con el propósito de diferenciar el área específica de reacción.

### **Determinación de la densidad aparente:**

Se dispuso de una probeta de 50 mL previamente tarada en la balanza analítica BOECO BAS 31 plus y se colocó un volumen de 20 mL ¿de qué?; se registró el peso de 4,84g ocupado por el material para establecer la relación entre la masa (22,16 g) y el volumen ocupado por la misma. Para la determinación de la densidad real, se utilizó un picnómetro ISOLAB (27).

### **Determinación de la acidez del suelo (pH) y la conductividad eléctrica (CE)**

Se pesaron 10 g de suelo seco, tamizado y homogenizado y se añadieron a un vaso de precipitación de 100 mL, junto con 25 mL de agua destilada. La suspensión se agitó durante 30 min con un agitador magnético, se dejó en reposo durante 1 h para favorecer su decantación y se determinó el pH y la CE de la muestra.

### **Caracterización mineralógica y elemental de la muestra de suelo contaminada con metales pesados.**

Para estos análisis se envió 100 g de muestra compuesta, seca y homogenizada al Departamento de Metalurgia extractiva de la Escuela Politécnica Nacional (EPN), en el cual se determinó: compuestos cristalinos, empleando el difractómetro D8 ADVANCE y el pro-

grama Diffrac plus (EVA Y TOPAS) para cualificación y semi-cuantificación; así como también un análisis semi-cuantitativo por Microscopia Electrónica de Barrido, empleando el microscopio TESCAN-VEGA, con micro analizador de rayos X Bruker (41).

### Otros parámetros analizados.

Parámetros como el color, humedad, textura, granulometría y la concentración de metales pesados (Cd, Ni) se determinaron en el Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental (AQLAB) acreditado por el Servicio de Acreditación Ecuatoriana N° OAE LE C 14-009; y el parámetro capacidad de intercambio catiónico (C.I.C) se determinó en AGRO-CALIDAD.

### Diseño e implementación del sistema experimental.

El equipo de electrorremediación se rediseñó, determinando el tiempo y las distancias óptimas entre los electrodos, definiendo que para un sistema de electrorremediación a escala laboratorio se debe trabajar a una distancia de 15 cm entre los electrodos anódico y catódico, en un tiempo superior a las 24 h.

El material de la cubeta donde se remedió el suelo contaminado con metales pesados es de vidrio templado de 10 mm, cuyas dimensiones son 25 cm de largo, 10 cm de ancho y 13 cm de alto; la distancia entre electrodo es de 15 cm con pozos de 2,5 cm cada uno. El compartimento medio, puede albergar aproximadamente 1200 cm<sup>3</sup> de muestra de suelo a tratar.

Los electrodos utilizados son de grafito, ya que es un material neutro, con una alta capacidad conductora, y muy accesible económicamente. Con las siguientes dimensiones 10 x 8 x 1,5 cm de alto,

ancho y espesor respectivamente. Además, se contó con una fuente de poder de voltaje y amperaje regulable de 0 a 60 V y 0 a 5 A, con dos conductores eléctricos dotados con pinzas (roja carga positiva, negra carga negativa).

### Preparación de los electrolitos.

Se calculó la cantidad de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M) y de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M) necesaria para el experimento. La cantidad de ácido acético requerida, con la ayuda de una pipeta se tomó 5,7 mL de ácido acético glacial con concentración 99,75%, y se aforó a 1000 mL en agua destilada; el mismo proceso se usó para preparar el ácido fosfórico, se tomó 6,1 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, con concentración del 96% y se aforó a 1000 mL, (Nunca se agrega agua al ácido, si no ácido al agua para evitar una reacción explosiva) (42)

### Preparación del agente humectante.

La solución humectante utilizada fue sulfato de hierro 0,1 M (FeSO<sub>4</sub>). Se saturó la muestra de suelo con 185 mL del agente humectante (FeSO<sub>4</sub> 0,1 M), motivo por el cual se pesó 28,07 g de FeSO<sub>4</sub>, y diluyó a 1000 mL, agitando manualmente hasta que el sólido se disolvió.

### Condiciones iniciales de operación.

La duración de cada experimento fue de 48 h, sustituyendo las soluciones electrolíticas cada 4h. En la operación experimental se trabajó con gradientes de voltaje de 25 V a 55 V con intervalos de 10 V, el paso de corriente en el proceso se monitoreó mediante un multímetro, en periodos de 2 h.

En el pozo anódico se colocó una solución de 95 mL de (CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M), y en el pozo catódico 95 mL de (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M).

Para la humectación de 600 g suelo contaminado, la muestra se saturó con 185 mL de (FeSO<sub>4</sub> 0,1 M), en un depósito, mezclándola con movimientos homogéneos circulares durante 5 minutos. Luego se dejó reposar durante 5 h antes de iniciar el proceso de electrorremediación.

Durante el proceso, se llevó a cabo un seguimiento de las variaciones de pH en los pozos anódico y catódico utilizando el pH-metro WTW pH 3110 en intervalos regulares.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo.

Parámetro analizado	Referencia	Resultado	Unidad
Capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.)	PEE/SFA/14	13,86	cmol/kg
pH	EPA 9045D	4,61	~
Conductividad eléctrica (C.E.)	EPA 9050A	195,70	µS/cm

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica inicial de la muestra de suelo (Yaulema et al, 2018)

Fuente: Laboratorios FC-ESPOCH, AGROCALIDAD.

#### Caracterización mineralógica de la muestra de suelo.

Mineral	Formula	Contenido (%)
Cuarzo	SiO <sub>2</sub>	54
Caolinita	Al <sub>2</sub> (Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )(OH) <sub>4</sub>	24
Muscovita	KAl <sub>2</sub> (AlSi <sub>3</sub> O <sub>10</sub> )(OH) <sub>2</sub>	8
Vermiculita	(Mg,Fe,Al) <sub>6</sub> (OH) <sub>4</sub> (Al,Si) <sub>8</sub> O <sub>20</sub> *4H <sub>2</sub> O	3
Nontronita	Na <sub>0,3</sub> (Fe <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> (Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> *nH <sub>2</sub> O	3
Clinocloro	(Mg,Fe) <sub>5</sub> Al(Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub>	2
Grupo plagioclasas (albita, andesina, anortita)	(Na,Ca)Al(Si,Al)Si <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	2
Flogopita	KMg <sub>3</sub> (F,OH) <sub>2</sub> AlSi <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	2
Dolomita	CaMg(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1
Calcita	CaCO <sub>3</sub>	1

Tabla 2. Composición mineralógica inicial de la muestra de suelo. (Yaulema et al, 2018)

Fuente: Laboratorios DEMEX-EPN.

#### Identificación de los potenciales óptimos de remediación.

Trata- miento	[Cd] mg/kg		[Ni] mg/kg		Voltaje (V)	Amperaje (mA)	Área de los electrodos (cm <sup>2</sup> )	Densidad de corriente (mA/cm <sup>2</sup> )
	Inicial	Final	Inicial	Final				
T1	406	151,05	250	84,10	25	90	60	1,50
T2	406	84,80	250	61,55	35	180	60	3,00
T3	406	25,55	250	37,20	45	240	60	4,00
T4	406	39,70	250	45,65	55	280	60	4,67

Tabla 3. Resultados obtenidos después de los tratamientos electrocinéticos (Yaulema et al, 2018)

#### Prueba estadística

HSD Tukey <sup>a</sup>									
Subconjunto para alfa = 0.05									
Voltaje apli- cado	N	[mg/kg] Cd				[mg/kg] Ni			
		1	2	3	4	1	2	3	4
45	3	25,55				37,20			
55	3		39,70				45,65		
35	3			84,80				61,55	
25	3				151,05				84,10
Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

<sup>a</sup>. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 4. Prueba de Tukey. (Yaulema et al, 2018)

### Análisis de los fenómenos de transporte mediante estudios de espectroscopia de absorción atómica y SEM.

Parámetros	Cadmio	Níquel
Agente humectante empleado	FeSO <sub>4</sub> 0,1 M	FeSO <sub>4</sub> 0,1 M
Concentración inicial de la muestra de suelo sin tratar (mg/kg)	406,00± 1,25	250,00± 2,20
Concentración promedio de la muestra de suelo tratado a 45 V, (mg/kg)	26,80	39,40
Observación	Cambio significativo	Cambio significativo

Tabla 5. Resultados de migración iónica de Cd y Ni después del tratamiento electrocinético (Yaulema et al, 2018)

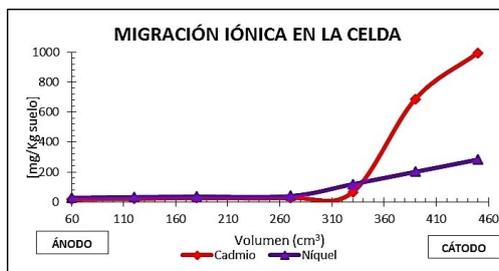


Gráfico 2 Perfil de concentración del Cd y Ni a ciertos volúmenes, durante 48 h, a 45 V (Yaulema et al, 2018)

En relación al Gráfico 2, se debe estudiar la cinética y dinámica del proceso con una mayor cantidad de experimentos, variando las condiciones.

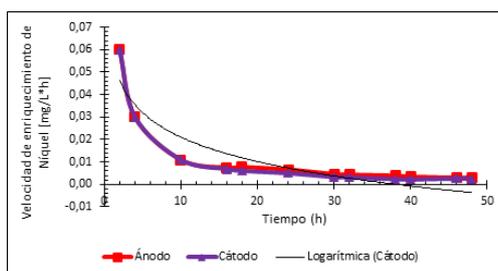


Gráfico 3 Velocidad de migración iónica del níquel hacia los pozos anódico y catódico (Yaulema et al, 2018)

La curva mostrada en el Gráfico 3, puede describirse con una función logarítmica, de la siguiente manera  $y = -0,016\ln(x) + 0,0574$

### Balance de masas de cadmio y níquel presente en la celda y los pozos.

Parámetro		Concentración (ppm)	Masa (mg)
Inicial	cm	250,00	150,00
Región más concentrada	15-13	283,08	144,75
	13-11	201,02	
	11-9	119,00	
Región central	9-6	39,40	4,74
	6-4	35,07	
Región menos concentrada	4-2	32,01	22,63
	2-0	27,20	
Pozo anódico		1,63	0,15
Pozo catódico		1,31	0,12
Total solido		~	172,12
Total solución		~	0,27

Tabla 6. Balance del níquel durante el proceso de lectrorremediación (Yaulema et al, 2018)

Fuente: Laboratorios DEMEX-EPN.

