

**APROVECHAMIENTO DE *Oxalis tuberosa* "Oca" PARA LA OBTENCIÓN DE  
BIOETANOL, COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE CULTIVOS ILÍCITOS  
EN CLIMA FRÍO**

**ADRIANA LÓPEZ GÓMEZ**



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2014**

**APROVECHAMIENTO DE *Oxalis tuberosa* "Oca" PARA LA OBTENCIÓN DE  
BIOETANOL, COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE CULTIVOS ILÍCITOS  
EN CLIMA FRÍO**

**ADRIANA LÓPEZ GÓMEZ**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial  
Para optar el título de Química**

**Directora: M.Sc. ISABEL BRAVO REALPE**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2014**

**Nota de Aceptación:**

---

---

---

---

**Director Isabel del Socorro Bravo Realpe  
M.Sc.**

---

**Jurado Edier Humberto Pérez  
Ph.D.**

---

**Jurado René Zúñiga Rengifo  
M.Sc.**

**Popayán, 4 de Septiembre de 2014**

## DEDICATORIA

*A mi madre Julia Edith, a quien le debo lo que soy, quien siempre creyó en mí, que nunca me retiró su apoyo, por su confianza, paciencia y sobre todo su amor*  
*A mi padre Luis Eduardo, por ser parte importante de mi vida, su ausencia inesperada me hizo fuerte*  
*A mi familia gracias por su apoyo incondicional y estímulo para poder continuar mis estudios*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mis pasos en todos los momentos que determinaron recorrer por este camino que en este momento veo cumplido.

A mi directora de tesis M.Sc. Isabel Bravo Realpe, por el apoyo brindado durante todo el trabajo de grado, por los conocimientos invaluable que supo transmitirme para poder concretar este trabajo, por su dedicación y paciencia.

Al Ph.D. Edier Humberto Pérez y al M.Sc. René Zúñiga Rengifo, por su recepción, colaboración y sus valiosos aportes con criterio científico en la evaluación de este trabajo de investigación.

A mis profesores, por compartir y transmitir sus conocimientos, por guiarme durante mi formación académica y profesional.

A mis compañeros del grupo de investigación de Agroquímica de la Universidad del Cauca: Camilo, Claudia, Cristian, Diana Marcela, Ghissel, Raúl y Yaneth, por su ayuda y colaboración.

A Oscar Lucero, quien suministró las muestras de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" para la realización de los ensayos.

A todos mis familiares, en especial a: Julia Edith, Luis Eduardo, Lucila, María Ximena, Lucy, Arturo, Azmir, Javier, Julián y Valentina, por ser parte importante en el logro de mis metas profesionales.

A mis amigos y compañeros, en especial a: Marcela, Carolina, Hernán y Sergio, por su apoyo.

A todas aquellas personas que de manera directa o indirecta estuvieron involucradas en el desarrollo de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	16
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	18
<b>2.1 OBJETIVO GENERAL</b>	18
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	18
<b>3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	19
<b>3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”</b>	19
3.1.1 Condiciones de cultivo, siembra y cosecha	21
3.1.2 Cultivo de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca” en Colombia	22
<b>3.2 ALMIDÓN</b>	22
3.2.1 Características generales	22
3.2.2 Almidón de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	24
<b>3.3 HIDRÓLISIS</b>	24
3.3.1 Hidrólisis enzimática	25
3.3.2 Hidrólisis ácida	25
3.3.3 Azúcares reductores	26
<b>3.4 FERMENTACIÓN</b>	26
3.4.1 Fermentación alcohólica	27