A continuación, se muestran los valores en concentración y masa del cadmio, antes y después del tratamiento electrocinético:

Parámetro		Concentración	Masa
Inicial	cm	406,00 ppm	243,60 mg
Región más concentrada	15-13	996,40 ppm	
	13-11	688,50 ppm	420,24 mg
	11-9	66,09 ppm	
Región central	9-6	26,80 ppm	3,22 mg
	6-4	25,40 ppm	
Región menos concentrada	4-2	21,02 ppm	14,99 mg
	2-0	16,03 ppm	
Total sólido		~	438,45 mg

Tabla 7. Balance del cadmio durante el proceso de electroremediación (Yaulema et al, 2018)

Fuente: Laboratorios DEMEX-EPN.

### Análisis de microscopía de barrido electrónico.

Elemento	Contenido elemental antes del tratamiento (%)	Contenido elemental después del tratamiento (%)
Si	33,1	14,38
Al	26,7	8,05
Fe	5,96	3,20
K	4,5	0,39
Mg	2,72	0,33

Tabla 8. Caracterización química elemental final de la muestra de suelo (Yaulema et al, 2018)

Fuente: Laboratorios DEMEX-EPN.

## IV. DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se observa que la baja capacidad de intercambio catiónico, se debe al suelo franco limoso, por lo tanto, esto afecta el movimiento y retención de cationes y a la capacidad tampón del suelo (2). Además, la baja conductividad eléctrica representa un suelo no salino, esto se corrobora con las bajas concentraciones de sales, reflejadas en la C.I.C. El pH, en base al departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) es un suelo fuertemente ácido, por la presencia de aluminosilicatos (43). Generalmente, los metales son móviles a pH bajo, en forma de especies iónicas libres o como órgano-metales solubles; al pH alcalino forman carbonatos o fosfatos minerales insolubles (36).

Los resultados obtenidos durante el análisis de la muestra de suelo contaminada con Cd y Ni (Tabla 3), fueron comparados con la Tabla 6 denominada "límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburi-fera...", del reglamento ambiental de actividades hidrocarburi-feras (RAOHE 1215), los valores fueron mayores a

los límites máximos permisibles, donde el cadmio tiene una concentración inicial de 406 mg/kg de suelo, y el níquel 250 mg/kg de suelo, estos valores determinan al suelo como altamente contaminado.

Suelos con altas concentraciones de metales pesados como Cd y Ni en límites no permisibles hacen imposible ser depositados directamente al medio ambiente, la presencia de estos contaminantes en el medio se ve relacionado con problemas de bioacumulación, persistencia, problemas desfavorables para la vida, etc.

En la Tabla 2, se evidenció mayoritariamente la presencia de minerales primarios como los silicatos, aunque también se presentaron óxidos e hidróxidos, fluoruros y carbonatos, el alto porcentaje de cuarzo y caolinita se debe a la presencia de silicio y aluminio, responsables de la acidez de los suelos.

El silicato más resistente a la alteración es el cuarzo y es el más abundante en las arenas de los suelos. En las caolinitas, el silicio no se sustituye nunca, su partícula elemental es eléctricamente neutra, su C.I.C es muy baja (1-10 cmol(+)/kg), lo que explica la baja fertilidad de los suelos ricos en caolinita. La vermiculita no es muy frecuente. Son arcillas de tipo intermedio entre las cloritas y las micas, son expandibles, lo que permite la entrada de agua y cationes que sustituyen al Mg<sup>2+</sup>.

La Tabla 3, muestra que cada experimento se realizó en un tiempo continuo de 48 h, se usaron soluciones electrolíticas para atraer la migración iónica de los contaminantes hacia los pozos receptores. En el pozo anódico se utilizó ácido acético, y en el pozo catódico se utilizó ácido fosfórico, humectando la muestra durante 5 h con sulfato de hierro, cabe mencionar además que todas las soluciones utilizadas tuvieron una concentración 0,1 molar. Siendo el tercer tratamiento (T3) con condiciones de 45 V y 240 mA, el que representa una mayor

eficiencia de remoción del 93,7% para el caso del cadmio; y para el níquel 85,1%. Existiendo además una diferencia entre la aplicación de diferentes voltajes. La diferencia con los tratamientos T1, T2 y T4, es básicamente la diferencia de voltajes: 25 V, 35 V y 45 V respectivamente, y por tanto la variación de su amperaje y densidad de corriente.

La prueba estadística de Tukey que se muestra en la Tabla 4, aplicada al tratamiento de níquel demostró que, en los cuatro tratamientos de electroremediación el voltaje óptimo es el de 45 V, en el cual se disminuyó con mayor eficiencia el contaminante presente en la muestra. Como segundo tratamiento más eficiente se presentó al experimento cuatro a 55 V.

La determinación del desplazamiento iónico está basada en el experimento tres (T3), donde existe una diferencia con la concentración promedio del suelo tratado; es decir se encuentra fuera del rango de incertidumbre. En el caso del níquel la concentración final del suelo tratado se encuentra fuera del rango de incertidumbre con respecto a la concentración de suelo sin tratar. Mediante esta técnica de discriminación iónica, se definió que existió un cambio significativo en las concentraciones de cadmio y níquel después de aplicar el tratamiento electrocinético; lo cual demuestra una alta eficiencia en la aplicación de esta tecnología.

En la Tabla 5, se observa que la mayor concentración de cadmio reportada después del tratamiento electrocinético en la muestra de 996,40 mg/kg de suelo, en un volumen de 60 cm<sup>3</sup>, comprendidos entre los centímetros 13 y 15 cercanos al cátodo; mientras que en las zonas intermedias comprendidas entre los centímetros 6 y 9, en un volumen de 90 cm<sup>3</sup>. Se obtuvo una disminución del metal, que alcanzó un promedio de 26,80 ppm, además, en los 2 cm cercanos al ánodo se evidencia una concentración baja de

16,03 ppm, en estas regiones la concentración de cadmio es menor. Esto se debe a que la mayoría de los metales se encuentran en forma de cationes, los mismos que migraron y se acumularon en las zonas cercanas al cátodo (polo negativo).

Con relación al enriquecimiento de cadmio y níquel en los pozos anódico y catódico que se muestra en los gráficos 2 y 3. Se demostró que la migración iónica de los metales de interés se encontró favorecida hacia el cátodo, además, se presentan los perfiles de velocidad y la concentración acumulada del níquel en ambos pozos. Cabe mencionar, que la migración del cadmio se despreció, ya que mediante los análisis de absorción atómica los resultados reportados fueron menores al rango de detección del equipo (<0,05) ppm.

Durante el proceso, la velocidad de enriquecimiento de níquel en ambos pozos fue disminuyendo progresivamente, debido que las soluciones tienden a saturarse, por ello se sustituyeron periódicamente las mismas. Esto, favoreció una migración dirigida de los iones metálicos, durante las primeras 10 h de tratamiento, en la que existió una movilidad significativa en ambos pozos, y pasadas las 30 h se evidenció una cierta estabilización con un valor promedio 0,004 mgNi/L·h en el ánodo, y en el cátodo una velocidad de enriquecimiento menor 0,003 mgNi/L·h. La presencia del contaminante en ambos pozos demuestra la existencia de níquel en formas aniónicas y catiónicas.

En la Tabla 6, debido a la baja migración iónica en los pozos, se debe saber la concentración total de níquel en el sistema. La región de mayor acumulación fue la cercana al cátodo en una distancia comprendida entre 9 y 15 cm; mientras que en la zona céntrica comprendida entre los 6 y 9 cm en un volumen de 90 cm<sup>3</sup> se obtuvo una concentración baja en comparación a la inicial.

Entre los 0 y 6 cm contiguos al ánodo, la masa es menor en comparación con la masa acumulada en la zona aledaña al cátodo, esto se debe a que la mayoría del níquel se encuentra en forma de cationes y es atraída por el campo catódico. La masa acumulada de níquel presente en los pozos es relativamente baja, en el pozo anódico existe una mayor acumulación de níquel con respecto al pozo catódico con valores de 0,15 y 0,12 mg, respectivamente.

En la Tabla 7, se demuestra que al igual que el níquel, el cadmio tiene la misma tendencia de desplazamiento iónico en la celda, presentando una baja o nula migración iónica en los pozos, por ello se debe saber la concentra-

ción total de cadmio en el sistema, se analizó diferentes volúmenes de muestra en la celda. La región de mayor acumulación fue la cercana al cátodo en una distancia comprendida entre 9 y 15 cm, mientras que en la zona céntrica comprendida entre los 6 y 9 cm se obtuvo una concentración baja en comparación a la inicial.

Entre los 0 y 6 cm contiguos al ánodo, la masa de cadmio, es menor en comparación con la masa acumulada en la zona aleada al cátodo, esto se debe a que la mayoría de iones de cadmio se encuentran en forma catiónica y son atraídos por el campo catódico. La masa acumulada en los pozos anódico y catódico fue despreciable debido a valores reportados menores a  $<0,05$  ppm, rango no detectable por el equipo de absorción atómica.

Los análisis realizados por la técnica microscopía de barrido electrónico se efectuaron después del tratamiento electrocinético (Tabla 8). En la muestra que se trabajó a 45 V en un tiempo de remediación de 48h, la zona analizada comprende desde 10 a 15 cm de la muestra, desde el ánodo hacia el cátodo, en un volumen de 150 cm<sup>3</sup>, obteniéndose así, una disminución de los iones iniciales presentes en la muestra sin tratamiento. El silicio presentó una disminución del 43,44%, el aluminio 30,15%, el hierro 53,69%, potasio 8,67% y el magnesio un 12,13%. Esto se debe al desplazamiento de los iones hacia los electrodos siendo atraídos por el campo eléctrico generado. En el Gráfico 4, se muestran microfotografías capturadas por el microscopio donde evidencia una mayor acumulación y saturación de las partículas del suelo, además se evidencia la reducción del tamaño de partícula.

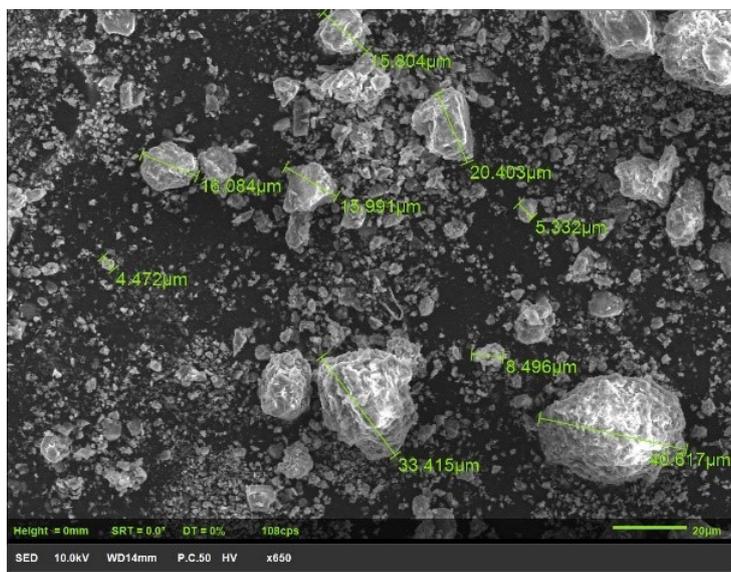


Gráfico 4 Muestra tratada, obtenida por microscopía de barrido electrónico (Yaulema et al, 2018)

## V. CONCLUSIONES

La electroremediación es una técnica poco estudiada en nuestro país, tiene un gran potencial para tratar diversos tipos de contaminantes como compuestos orgánicos e inorgánicos, se seleccionó el potencial óptimo de remediación, durante un periodo de 48 h, mediante la aplicación de soluciones electrolíticas e humectantes para movilizar los iones metálicos presentes en la muestra que permitieron recuperar el suelo contaminado.

La concentración inicial de metales pesados cadmio y níquel en la muestra, superan los límites máximos permisibles, establecidos por la Tabla 6 del RAOHE 1215 para uso industrial, con una concentración de cadmio 406 ppm, y el níquel 250 ppm en contraste con la norma que sugiere 10 y 100ppm respectivamente. Se debe mencionar, además, que la aplicación de procesos electrocinéticos es más efectiva en suelos arcillosos debido a su carga superficial negativa.

En la identificación de los potenciales óptimos de remediación de la muestra de suelo contaminada con metales pesados cadmio y níquel, se seleccionó al tratamiento (T3) con un voltaje constante de 45 V a una intensidad de corriente inicial de 0,24 A.

La concentración final de Cd fue de 25,55 ppm y una eficiencia máxima de remoción de 93,71 %, mientras que para el níquel una concentración final de 37,20 ppm con una eficiencia de remoción de 85,12 %, permitiendo cumplir con la normativa aplicable para actividades hidrocarburíferas RAOHE 1215.

Existe una migración iónica dirigida hacia el campo catódico, esquematizándose una mayor acumulación de los iones metálicos en una distancia comprendida entre los 9 y 15 cm contiguos al cátodo,

mientras que, en el otro extremo cercano al ánodo, la concentración de estos metales es relativamente baja.

La migración iónica de Ni en los pozos tuvo una acumulación mínima de los iones metálicos, sin embargo, presentó

una mayor cantidad de migración al pozo anódico, que, al catódico.

Esto se debe a la presencia de níquel en formas aniónicas, el desplazamiento de cadmio fue despreciable no existió una acumulación significativa de este metal en los pozos.

## Referencias

1. Jaramillo J. Introducción a la Ciencia del Suelo Suelos y Ambiente. 2002.
2. López VL, Rubén Remediación electrocinética de suelos de baja permeabilidad contaminados con compuestos orgánicos hidrófobos Universidad de Castilla la Mancha, Ciudad Real, España. 2013;1(12):34-44.
3. Oviedo RA, B, . Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera. . Bionatura. 2017;2(4):437-41.
4. ECOLOGÍA IND. Composición y propiedades del suelo. Ecología Nacional. 2018:22-32.
5. Escobar AO, Segundo. Electrorremediación en función de la densidad de corriente y la concentración de ácido acético, como alternativa para la disminución de plomo en relaves mineros - mina paredones. niversidad Privada del Norte Cajamarca. 2016:105.
6. Mosquera SM. Evaluación de procesos no convencionales de remediación de relaves sulfurados de minería contaminados con cobre, zinc y plomo. Escuela Politécnica Nacional, Quito. 2014:1.219.
7. Aragón CDIT, Ernesto; Guevara, Alicia., . Diseño a escalas laboratorio y piloto de un sistema de remediación electrocinética de suelos contaminados con metales pesados. Revista EPN. 2014;vol. 34:9-15.
8. ARPEL. Tratamiento y eliminación de desperdicios de perforación de exploración y producción. Alconsult International Ltd Montevideo, Uruguay 2013:116.
9. Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas 1215 (1998).
10. Texto Unificado de Legislación secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para suelos contaminados. , (2015).
11. Acuerdo No. 061 Reforma del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria. , (2015).
12. Martínez L. Lo que usted debe saber del níquel Muy interesnte digital, 2012, Austin, Texs no 800. 2012;1:2.
13. Miranda Cabrera MC. Eliminación de metales pesados en el agua de reinyección del campo libertador oeste utilizando quitosán Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2006(1):209.
14. Moreno P. Disminución de la concentración de cadmio en el suelo con la técnica de electroremediación en una celda construida en el laboratorio Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Torreón, México 2017:72.
15. Nordberg Gea. Metales: Propiedades químicas y toxicidad Metales en el suelo. 2001;3ra ed. Ginebra.
16. Granda JF. Evaluación de la técnica de electrorremediación de suelos contaminados por metales pesados. Universidad Técnica Particular de Loja. 2011:79.
17. Gilbon M. Electroremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. . Tesis de Licenciatura en Química. : Universidad Autónoma Metropolitana, ; 2001.
18. Molina Díaz GE, Palestina Caliz V, Piedras Pérez JA. Recuperación electrocinética de hidrocarburos sorbidos en suelos contaminados. Universidad Autónoma Metropolitana: Universidad Autónoma Metropolitana; 2004.
19. Hamed J. AYByGRJ. Pb(II) removal from kaolinite by electrokinetics. . J Geotech Eng. 1991:117, 241-71.

20. García H, Vargas R, Reyes C. Electro-remediación de Pb en suelos contaminados de Zimapán Hidalgo, usando agua y ácido acético como electrolitos. Universidad de Zimapán. 2010:1158-67.
21. Acar Y, Alshawabkeh A. Electrokinetic remediation 1. Pilot scale test with Pb-spiked kaolinite. J. . Geotech Eng 1996(122):173-85.
22. Reed B, Berg M, Thompson J, Hatfield J. Chemical conditioning of electrode reservoirs during electrokinetic soil flushing of Pb-contaminated silt. Environ Eng. 1995;1(121, 805-815.).
23. Hicks R, Tondorf S. Electrorestoration of metal contaminated soils. Environ Sci Technol. 1994(28):2203-10.
24. Suer P, Gitye K, Allard B. Speciation and transport of heavy metals and macroelements during electroremediation. . Environ Sci Technol. 2003;37:177-81.
25. Gristo P, Salvarrey A. Guía para la Identificación y Evaluación Preliminar de Sitios Potencialmente Contaminados Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo. 2006;2(2).
26. García, Laura, Ramírez M, Reyes V. Electrorremediación de suelos arenosos contaminados por Pb, Cd y As provenientes de residuos mineros, utilizando agua y ácido acético como electrolitos. Sociedad Mexicana de Ciencias y Tecnología de Superficies y Materiales. 2011;24(1):24-9.
27. Salamanca AS, Sadeghian La densidad aparente y su relación con otras propiedades en suelos de la zona cafetera Colombiana. . Cenicafé 2015;56(4):381-97.
28. Ortiz Bea. Técnicas de recuperación de suelos contaminados Fundación para el conocimiento Madrid círculo, Huelva, España: . 2007;1(2):5-12.
29. Risco Cea. Electrokinetic Remediation of Soils Polluted with Pesticides. Flushing and Fence Technologies American Society of Civil Engineers, Reston, VA, España. 2016:20.
30. EPA. Soil Screening Guidance User 's Guide, Washington, DC USA 2016:1-39.
31. López A. Manual de Edafología Info agro Constanza. 2006.
32. Alcaino Concha, Guillermo Ignacio. . Análisis y comparación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales Tesis pregrado Universidad de Chile. 2014.
33. Graciela S, Carmen P. Guía sobre suelos contaminados Conecta PYME Zaragoza, España. 2004.
34. De la Rosa Pérez D, ; Teurli, León; Ramírez, Marta, . Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo Revista internacional de Contaminación Ambiental, Puebla, México. 2007;23:129-38.
35. Aragón C, De la Torre E, Guevara A. Diseño a escalas laboratorio y piloto de un sistema de remediación electrocinética de suelos contaminados con metales pesados Proyecto (tesis)(Pregrado) Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. 2013:250.
36. Volke TV, Juan; De la Rosa, David. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación Instituto Nacional de Ecología (INE-Semarnat). 2005.
37. Sanmiguel JX, Guerrero SR. Validación del método para determinar Pb, Cd, Ni por espectrometría de absorción atómica de llama en agua y suelo. . Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Orellana, Ecuador 2017. 2017:22-124.
38. AL-HAMDAN, Zahir A, Reddy; Krishna R. Transient behavior of heavy metals in soils during electrokinetic remediation. Chemosphere. 2008;United States of America vol. 71, no. 5, pp. 860-871.
39. Gutiérrez PS, Roman de la Vara Análisis y diseño de experimentos. McGrawHill. 2008;2(3).
40. Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas. Decreto Ejecutivo 1215 (2010).
41. Herrera A. Efecto del silicio en la fertilidad del suelo, en la incidencia de enfermedades y el rendimiento del cultivo de arroz (*Oryza sativa*) var CR 4477. . Tecnológico de Costa Rica sede regional San Carlos, SI 2011. 2011;1:108.
42. Granda JF. Evaluación de la técnica de electrorremediación de suelos contaminados por metales pesados. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja; 2017.
43. Pereira Cea. Edafología 1. Edafología Caldas. 2011.