3.4.2	Levadura	28
3.4.3	Destilación	29
<b>3.5</b>	<b>BIOETANOL</b>	<b>30</b>
3.5.1	Obtención de etanol a partir de almidón	31
3.5.2	Usos del Bioetanol	32
3.5.3	Métodos de análisis para determinación de etanol	33
3.5.3.1	Prueba cualitativa con nitrato cérico amoniacal	33
3.5.3.2	Cromatografía de gases	33
<b>3.6</b>	<b><i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca” COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE CULTIVOS ILÍCITOS EN CLIMA FRIO</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>OBTENCIÓN DE MUESTRAS</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”</b>	<b>36</b>
4.2.1	Humedad	36
4.2.2	Cenizas	37
4.2.3	pH	37
4.2.4	Proteína	37
4.2.5	Extracto etéreo o grasa bruta	38
4.2.6	Fibra bruta y extracto no nitrogenado	39
4.2.7	Carbohidratos	39
4.2.8	Grados Brix	40
<b>4.3</b>	<b>ELABORACIÓN DE ALMIDÓN</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN</b>	<b>41</b>

<b>4.5</b>	<b>DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES</b>	<b>41</b>
4.5.1	Implementación del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	42
4.5.2	Método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	42
<b>4.6</b>	<b>OBTENCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE PROCESO DE FERMENTACIÓN</b>	<b>43</b>
<b>4.7</b>	<b>DETERMINACIÓN DE ETANOL</b>	<b>44</b>
4.7.1	Prueba con nitrato cérico amoniacal	44
4.7.2	Determinación de alcoholes por cromatografía de gases	44
4.7.2.1	Condiciones de referencia para realizar la cromatografía de gases	44
4.7.2.2	Análisis cromatográfico	44
<b>4.8</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE <i>Oxalis tuberosa</i> Molina "Oca"</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>OBTENCIÓN DE ALMIDÓN</b>	<b>50</b>
<b>5.3</b>	<b>HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN</b>	<b>51</b>
<b>5.4</b>	<b>DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES</b>	<b>57</b>
5.4.1	Implementación y estandarización del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	57
5.4.1.1	Linealidad instrumental del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	57
5.4.1.2	Precisión instrumental del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	61
5.4.1.3	Limites Críticos del método espectrofotométrico del DNS para	62



determinación de azúcares reductores por UV-Vis	
5.4.1.4 Validación del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	63
5.4.2 Determinación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis del almidón por el método espectrofotométrico del DNS por UV-VIS	65
<b>5.5 DETERMINACIÓN DE ETANOL</b>	<b>71</b>
5.5.1 Prueba con nitrato cérico amoniacal	72
5.5.2 Determinación de etanol por cromatografía de gases	73
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>89</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Taxonomía y morfología de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	20
<b>Tabla 2.</b> Composición nutricional de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	20
<b>Tabla 3.</b> Propiedades físicas y químicas del etanol	30
<b>Tabla 4.</b> Análisis proximal de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	46
<b>Tabla 5.</b> ANOVA de análisis proximal de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	48
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Tukey para pH en el análisis proximal de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	48
<b>Tabla 7.</b> Correlación de Pearson de análisis proximal de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	49
<b>Tabla 8.</b> Caracterización del almidón de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	50
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de almidón no hidrolizado	52
<b>Tabla 10.</b> Prueba de Kruskal Wallis de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la concentración de HCl	54
<b>Tabla 11.</b> Prueba U de Mann-Whitney de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la concentración de HCl	54
<b>Tabla 12.</b> ANOVA de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la temperatura	54
<b>Tabla 13.</b> Prueba Tukey de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la temperatura	55
<b>Tabla 14.</b> Prueba de Kruskal Wallis de porcentaje de almidón no hidrolizado en función del tiempo	55
<b>Tabla 15.</b> Prueba U de Mann-Whitney de porcentaje de almidón no hidrolizado en función del tiempo	56
<b>Tabla 16.</b> Correlación de Pearson de porcentaje de almidón no hidrolizado	57
<b>Tabla 17.</b> Evaluación de la linealidad instrumental del método para	58