# OBTENCIÓN DE DETERGENTE LÍQUIDO USANDO SAPONINA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd*), CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) CABUYA (*Sisalana perrine*) Y SU DISEÑO DE PRODUCCIÓN

**Obtaining liquid detergent using quinoa saponine (*chenopodium quinoa willd*), chocho (*lupinus mutabilis sweet*) cabuya (*sisalana perrine*) and its production design**

Mario-Gustavo Villacrés Alvarez, Cristina-Gabriela Calderón Tapia\*, Lourdes-María Cauja Moyón, Talía-Manuela Arcos Guamán.

Facultad de Ciencias Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ESPOCH, Riobamba, Ecuador.

\*cristy.gct@gmail.com

## R esumen

Desde la aparición de la industria, así como obtenemos productos de mejor uso, también experimentamos cambios que perjudican nuestros recursos hídricos. Un ejemplo muy claro de ello es la presencia de tensoactivos en los detergentes, que por su naturaleza forman una capa de grasa en la superficie evitando el paso del oxígeno hacia el interior, provocando la muerte de las especies acuáticas, y sus restos al descomponerse emanan olores fuertes.

La industrialización de la quinua se realiza por vía seca que se conoce como escarificación, el polvillo es desechado sin uso alguno. Para el caso del chocho al realizar el lavado se elimina la saponina en su totalidad, en ríos, acequias o alcantarillado. Y en la industrialización de la cabuya en la producción de cuerdas, el zumo con alto contenido de saponina, también es desechado sin ninguna utilidad.

Por esta razón se diseñó un proceso para obtener un detergente líquido amigable con el medio ambiente, utilizando como materia prima los “desechos” generados en la industrialización de quinua, chocho y cabuya, utilizando su contenido de saponina que es biodegradable. La saponina se obtuvo por extracción simple utilizando como solvente etanol al 96% de pureza. Donde sus propiedades físico-químicas fueron: densidad 1,11g/mL; temperatura 20,2°C; pH 6,64; IR 1,372; °Brix 25 y viscosidad 386,8 cP.

El detergente obtenido se rigió bajo la Norma NTE INEN 0847 (2009), obteniendo de materia grasa un 3,28% de alcalinidad libre (NaOH) 0%, de materia activa 36,12%, fosfatos 0,08% y biodegradabilidad 94%, lo que indica que es un producto libre de álcalis, silicatos de sodio anticorrosivos, estabilizadores de espuma de amida, carboxi metil celulosa para la formación de suspensiones de partículas de suelo, blanqueadores, suavizantes de tejidos, enzimas, abrillantadores ópticos y sulfato de sodio que son contaminantes, por lo tanto aportaría a la conservación ecológica del planeta, por lo que se puede comercializar, además se realizó los cálculos de los índices financieros dando como resultado un VAN de \$174.074,21 un TIR de 87% con un índice de rentabilidad de 2,82 siendo una muy buena opción para una microempresa por lo que se considera un proyecto totalmente viable

**Palabras clave:** *Chenopodium quinoa Willd*, *Lupinus mutabilis Sweet*, *Sisalana perrine*, saponina, detergente.

## A bstract

Since the appearance of the industry, as well as we obtain products of better use, we also experience changes that damage our water resources. A very clear example of this is the presence of surfactants in detergents, which by their nature form a layer of fat on the surface, preventing the passage of oxygen into the interior, causing the death of aquatic species, and their remains when decomposing emanate strong smells.

The industrialization of quinoa is carried out by dry way that is known as scarification, the dust is discarded without any use. In the case of the lupine, when washing, the saponin is completely

eliminated in rivers, ditches or sewers. And in the industrialization of the cabuya in the production of ropes, the juice with high content of saponin, is also discarded without any use.

For this reason a process was designed to obtain a liquid detergent friendly to the environment, using as raw material the "waste" generated in the industrialization of quinoa, lupine and cabuya, using its content of saponin that is biodegradable. Saponin was obtained by simple extraction using 96% ethanol as a solvent. Where its physical-chemical properties were: 1.11g / mL density; temperature 20.2 ° C; pH 6.64; IR 1,372; ° Brix 25 and viscosity 386.8 cP.

The detergent obtained was regulated under the NTE INEN 0847 (2009) standard, obtaining 3.28% of free alkalinity (NaOH) 0%, of active material 36.12%, phosphates 0.08% and biodegradability 94%. , which indicates that it is a product free of alkalis, anti-corrosive sodium silicates, amide foam stabilizers, carboxy methyl cellulose for the formation of suspensions of soil particles, bleaches, fabric softeners, enzymes, optical brighteners and sodium sulphate which are contaminants, therefore contribute to the ecological conservation of the planet, so it can be commercialized, in addition the calculations of the financial indexes were carried out, resulting in a NPV of \$ 174,074.21, an IRR of 87% with a profitability index of 2.82, which is a very good option for a microenterprise. It is considered a totally viable project.

**Key words:** quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*), chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), agave (*Sisalana perrine*), extraction, saponin, liquid detergent.

**Fecha de recepción:** 16-05-2018

**Fecha de aceptación:** 30-01-2019

## I. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) es una planta propia de la región andina, su cultivo puede soportar condiciones adversas como heladas, viento, sequía etc., (1).

Desde hace cientos de años se la utiliza como alimento, y existen varios estudios que muestran sus propiedades beneficiosas como por ejemplo antimicrobianas y antioxidantes (2).

Pero existen otras utilidades que se están estudiando, como la extracción saponina a partir de sus tallos, utilizando el proceso a presión de agua caliente (PHWE) obteniendo resultados alentadores (3), sin embargo no se ha intentado extraer la saponina con los residuos del proceso de escarificación.

El chocho *Lupinus mutabilis Sweet* también es un referente alimenticio de las comunidades indígenas del Ecuador, existen escasas publicaciones para el uso del mismo que no sea como antimicrobiano o alimento, hay cierto estudio donde se le usa para biochar, (4), pero no hay registros del uso de las saponinas provenientes del chocho.

La tercera especie en cuestión es el agave (*Sisalana perrine*), una planta con fibras duras, que representan el 3-5% de su peso y se utilizan para elaboración de sogas, el 95-97% restante se conoce como desecho de sisal, que hace

años no tenía uso, pero se descubrió que contiene saponinas esteroideas que pueden usarse potencialmente en formulaciones de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, así como para la biorremediación del suelo (5).

Por otro lado la problemática de los detergentes es su formulación, la cual incluye intercambiadores de iones, álcalis (carbonato de sodio), silicatos de sodio anticorrosivos, estabilizadores de espuma de amida, carboxi metil celulosa para la formación de suspensiones de partículas de suelo, blanqueadores, suavizantes de tejidos, enzimas, abrillantadoras ópticas, fragancias y sulfato de sodio como diluyente (6).

Ciertos detergentes poseen en su composición cadenas alquílicas altamente ramificadas, extremadamente resistentes al ataque microbiano, por lo que son poco biodegradables, por éste efecto al entrar en contacto con medios acuáticos naturales, dan lugar a la formación de espumas en ríos y lagos, provocando pérdidas en la fauna y flora del lugar. (7)

Dichos antecedentes han despertado el interés en varios investigadores para crear productos biodegradables, que no generen un gran impacto en el ecosistema.

Si se sustituye el dodecilsulfonato de sodio de los detergentes comunes por moléculas orgánicas esteroides o triterpenos unidos a un azúcar hidrófilo, se obtendría un detergente biodegradable (8). La saponina es una molécula con glucósidos triterpénicos y se encuentra presente en el chocho, quinua y cabuya. Por lo que en el presente estudio se pretende establecer protocolos de extracción de saponina a nivel industrial y diseñar un proceso para la obtención de un detergente biodegradable, que contribuya a la disminución de la contaminación producida por los detergentes. (9)

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó el desecho obtenido de la escarificación de la quinua de la industria Maquita ubicada en la región Sierra del Ecuador, el chocho se trasladó desde la parroquia Tixán y la cabuya se obtuvo de plantaciones ubicadas en San Gerardo del cantón Guano. Se realizó de forma manual la selección de la muestra y limpieza de la materia prima utilizando la norma NTE INEN 1233 (1995) (10).

Para la extracción de saponina se utilizó el método de destilación simple, en la cabuya un pre tratamiento de la muestra, para lo cual se realizó un proceso de extrusión utilizando un molino. Luego el zumo resultante de las muestras de chocho, cabuya y quinua se dejaron remojar durante dos días en etanol al 96% de pureza.

### Filtración

La etapa de filtración garantiza que no haya partículas sólidas que puedan alte-

rar las propiedades del detergente. En el zumo de cabuya se produce una torta con un espesor considerable por lo cual se utiliza un filtro prensa y se obtiene un zumo clarificado, es muy importante tener en cuenta esta fase, para que posteriormente en la etapa de filtración no se queме la muestra. (11)

### Destilación del zumo de cabuya quinua y chocho para obtener saponina

En la etapa de destilación se tiene en cuenta la temperatura a la que debe ebulir el zumo (12), dado que si sobrepasa los 100°C existe un desequilibrio de la saponina, produciéndose burbujas, generando el aumento de presión, provocando la subida de la saponina hacia el condensador, y posterior pérdida de la materia prima para la elaboración del detergente. En esta fase se puede recuperar el solvente, para reducir costos de producción. (13)

### Segunda Filtración

La segunda filtración se dará dependiendo de la composición de la cabuya, por si se forme al final del destilado una capa de grasa que debe filtrarse para evitar grumos en el detergente. (14)

### Análisis de saponina

Para determinar si la saponina está en óptimas condiciones se procede a su caracterización físico química, tabla 1. (10)

PARÁMETRO	RESULTADO
Densidad	1,11g/mL
Temperatura	20,2°C
pH	6,64
Índice de refracción	1,372
Grados Brix	25
Viscosidad	386,8 cP
Método de espuma (tubo de 15 cm)	8 cm

Tabla 1. Resultados de los análisis físico -químicos de la saponina

### Mezclado

Se añaden aditivos al detergente tales como: Texapón, vinagre de manzana, colorante natural y aroma (15), agitando de manera vigorosa por 20 minutos en cada aditivo utilizado para que la homogenización sea total. (16)

### Análisis del detergente

Se realizó análisis fisicoquímicos del detergente líquido obtenidos como son: materia activa, materia grasa, alcalinidad total, fosfatos, pH, Biodegradabilidad, tabla 2.

PARÁMETRO	RESULTADO
Densidad	1,07-1,11 g/mL
Temperatura	20 °C
pH	7,0 - 9,0
Viscosidad	10000 cP

Tabla 2 Resultados de los análisis físico-químicos del Texapón N70 A.

### Envasado y almacenamiento

Al realizar un análisis de estrategia de marketing se utilizó envases de 1 litro y 1 galón, siendo las presentaciones más comunes que están en el mercado.

Una vez envasado, según el diseño de la planta de producción propuesto ver Figura 1, el producto irá al área de almacenamiento y posteriormente se realizará la distribución a los distintos puntos de venta. (17)

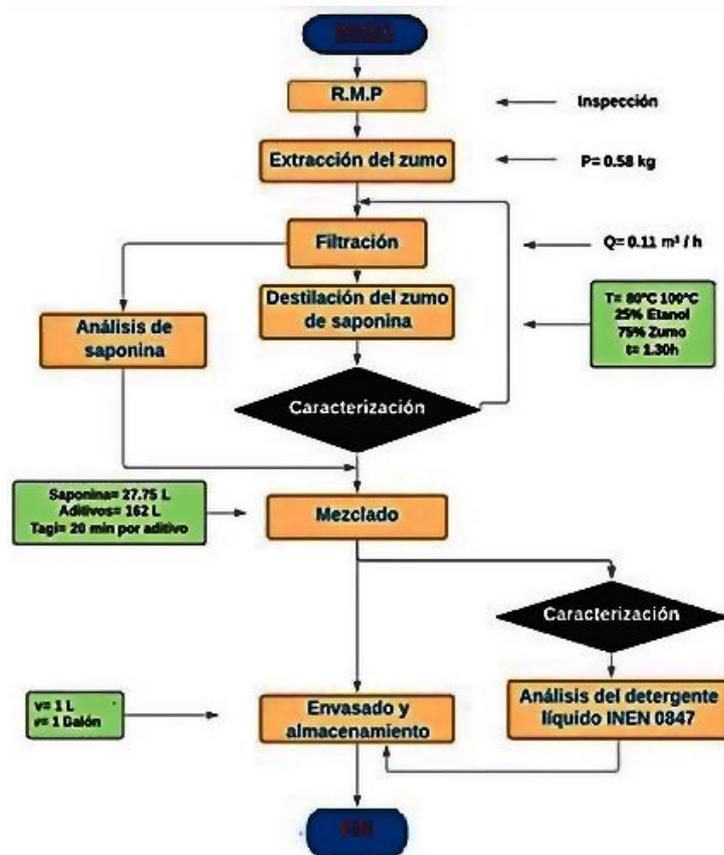


Figura 1 Diagrama del proceso

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de destilación simple utilizando como solvente etanol al 96% de pureza, es el método convencional (3), que brinda ventajas frente a otros métodos de extracción como soxheth, liofilización, evaporación en baño maría o estufa.

Con el método de destilación simple se obtuvo un tiempo de extracción de 1.30 horas, el solvente utilizado es recuperable, lo cual es importante para una producción a gran escala. Las muestras no se contaminan, lo que si sucede con el método soxheth. Y lo más importante, se obtiene una saponina en estado líquido que facilita la mezcla en la preparación del detergente líquido, y con los otros métodos se obtiene una saponina en estado sólido.

En la tabla 1 se muestran los resultados de los análisis físico-químicos de la saponina, sin embargo la saponina en la actualidad no tiene una normativa vigente ecuatoriana, entonces se puede comparar con los valores del Texapón N70A que se muestran en la tabla 2.

Como se observa estos parámetros están dentro de rango permitido, y al momento de mezclar la saponina con el texapón se obtuvo una mezcla totalmente homogénea. En la caracterización físico-química final del detergente líquido que se observa en la tabla 3, conforme a la norma NTE INEN 0847 se obtuvo: 36,12% de materia activa que es claramente la saponina, 94% de biodegradabilidad ya que se utilizó la saponina sin añadir compuestos inorgánicos, garantizando un detergente libre de: álcalis y fosfatos que se puede desechar en las vertientes sin causar un efecto nocivo al medio ambiente (19).

Los resultados se compararon con tres tipos de detergentes industriales como se muestra en la tabla 4, que fueron uti-

lizados en derrames de crudos livianos, sin embargo se puede observar que la biodegradabilidad de aquellos detergentes son menores que el obtenido.

PARÁMETRO	RESULTADO
Materia grasa	3,28%
Alcalinidad Libre	0%
pH	1,34
Materia Activa	36,12%
Fosfatos	0,08%
Biodegradabilidad	94%.

Tabla 3. Resultados de los análisis del detergente líquido

DETERGENTE	BIODEGRADABILIDAD
D.IndustrialN4 – 3G	80%
D.IndustrialN4 – 3M	80%
D.IndustrialN4 – 3Ce2	75%

Tabla 4 Resultados de biodegradabilidad de tres tipos de detergente líquido industrial

### Dimensionamiento de los equipos a escala industrial para la obtención del detergente

Los equipos necesarios para la obtención de detergente líquido se muestra en la Figura 2. La cual está dada para una producción de 189,25L/h de detergente líquido (20)

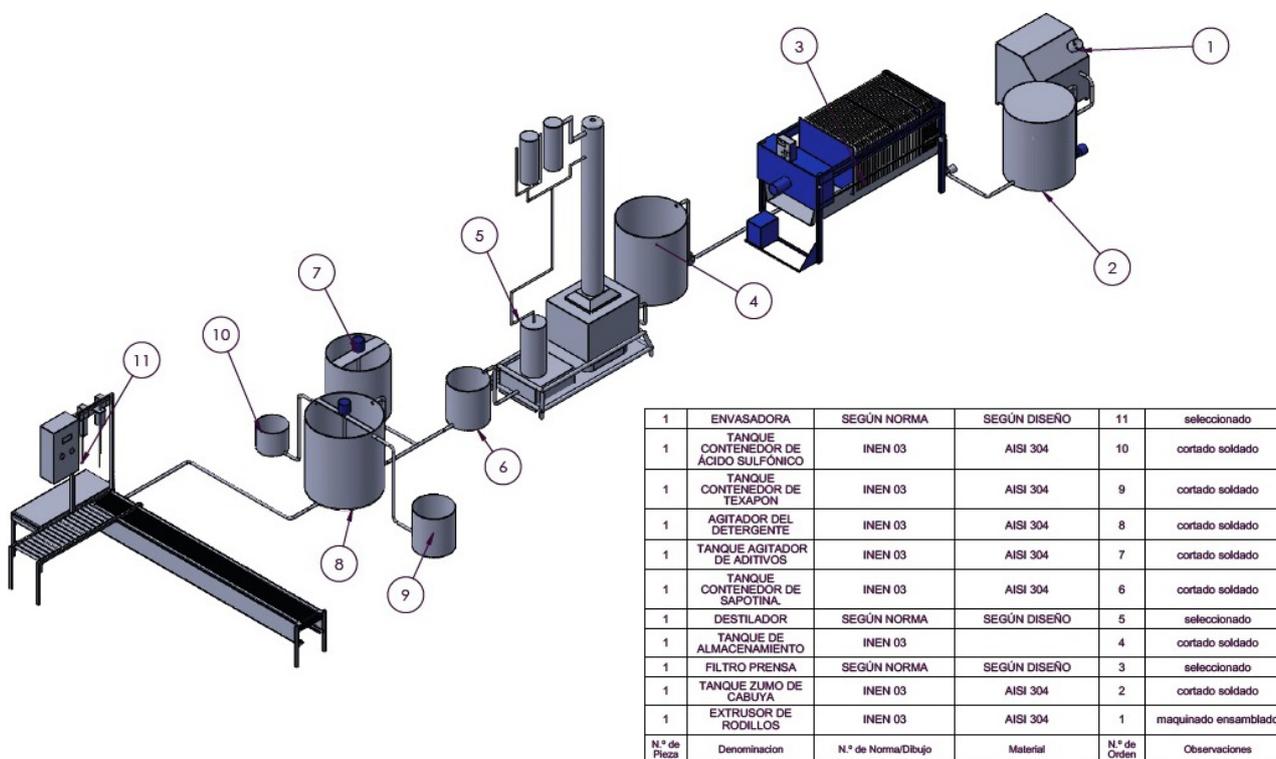


Figura 2 Diagrama de los equipos utilizados en el proceso.

### Estimación del presupuesto y viabilidad del proyecto

Se realizó un análisis financiero ilustrado en la tabla 5, para verificar si este proyecto es viable o no, se hace uso del cálculo de los indicadores financieros, VAN (Valor Actual Neto) \$174.074,21.