absorbancia de D-Glucosa

<b>Tabla 18.</b>	ANOVA para absorbancia de D-Glucosa en función del día	58
<b>Tabla 19.</b>	ANOVA para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración	59
<b>Tabla 20.</b>	Prueba de Tukey para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración	59
<b>Tabla 21.</b>	Evaluación de la linealidad instrumental del método para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración	60
<b>Tabla 22.</b>	Correlación de Pearson para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración	60
<b>Tabla 23.</b>	Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración	61
<b>Tabla 24.</b>	ANOVA de absorbancia en función de la concentración de Glucosa	61
<b>Tabla 25.</b>	Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia para determinación de azúcares reductores	62
<b>Tabla 26.</b>	Curvas de calibración bajo condiciones de repetibilidad para determinación de azúcares reductores	62
<b>Tabla 27.</b>	Cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para determinación de azúcares reductores	63
<b>Tabla 28.</b>	Porcentajes de Recuperación de concentración de D-Glucosa en términos de Precisión Intermedia	64
<b>Tabla 29.</b>	ANOVA para porcentaje de recuperación en función del nivel de concentración de D-Glucosa	64
<b>Tabla 30.</b>	Prueba de Tukey para porcentaje de recuperación en función del nivel de concentración de D-Glucosa	64
<b>Tabla 31.</b>	ANOVA para porcentaje de recuperación en función del día de evaluación	65
<b>Tabla 32.</b>	Prueba de Tukey para porcentaje de recuperación en función del día de evaluación	65
<b>Tabla 33.</b>	Exactitud y precisión para la metodología global en la	65

determinación de azúcares reductores

<b>Tabla 34.</b>	Azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de concentración de ácido, temperatura y tiempo de hidrólisis	66
<b>Tabla 35.</b>	Prueba de Kruskal Wallis de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la concentración de HCl	68
<b>Tabla 36.</b>	Prueba U de Mann-Whitney de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la concentración de HCl	68
<b>Tabla 37.</b>	Prueba de Kruskal Wallis de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la temperatura	68
<b>Tabla 38.</b>	Prueba U de Mann-Whitney para azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la temperatura	69
<b>Tabla 39.</b>	Prueba de Kruskal Wallis para azúcares reductores de almidón hidrolizado en función del tiempo	69
<b>Tabla 40.</b>	Prueba U de Mann-Whitney para azúcares reductores de almidón hidrolizado en función del tiempo de hidrólisis	70
<b>Tabla 41.</b>	Correlación de Pearson para azúcares reductores de almidón hidrolizado por método espectrofotométrico del DNS por UV-Vis	70
<b>Tabla 42.</b>	Resultados de determinación de etanol por CG-FID	73
<b>Tabla 43.</b>	ANOVA de etanol (%v/v) en función de la concentración de almidón hidrolizado	77
<b>Tabla 44.</b>	Prueba de Tukey para etanol (%v/v) en función de la concentración de almidón hidrolizado	77
<b>Tabla 45.</b>	ANOVA del etanol (%v/v) en función de la temperatura	78
<b>Tabla 46.</b>	Prueba de medias de etanol (%v/v) en función de la temperatura	78
<b>Tabla 47.</b>	ANOVA de etanol (%v/v) en función del tiempo	79
<b>Tabla 48.</b>	Prueba de Tukey para etanol (%v/v) en función del tiempo	79
<b>Tabla 49.</b>	ANOVA de etanol (%v/v) en función del pH	79
<b>Tabla 50.</b>	Prueba de medias de etanol (%v/v) en función del pH	79
<b>Tabla 51.</b>	Correlación de Pearson del porcentaje de etanol (%v/v)	80