La Tasa Interna de Retorno al implementar este proyecto será del 87%. I. Renta-

bilidad \$ 2,82 esto nos indica que por cada dólar invertido se obtendrá una ganancia neta de 1,82 ctvs., siendo un valor muy considerable de ganancia y el periodo de recuperación de lo invertido será de 1 año con dos meses.

Por esta razón se considera que este proyecto financieramente es viable, debido a la importancia ancestral de las plantas utilizadas como materia prima (22), el hecho de utilizar desechos de las mismas que darían un valor agregado al proceso, y finalmente por el producto obtenido con un alto índice de biodegradabilidad.

INVERSION INICIAL 77751,5									
Σ Costo por quipos	Recursos humanos	Estructura física	Servicios básicos	Año de Operación	Ingresos Totales	Egresos Totales	Flujo Efectivo Neto	Tasa de Descuento 10%	Acumulado
26310	7687,500	93569,120	2800	1	157135,032	47050	110085,032	99076,529	-10280,621
				2	162075,885	48436,580	113639,305	102275,375	91994,754
				3	169779,980	50738,958	119041,022	107136,919	146586,659
				<b>TOTAL</b>	<b>488990,897</b>	<b>146225,538</b>	<b>342765,359</b>	<b>308488,823</b>	<b>228300,792</b>
<b>INDICADORES FINANCIEROS</b>									
<b>VAN</b>						\$174.074,21	VAN > 0 Rentable		Se Acepta
<b>TIR</b>						87%			Se Acepta
<b>INDICE DE RENTABILIDAD</b>						2,821			Se Acepta
<b>PERIODO DE RECUPERACION</b>						1,2 años			

Tabla 5. Resultados del presupuesto del proyecto

#### IV. CONCLUSIONES

El estudio macromorfológico de hojas, flores, frutos y semillas, y el estudio micromorfológico de flores, hojas y polen permitieron identificar y diferenciar cada una de las especies del género *Passiflora* presentes en la provincia de Chimborazo.

Esta investigación representa la etapa inicial del

estudio comparativo de la actividad psicoactiva de especies de *Passiflora* de Chimborazo, las cuales presentan un alto potencial ansiolítico.

En etapas posteriores es necesario realizar análisis de la composición química y estudios de actividad farmacológica y toxicidad.

## Referencias

1. Jacobsen, S. Mujica, A. & Jensen, C. The Resistance of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to Adverse Abiotic Factors, *Food Reviews International*. 2003; 19(2): 99-109.
2. Vega, A. Zura, L. Lute, M. Jagus, R. Agüero, V. Pastén, A. Scala, K. & Uribe, E. Assessment of Dietary Fiber, Isoflavones and Phenolic Compounds with Antioxidant and Antimicrobial Properties of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.); *Chilean journal of agricultural & animal sciences*. 2018; 34 (1): 57-67.
3. Gil, A. Salas, D. Grey, C. Nordberg, E. Rodriguez, I. Linares, J. Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Elsiever Industrial Crops and Products*. 2018; 121(1): 54-65.
4. Heredia, M. Tarelhoa, L. Matosa, A. Robaina, M, Narváez, R. Peralta, M. Thermoeconomic analysis of integrated production of biochar and process heat from quinoa and lupin residual biomass. *Elsevier Energy Policy*. 2018; 114(1): 332-341.
5. Dias, B. Sales, D. Weingart, D. Zarur, M. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. *Elsevier Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013; 436(5):736-743.
6. Bailey, P. & Bailey, C. *Química Orgánica, Conceptos y aplicaciones*. 5ta ed. México: Prentice Hall Hispanoamérica, S.A; 1998. p. 487-489.
7. Domínguez, M. *La contaminación ambiental, un tema con compromiso social*. Scielo P+L. 2015; 10(1): Caldas.
8. Gender, K. & A, Juan. Estudio de la biodegradación de los detergentes comerciales domésticos de nuestro país. [Trabajo de titulación de Pre grado]. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. *Ingeniería Química*; 2005.
9. Gozáles, M., Barrenetxea, C., Pérez, J., Rodríguez, B. *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. España : Paraninfo; 2003.
10. ECUADOR. INSTITUTO NACIONAL ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. Procedimiento para la Toma de Muestras de Granos y Cereales; 1995.
11. Stephen, J. & Weiniger, F. *Química Orgánica* . Barcelona-España; 1988. p. 706.
12. Wade L, Jr. *Química Orgánica*. Madrid: Pearson Education, S.A; 2004. p. 1075-1077.
13. Guillot, D. & Der, P. *Agave sisalana* Perr. Ex Engelm., y sus cultivares en España. Vol. 6. España: Bouteloua; 2009. p. 72-75.
14. Meyhuay, M. *Quinua: Operaciones de Pos cosecha*. AGSI/FAO [Internet]; 2013 [Citado: 15 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/018/ar364s/ar364s.pdf>
15. Wilkinson, J. B. y Moore, R. J. *Cosmetología de Harry*. Madrid: Edigrafos, S. A; 1990. p. 941.
16. Geankopolis, C. J. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. México : Contiental, S.A ; 1998. p. 66 ; p. 161.
17. Warren L, McCabe, Smith, Julian C y Harrion , Peter. *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. España : McGraw-Hill; 1991. p. 242 ; p. 890.
18. Lucid Software Inc. (2018). *Lucidchart-flowchart maker*. [Internet]; 2018. [Citado: 25 octubre 2017] Disponible en: <https://www.lucidchart.com/>.
19. ECUADOR. INSTITUTO NACIONAL ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (1982). *Requisitos que debe Cumplir el Detergente Líquido Destinado al Uso Doméstico Manual de Limpieza y puesta a punto de pisos y zonas comunes en alojamientos*. Málaga : Vértice; 2009.
20. Ocon, J. & Tojo, G.. *Problemas de Ingeniería Química Operaciones Básicas Tomo I*. Madrid: Aguilar; 1963. p. 280.
21. Dassault Systemes SolidWorks Corporation. *SolidWorks-Herramientas*. [Internet] 2018. [Citado: 25 octubre 2017] Disponible en: <http://www.solidworks.es/sw/3d-cad-design-software.htm>
22. Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Rodríguez, D., Lomas, L., y Monar, C. *Manual Agrícola de Granos Andinos Chocho, Quinua, Amaranto y Ataco*. Vol. 1. 3a ed. Ecuador: INIAP; 2012. p. 2-8.



# HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON $\beta$ -galactosidasa DE *Kluyveromyces lactis* PARA LA OBTENCIÓN DE JARABE DE LACTOSUERO

## Enzymatic hydrolysis with $\beta$ -galactosidase de *kluyveromyces lactis* for the obtaining lactosuero syrup

<sup>1</sup>Mabel Parada Rivera\*, <sup>1</sup>Zoila Tapia González, <sup>1</sup>Evelyn Llerena Toledo, <sup>1,2</sup>Francisco Carreras García, <sup>3</sup>Paúl Manobanda Pinto

<sup>1</sup>Docente Investigador, Carrera de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo – ESPOCH. Riobamba, Ecuador.

<sup>2</sup>Escuela Básica, Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes – ULA. Mérida, Venezuela

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias de la Tierra, Carrera de Agroindustria, Universidad Estatal Amazónica – UEA. Puyo (Ecuador).

\*mparada@epoch.edu.ec

### R esumen

La presente investigación tuvo como objetivo principal la obtención de jarabe de suero a partir de residuos lácteos, para provechar todos los nutrientes presentes en este subproducto lácteo y reducir al máximo los impactos generados al ambiente. El jarabe de suero se obtuvo a través de una reacción de hidrólisis con la enzima:  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y la adición de insumos y aditivos, 1 h a 40 °C y 6,4 de pH con agitación constante. El lactosuero cumplió desde el punto de vista fisicoquímico y bacteriológico para ser utilizado como materia prima en la producción del jarabe de suero y tuvo aceptación en una muestra de consumidores. El proceso a nivel de laboratorio logró validarse a escala piloto, obteniéndose resultados similares en ambos casos, los parámetros a controlar fueron: temperatura, agitación, cantidad y calidad del sustrato y de la enzima, pH y tiempo de reacción. Las propiedades del jarabe obtenido muestran ciertas variaciones con respecto al comercializado en Ecuador, lo cual puede ajustarse concentrando el producto final. Se realizaron balances de masa y energía para el diseño de la marmita. Se debe garantizar que la materia prima, insumos y aditivos se encuentren en óptima calidad y verificar las características de la enzima utilizada en caso de que sea sustituida para establecer los nuevos parámetros de reacción (tiempo de reacción, pH y temperatura).

**Palabras claves:** Lactosuero, Enzima B-Galactosidasa, Hidrólisis del suero, Jarabe de suero.

### A bstract

The main objective of the present research was obtaining serum syrup from dairy waste, to take advantage of all the nutrients present in this dairy byproduct, which gives aggregate value to this substance and, in turn, reduce the impacts generated to the environment as much as possible. Serum syrup was obtained through a hydrolysis reaction with the enzyme:  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and the addition of inputs and laboratory scale additives and then, it was validated on a pilot scale in a 10-liter capacity pot. The reaction conditions were 1 hour at 40 °C and pH 6.4 with constant stirring. The whey complied from the physicochemical and bacteriological point of view to be used as raw material in the production of the serum syrup and it had acceptance in a sample of consumers. The laboratory-level process could be validated on a pilot scale, obtaining similar results in both cases, the parameters to be controlled were temperature, agitation, substrate and enzyme amount and quality, pH and reaction time. The properties of the obtained syrup show certain variations with respect to the one commercialized in Ecuador, which can be adjusted by

concentrating the final product. Mass and energy balances were made for the design of the kettle. It should be ensured that the raw material, inputs and additives are in optimum quality and verify the characteristics of the enzyme used in case it is substituted for establishing the new reaction parameters (reaction time, pH and temperature).

**Key words:** Enzyme B-Galactosidase, Serum Hydrolysis, Serum Syrup, Whey

**Fecha de recepción:** 03-10-2018

**Fecha de aceptación:** 30-01-2019

## I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, el consumo de quesos aumentó aproximadamente el doble entre los años 2006 y 2015. Esta tendencia, conlleva a una mayor generación de residuos, específicamente el lactosuero, por lo que deben gestionarse alternativas para aprovechar este material y evitar su impacto negativo en el medio ambiente, incluso obtener beneficios económicos al comercializar nuevos productos.

Debido a la gran cantidad de residuo lácteo que se produce durante elaboración del queso, se plantea como alternativa la obtención de jarabe de lactosuero a partir de una reacción de hidrólisis con la enzima:  $\beta$ -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

El jarabe de suero posee un poder edulcorante considerable, puede ser sustituto parcial de sólidos de leche. Por otra parte, este sería un producto de fácil accesibilidad, económico y amigable con el medio ambiente, lo que seguro generará que tenga gran aceptación dentro de la industria y el mercado.

Para la producción del jarabe, las variables fundamentales para el adecuado control del proceso son: la temperatura, el pH, el tiempo de reacción, la calidad y cantidad de sustrato y la enzima.

La temperatura porque en general los procesos enzimáticos son a temperatura constante (isotérmicos). Esto se debe a que la energía de reacción no es un parámetro de importancia en este tipo de procesos (1). A pesar de ello, la temperatura que se elija si originará mejores o peores rendimientos de reacción.

El tiempo de reacción ya que la cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima (2). Estas reacciones en muchos casos ocurren en reactores discontinuos y la enzima se adiciona para que actúe durante un tiempo determinado (1). Por lo que el tiempo es una variable importante de este proceso de hidrolizado. Cuando debe obtenerse un alto grado de hidrólisis en un corto período de tiempo, se recomienda una temperatura de reacción de 30-45°C (1).

El pH, al igual que la temperatura definirá el grado de actividad de la enzima y, por consiguiente, el rendimiento de la reacción. Como se comentó en el caso de la temperatura, la ficha técnica establece el rango de pH idóneo para llevar a cabo la reacción. Valores de pH entre 5,8 y 7,5 garantizan una actividad relativa superior al 60%. pH por debajo de 5,5 originan una actividad casi nula de la enzima y por encima de 7,5 va disminuyendo, hasta alcanzar un valor mínimo (10% de actividad) en 8,5. Otros autores (3) encontraron la mayor actividad enzimática en un pH de 6,2.

En la calidad y cantidad de sustrato, las levaduras del género *Kluyveromyces*, poseen un sistema lactosa-permeasa. En esta investigación la concentración de lactosa en el lactosuero fue de 4,1%, lo cual resulta un valor cercano a los hallazgos de Araujo (4) por lo que esta variable no fue modificada para llevar a cabo la reacción de hidrólisis.

Las enzimas son proteínas con acción catalítica sobre determinados compuestos llamados sustratos (1). También conocidas como lactasas o más formalmente como 3-D-galactosido galactohidrolasas, las  $\beta$ -galactosidasas se encuentran en el intestino de los mamíferos jóvenes y también en ciertos microorganismos. Su sustrato natural es la lactosa y son enzimas capaces de hidrolizarla e incluso, en ciertas condiciones, de cambiar la glucosa de este azúcar por otro grupo aglicón presente en el medio, en una reacción conocida como transgalactosidación (1). Esta enzima es la responsable de la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa teniendo este último más poder

edulcorante que la lactosa, por lo que ha sido escogida en este estudio con el fin de obtener glucosa a partir del lactosuero. En este estudio se escogió la  $\beta$ -galactosidasa obtenida a partir de la levadura *Kluyveromyces lactis* debido a su alta actividad enzimática en las condiciones iniciales del lactosuero y por su relación rendimiento/costo.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realiza la toma de muestra (lactosuero) de acuerdo con lo establecido en la Norma NTE INEN 0004 (1984): Para muestreo de leche y productos lácteos, previo al inicio de los ensayos de laboratorio, se llevó a cabo la caracterización del lactosuero según la Norma NTE INEN 2594:201, para determinar los parámetros: porcentajes de lactosa, proteína, grasa y ceniza, que permiten catalogarlo como suero de leche dulce o suero de leche ácido.

La selección de la materia prima es una fase fundamental para llevar a cabo una exitosa transformación del lactosuero en jarabe de suero. Es necesario destacar para la producción de este producto, que los parámetros más importantes a verificar son el pH y la caracterización microbiológica.

En el caso de la enzima utilizada en este trabajo ( $\beta$ -galactosidasa) la relación entre la temperatura, dosis de enzima, tiempo y rendimiento de la reacción. Se observa que la temperatura más recomendable es 40°C, ya que se obtiene un alto rendimiento en menor tiempo.

La temperatura también juega un factor fundamental para el proceso de inactivación de la enzima, lo que detiene la reacción de hidrólisis. En este caso, cuando ha transcurrido el tiempo de reacción, la temperatura se disminuyó a 20°C y en ese momento puede considerarse que la reacción de hidrolización ha finalizado.

La temperatura de reacción se estableció en 40°C por lo que, en función de los datos suministrados por la ficha técnica de la enzima, la reacción pudiera transcurrir en 1 ó 4 horas en función de la dosis de la  $\beta$ -galactosidasa.

En esta investigación la concentración de lactosa en el lactosuero fue de 4,1%, lo cual resulta un valor cercano a los hallazgos de Araujo (4) por lo que esta variable no fue modificada para llevar a cabo la reacción de hidrólisis.

Se realizó un test de discriminación de tres formulaciones diferentes de gran aceptación a nivel comercial (frutilla, chocolate y natural) generadas a partir del jarabe de suero como materia prima principal. Este tipo de estudios resulta muy importante para establecer si existen diferencias entre los diferentes productos, lo que permite tomar decisiones a nivel industrial para su producción y comercialización. Como su nombre lo indica, se utilizan

los sentidos para que un conjunto de personas evalúe y comparen los tres productos elaborados.

Para el análisis sensorial se aplicó una encuesta donde se evaluaron tres criterios: color consistencia y sabor (con tres alternativas de respuesta: me gusta, ni me gusta ni me disgusta y no me gusta), y la persona encuestada indicó cual jarabe le gustó más en una muestra representativa de la población.

En este sentido, los jarabes fueron denotados con la numeración 5770 (sabor chocolate), 3649 (sin saborizante) y 4853 (sabor frutilla).

La muestra representativa fue calculada con la siguiente ecuación matemática (5):

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{e^2 * (N - 1) + Z^2 * p * q} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

n = Tamaño muestral.

N = Tamaño de la población, N = 30000.

Z = Valor correspondiente a la distribución de Gauss,  $Z\alpha = 1.96$ .

p = Prevalencia esperada del parámetro a evaluar, p = 0.5.

q = 1 - p.

e = Error que se prevé cometer, e = 5%.

Sustituyendo los valores en la ecuación 1, se tiene que el tamaño muestral es de:

$$n = \frac{(1.96)^2 * 0.5 * 0.5 * 30000}{(0.05)^2 * (30000 - 1) + (1.96)^2 * 0.5 * 0.5} = 380$$

Se aplicó la encuesta al número de personas del tamaño muestral y se tabularon y analizaron los resultados obtenidos desde el punto de vista estadístico con la prueba chi cuadrado, y así verificar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los productos elaborados en las tres características en estudio: color, sabor y consistencia.

## III. RESULTADOS

En función del resultado de acidez, el

lactosuero se considera ácido, pero en cuanto al pH puede considerarse del tipo dulce. El análisis de glucosa del lactosuero

permite realizar la comparación de este parámetro con el valor resultante luego de la hidrólisis, y de esa manera, verificar el rendimiento de la reacción. Tabla 1

Parámetro	Unidad	Método Analítico		Valor de la Muestra	Norma NTE INEN 2594			
		Norma	Referencia		Suero de leche dulce		Suero de leche ácido	
					Min	Max	Min	Max
Lactosa	%	AOAC 984.15	(AOAC International, 2016)	4.1	---	5.0	---	4.3
Proteína	%	NTE INEN 16	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2015)	0.87	0.8	---	0.8	---
Grasa	%	NTE INEN 12	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2013)	0.28	---	0.3	---	0.3
Ceniza	%	NTE INEN 14	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 1984)	0.55	---	0.7	---	0.7
Acidez	%	NTE INEN 13	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 1984)	0.421	---	0.16	0.35	---
pH	Unidad	AOAC 973.41	(AOAC International, 2016)	6.4	6.8	6.4	5.5	4.8
Glucosa	Mg/dL	-----	(Wiener, 2000)	50	---	---	---	---

Tabla 1. Resultados de la caracterización fisicoquímica del lactosuero.

Fuente: Llerena (2017).

Los valores de los análisis microbiológicos (Tabla 2), muestran que todos los resultados están en correspondencia a la norma. Después de verificar que la materia prima seleccionada cumple con los valores apropiados, se realizaron ensayos en el laboratorio en función de la

metodología prevista con el fin de ajustar el procedimiento metodológico. La producción del jarabe se realizó con ocho ensayos a nivel experimental (laboratorio) en un volumen de 1 litro y a escala piloto, donde se procesaron 10 L de lactosuero.

Ambos procesos se compararon con el fin de lograr la validación del procedimiento.

Parámetro	Unidad	Método Analítico		Valor	Norma NTE INEN 2594	
		Norma	Referencia		Suero de leche	
					Min	Max
Recuento de m.o. aerobios mesófilos totales	UFC/g	NTE INEN 1529-5	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2006)	$97 \times 10^3$	$30 \times 10^3$	$10 \times 10^4$
Recuento de Escherichia coli	UFC/g	NTE INEN 1529-8	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2015)	8	<10	----
Staphylococcus aureus	UFC/g	NTE INEN 1529-14	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2013)	75	<100	100
Salmonella/ 25g	Ausencia/ Presencia	NTE INEN 1529-15	(Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1996)	Ausencia	----	----
Detección de Listeria monocytogenes / 25g	Ausencia/ Presencia	NTE INEN ISO 11290-1	(Servicio Ecuatoriano de Normalización, 1996)	Ausencia	----	----

Tabla 2. Resultados de la caracterización microbiológica del lactosuero.