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Tubérculo de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	19
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular del almidón	23
<b>Figura 3.</b> Rutas catabólicas del piruvato producido durante la glucólisis	27
<b>Figura 4.</b> Esquema del proceso fermentativo	28
<b>Figura 5.</b> Rutas tecnológicas para la producción de bioetanol	31
<b>Figura 6.</b> Cultivo de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	36
<b>Figura 7.</b> Proceso de extracción de almidón de <i>Oxalis tuberosa</i> Molina “Oca”	40
<b>Figura 8.</b> Proceso de fermentación y obtención de bioetanol	43
<b>Figura 9.</b> Curvas de hidrólisis ácida de almidón de Oca en función del porcentaje de almidón no hidrolizado, temperatura y tiempo	53
<b>Figura 10.</b> Curva de calibración de D-Glucosa bajo condiciones de precisión intermedia para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	60
<b>Figura 11.</b> Curva de calibración de D-Glucosa bajo condiciones de repetibilidad para determinación de azúcares reductores por UV-Vis	63
<b>Figura 12.</b> Curvas de Azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de temperatura y tiempo de hidrólisis	67
<b>Figura 13.</b> Resultados de la prueba cualitativa con nitrato cérico amoniacal	72
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas de etanol y n-butanol como patrón interno por CG-FID	74
<b>Figura 15.</b> Etanol (%v/v) en función de temperatura y pH	75
<b>Figura 16.</b> Eficiencia en la fermentación en función de temperatura y pH	76

## ANEXOS

	<b>pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Resultados para determinación de etanol por CG-FID	89
<b>Anexo B.</b> Eficiencia global del proceso de hidrólisis y fermentación	90

## LISTA DE ACRÓNIMOS

<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>C.V.</b>	Coeficiente de variación
<b>CG-FID</b>	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
<b>gl</b>	Grados de libertad
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>R</b>	Porcentaje de recuperación
<b>Sig.</b>	Significancia

## RESUMEN

El estudio se realizó a muestras de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca", un tubérculo cultivado en el corregimiento de Paletará, municipio de Puracé, departamento del Cauca. Este es un cultivo de clima frío que resulta viable para la sustitución de cultivos ilícitos en estas zonas y para el fortalecimiento de las comunidades agrícolas, contribuyendo a la seguridad alimentaria. Se determinó el valor nutricional del tubérculo y la capacidad del almidón para producir bioetanol.

El valor nutricional de la *Oxalis tuberosa* Molina "Oca", se determinó mediante el análisis proximal de los tubérculos (humedad, proteína, cenizas, fibra, grasa, carbohidratos, pH y grados Brix) clasificándolo como un alimento considerablemente nutritivo. El contenido de almidón se determinó del 6,73%, que posteriormente se sometió a hidrólisis ácida, una muestra de almidón ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ) con variaciones de concentración de HCl (1, 2 y 3 N), tiempo (2, 4, 8, 12, 16 y 20 días) y temperatura (25, 30 y 35 °C). Se encontró para la hidrólisis en función del almidón no hidrolizado un rango de rendimiento de 2,06-12,70%, con una eficiencia de hidrólisis ácida desde 49,10 hasta 88,45%.

Se estandarizó el método espectrofotométrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por UV-Vis, para determinar el contenido de azúcares reductores libres provenientes de la hidrólisis ácida del almidón. En cada condición de hidrólisis se determinaron las concentraciones de los azúcares reductores generados después del rompimiento de los enlaces glucosídicos del almidón, encontrando un rango adecuado de 492,00 a 884,46 g de azúcares reductores por kg de almidón.

La fermentación de los azúcares reductores se realizó con *Saccharomyces cerevisiae*, bajo condiciones de concentración de almidón hidrolizado ( $25, 50$  y  $75 \text{ g L}^{-1}$ ), temperatura (25 y 30 °C), tiempo (2, 5 y 8 días) y pH (4,0 y 5,0). Posteriormente se llevó a cabo un proceso de destilación y el etanol generado se determinó por cromatografía de gases con detector FID, la cuantificación de etanol se realizó por el método de patrón interno, sin detectar metanol en estas condiciones. El contenido de etanol para los mejores resultados varía entre 10,54 y 14,56%, la eficiencia del proceso está comprendida entre 73,66 y 101,83%, dependiendo de las condiciones del proceso. La fermentación directa de  $500 \text{ g L}^{-1}$  de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca", produjo un porcentaje de etanol del 6,27% con una eficiencia global de 21,92%.

El alto contenido de carbohidratos, en forma de almidones y azúcares encontrados en el tubérculo de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca", lo convierte en un producto viable para la obtención de bioetanol, pero se requiere mayor investigación para lograr establecer un proceso fermentativo para que la obtención de bioetanol sea rentable.



## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cultivos ilícitos son un problema ambiental y social que afronta el país, principalmente el sector rural de departamentos como el Cauca, donde para su plantación devastan los ecosistemas y la biodiversidad, creando consecuencias adversas para la sociedad en general afectando la seguridad alimentaria de sus moradores. Aunque los organismos del estado han implementado diversas alternativas para evitar su siembra, aún permanecen, ocasionando daño no solamente a los productores de sustancias ilícitas sino también a los consumidores. Una de esas alternativas es incentivar la producción de bioetanol a partir de recursos renovables como la caña de azúcar, que mejora la seguridad energética y promueve el desarrollo rural, sin embargo este cultivo no es apto para regiones de clima frío, que corresponde a gran parte de las zonas del departamento del Cauca donde aún persiste la siembra de cultivos ilícitos. Por esta razón, la implementación de cultivos alternativos como plantaciones de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”, cuyos tubérculos presentan contenidos altos de almidón, sería una estrategia adecuada para la obtención de productos tales como el bioetanol, como búsqueda de nuevas formas de energías desarrolladas de fuentes renovables y limpias para el ambiente en general.

Esta propuesta procura implementar métodos científicos para obtener datos que aporten conocimientos en la producción de bioetanol a partir de productos renovables como la *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”. El proyecto propone una solución enfocada en la producción de bioetanol para la obtención de energía limpia y renovable, contribuyendo a la generación de empleo, al desarrollo rural y al bienestar de la población. Así, se promueve una alternativa de desarrollo productivo para la ocupación formal del suelo rural, dedicados anteriormente a la siembra de cultivos ilícitos, que generan un mayor impacto ambiental en los ecosistemas. La producción de bioetanol a partir de fuentes renovables, generaría opciones para el cambio de uso de suelo dedicado a la producción de cultivos ilícitos, en clima frío, incentivando el uso adecuado y sostenible de este recurso, contribuyendo a la seguridad alimentaria y a la reducción del consumo de combustibles fósiles.

En este proyecto se evalúa la capacidad de producción de bioetanol a partir del almidón procedente de los tubérculos de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” con el propósito de determinar su contribución como fuente alternativa de energía a partir de una fuente renovable y limpia, con una adecuada disposición de los desechos originados y derivados, que pueden convertirse en subproductos útiles para el sector agrícola, evitando el impacto al medio ambiente, favoreciendo así al desarrollo rural y contribuyendo a la mitigación de la contaminación ambiental, en cuyo caso se puede promover como estrategia para la sustitución de cultivos ilícitos en zonas de clima frío.

Hipótesis de trabajo: Es posible obtener bioetanol a partir del almidón proveniente de la *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”, pero dicha capacidad puede alterarse debido a las condiciones experimentales.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de producción de bioetanol de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”, cultivo de clima frío, a partir de la hidrólisis ácida del almidón obtenido mediante métodos tradicionales.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el análisis proximal del tubérculo de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”.
- Extraer el almidón a partir de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”.
- Obtener los azúcares reductores mediante la hidrólisis ácida del almidón.
- Implementar y evaluar el método espectrofotométrico (colorimétrico) para la determinación de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).
- Obtener bioetanol a partir de la fermentación de los azúcares reductores con *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