Fuente: Llerena (2017).

Otro estudio (6) donde estudiaron la composición de 25 jarabes comerciales, recomienda un mínimo de sólidos totales de 62,5% y obtuvieron valores de glucosa altamente variable (entre no detectable hasta 27,2% dependiendo de la formulación del producto) en el caso de estos dos parámetros, los valores obtenidos en la presente investigación se encuentran dentro de los rangos sugeridos, los sólidos totales 71,9% y la concentración promedio de

glucosa fue de 4,75%. Gerena reporta un valor promedio de glucosa a partir de hidrólisis enzimática de 8,83 g/L (7), en este estudio la concentración obtenida fue de 4,87 g/L, lo que sugiere la necesidad de aumentar el rendimiento de la reacción o realizar un proceso de concentración del producto final.

Ensayo	Método	Unidad	Resultado	
Azúcares totales	INEN 266:2012 (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012)	%	6,20	
Glucosa (laboratorio) (densidad: 1.025) (pH: 5)	----	mg/dL	480	487,33
			484	
			498	

Tabla 3. Resultados de la caracterización luego de la hidrólisis del lactosuero en el laboratorio.

Fuente: Llerena (2017).

Al comparar los niveles de glucosa del reactivo de partida con respecto al producto de la hidrólisis, se observa que el valor inicial de este parámetro es de 50 mg/dL (Tabla 1) y se obtiene un valor final promedio de 487,3 mg/dL (Tabla 3), lo que representa un incremento de casi nueve veces en función de la cantidad inicial.

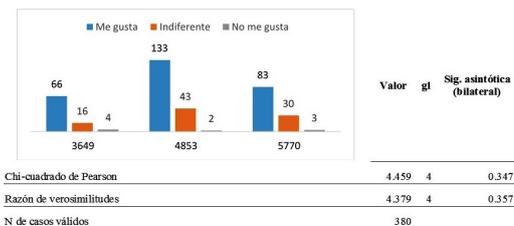
A partir del estudio de discriminación de las tres formulaciones de producto (frutilla, chocolate y natural) y al aplicar el estadístico chi cuadrado, se puede concluir con un 95% de confianza que no se encuentran diferencias significativas en las preferencias del jarabe en relación con el color, consistencia y sabor, por lo que se puede fabricar indistintamente cualquiera de los tres productos y tendrán una aceptación similar entre los consumidores. (Fig 1,2,3)



Chi-cuadrado de Pearson	6.655	4	0.155
Razón de verosimilitudes	6.556	4	0.161
N de casos válidos	380		

Fig. 1. Análisis sensorial Prueba de chi cuadrado para el parámetro COLOR.

Fuente: Llerena (2017).



Chi-cuadrado de Pearson	4.459	4	0.347
Razón de verosimilitudes	4.379	4	0.357
N de casos válidos	380		

Fig. 2. Análisis sensorial Prueba de chi cuadrado para el parámetro CONSISTENCIA.

Fuente: Llerena (2017).



Chi-cuadrado de Pearson	6.040	4	0.196
Razón de verosimilitudes	6.412	4	0.170
N de casos válidos	380		

Fig. 3. Análisis sensorial Prueba de chi cuadrado para el parámetro SABOR.

Fuente: Llerena (2017).

Es necesario destacar que no existe una norma INEN que establezca los parámetros a cumplir para este producto, a pesar de ello se ha comparado con algunos parámetros fisicoquímicos de jarabe de glucosa importado al Ecuador (8) ya que este producto no es elaborado en el país (9).

Ensayo	Método	Unidad	Resultado
Cenizas	AOAC 920.181 Ed 20, 2016*	%	1,24
Proteína	AOAC 962.18 Ed 20, 2016*	% (Nx6,25)	2,89
Sólidos totales	AOAC 925.45 Ed 20, 2016*	%	71,9
Fibra dietética total	AOAC 985.29 Ed 20, 2016*	%	0,498
Carbohidratos totales	Cálculo	%	62,6
Energía	Cálculo	kJ/100 g	1272
		Kcal / 100g	304
Grasa	PE08-5.4-FQ AOAC Ed 20, 2016*	%	4,66
pH	AOAC 942.15 Ed 20, 2016*	Unidades de pH	6,54
Acidez	AOAC 942.15 Ed 20, 2016*	mg/100g Ácido cítrico	0,147
Densidad relativa	INEN 391. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012)	Adimensional	2,275
Sólidos solubles	AOAC 932.12 / INEN 380*	°Bx	68
Sólidos insolubles	INEN 1635. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1989)	%	5,70
Coliformes totales	INEN 1529-7. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2013)	UFC/ml	Ausencia
Coliformes fecales	INEN 1529-8. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2015)	UFC/ml	Ausencia

Tabla 4. Resultados de caracterización del jarabe de suero

Fuente: \* (AOAC International, 2016)

Y de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 4) se sugiere un proceso de concentrado del suero hidrolizado para ajustar estos parámetros, previo a la etapa de formulación del jarabe, y de esta manera, se garantiza un producto final con especificaciones similares a las comerciales

#### IV. CONCLUSIONES

A partir de la caracterización física, química y microbiológica de este subproducto, se determinó que el mismo presenta algunos parámetros que lo catalogan como suero de leche ácido y otras propiedades que se asemejan al suero de leche dulce. En todos los casos los parámetros cumplen con lo establecido en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2594: 2011 desde el punto de vista físico, químico y microbiológico, y su pH (6.4) y contenido de lactosa fue adecuado para llevar a cabo la reacción de hidrólisis, con una actividad relativa de la enzima de un 90%, por lo tanto, el lactosuero se consideró apto para la producción de jarabe de suero.

Con el fin de producir jarabe de suero, el parámetro más importante para verificar fue el pH, ya que es un factor de gran importancia para la actividad y acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sobre el sustrato. El lactosuero presentó un pH de 6,4 valor que origina una actividad relativa de la enzima muy favorable (90%), por lo que se considera que dicho lactosuero es apto para la fabricación del jarabe de suero.

Las condiciones establecidas para el proceso de validación durante la hidrólisis fueron: tiempo de reacción (1 h), temperatura de la reacción de hidrólisis (40 °C), pH (alrededor de 6), cantidad de lactosuero y cantidad de enzima dependiendo del tipo de proceso (experimental o piloto).

Al comparar la concentración de glucosa obtenida en la fase experimental y a nivel piloto se observa que ambos procesos generan valores similares de este parámetro, por lo que el procedimiento ha sido validado en función a este parámetro, altos valores de glucosa al final de la reacción demuestran una alta conversión de reacción, es decir, la lactosa fue descompuesta en glucosa y galactosa, siendo la glucosa el producto de interés.

Se realizó una encuesta con el fin de conocer las preferencias en cuanto a color, consistencia y sabor del jarabe en una muestra representativa de la población. Para las tres propiedades a través de la prueba Chi cuadrado, a un 95% de confianza, se verifica que no existen diferencias significativas en las preferencias de las personas.

## Referencias

1. Ladero, M. Hidrólisis de Lactosa con B-Galactosidasas de *Kluyveromyces fragilis* y de *Escherichia coli*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 1999.
2. Sosa, M. & Galvis, P. Caracterización de la enzima glucosa oxidasa (GOX) (E.C.1.1.3.4) libre e inmovilizada en dos soportes (alginato de sodio y agarosa) para la producción de ácido glucónico. Bogotá: UNAD, 2010.
3. Ramirez, A. & Rivas, N. Producción y caracterización parcial de b -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteínizado. ALAN, 2003.
4. Araujo, K. Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y la producción de b-D-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23). Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia, 2007, pp. 64-73.
5. Bolaños, E. Muestra y Muestreo. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2012.
6. Rivera, M., Herrera, C. & Barquero, M. Caracterización fisicoquímica de los siropes comerciales preparados a base de sacarosa. Tecnología en Marcha, 2000. pp. 48-54.
7. Gerena, F. Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis* l var valencia) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos. Duitama: UNAD, 2013.
8. Proaño, a. & Serrano, J. producción de jarabe de glucosa. guayaquil: espol, 2015.[citado 17 febrero 2017].
9. Donoso, J. Utilización de almidón de banano (*Musa cavendish*) para la elaboración de jarabe de glucosa. Quito: Universidad San Francisco de Quito, 2014.
10. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016. Rockville: AOAC.
11. Hernández-Rojas, M. & Vélez-Ruiz, J. Suero de Leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Temas selectos de Ingeniería de alimentos , 2014, pp. 13-22.
12. Instituto Ecuatoriano de Normalización. leche y productos lácteos. determinación de contenido de nitrógeno. método kjeldahl. quito: instituto ecuatoriano de normalización, 2015.
13. Periago, M. Leche y Productos Lácteos. [Internet] 2014 [citado 14 febrero 2017]. Disponible en: [www.um.es/aulasenor/saavedrafajardo/apuntes/doc/productos-lacteos.ppt](http://www.um.es/aulasenor/saavedrafajardo/apuntes/doc/productos-lacteos.ppt)
14. Servicio Ecuatoriano de Normalización. leche. determinación de las proteínas. quito: servicio ecuatoriano de normalización, 2015.
15. Souza, R., Gimenes, M., Costa, S. & Müller, C. Eliminación de grasas del suero de queso para obtener proteínas y lactosa. Información Tecnológica, 19(2), 2008. pp. 41-50.
16. SV, M. Procesos de Manufactura. [Internet] 2011. Disponible en: <https://manuii.wordpress.com/category/visita-tecnica/>
17. Universidad Nacional Autónoma De México. Productos Lácteos. [Internet] 2015 [citado 13 febrero 2017]. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Composicionlecheygrasa\\_1694.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Composicionlecheygrasa_1694.pdf)

# Perfiles