La *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”, también conocido como “Ibia” o “Huisisai” en Colombia, es un antiguo cultivo andino que constituye un recurso poco conocido y explotado que presenta grandes posibilidades principalmente para la agricultura, la alimentación y la industria agrícola. El tubérculo comestible de la Oca (Figura 1), es una fuente de energía y posee un bajo contenido de proteína y grasa, a su vez presenta una elevada proporción de sustancias importantes como almidón y ácidos orgánicos (oxalatos solubles), que permiten su uso en diversas aplicaciones industriales entre ellas la panificación y producción de alcohol a través de métodos de fermentación <sup>[1]</sup>. La presencia de concentraciones considerables de ácido oxálico en los tubérculos de la Oca, principalmente en la cascara le proporcionan un sabor ácido, este es un ácido carboxílico de fórmula  $C_2H_2O_4$ , su nombre proviene de su presencia natural en las plantas del género oxalis <sup>[2]</sup>, en forma de oxalatos solubles y como cristales. En tierras alto andinas, entre los principales cultivos de tubérculos, sólo la papa es más importante que la Oca, pero mientras que la papa se ha extendido hasta convertirse en el cuarto cultivo más grande del mundo, la Oca es poco conocido fuera de esta zona <sup>[3]</sup>.

**Figura 1.** Tubérculo de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”



Fuente: Autor

La planta de Oca, pertenece a la familia de las Oxalidaceae (tabla 1), cuyo tubérculo comestible es rico en almidón, es un cultivo anual, de plantas herbáceas de una altura entre 30 y 80 cm, cultivo andino principalmente en clima frío, excepcionalmente tolerante en climas con bajas temperaturas, por esta razón su rendimiento puede ser el doble que el de la papa <sup>[3]</sup>. La Oca se cultiva especialmente en tierras altas de Ecuador, Perú y Bolivia, pero también se encuentra en algunas partes de Chile, Argentina, Colombia y Venezuela <sup>[4]</sup>. Hace más de un siglo, la Oca fue introducida a Nueva Zelanda <sup>[5]</sup>, donde se cultiva a nivel del mar, el clima en este país es templado,

con temperaturas que van desde los 10 °C en el sur, hasta los 16 °C en el norte. Sin embargo, el cultivo de la Oca principalmente se encuentra en los Andes.

**Tabla 1.** Taxonomía y morfología de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

Clase	Dicotiledonea
Subclase	Dicotyledoneae
Orden	Geraniales
Familia	Oxalidaceae
Genero	Oxalis
Especie	Oxalis Tuberosa
Nombres Comunes	Oca, Ibia, Huisisai

Fuente: Cajamarca Ruiz, Esther Elizabeth <sup>[6]</sup>

La Oca produce tubérculos de alta variación en sus niveles nutritivos, debido principalmente a la variabilidad en formas, colores y tamaños, por lo tanto se presentan diferencias en la calidad y cantidad de metabolitos primarios (almidones, proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas, etc.) y secundarios (oxalatos, saponinas, carotenos, taninos, etc.), la mayoría tiene incluso valores nutritivos (tabla 2) tan buenos o mejores que otros tubérculos <sup>[6], [7]</sup>.

**Tabla 2.** Composición nutricional de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

Componente	Porcentaje (%)
Humedad	70-80
Carbohidratos	11-22
Grasa	1
Fibra	1
Cenizas	1
Proteína	9

Fuente: National Research Council <sup>[3]</sup>

Estos tubérculos contienen entre 70-80% de humedad, 11-22% de hidratos de carbono, cerca de 1% de grasa, 1% de fibra y 1% de cenizas. Los porcentajes de proteína varían entre las distintas variedades; tubérculos considerados ricos en proteínas contienen más del 9% sobre una base en peso seco <sup>[3]</sup>. Dado su alto porcentaje, uno de los principales componentes de los tubérculos de la Oca son los carbohidratos <sup>[4]</sup>, por lo tanto pueden tener potencial para la producción de almidón o alcohol. Además, presenta un alto contenido de ácido oxálico, los tubérculos amargos o agrios pueden contener hasta 500 mg L<sup>-1</sup>, mientras que algunos tipos de tubérculos dulces, contienen sólo 79 mg L<sup>-1</sup> de ácido oxálico <sup>[3]</sup>.

Existen alrededor de 50 variedades diferentes de Oca a lo largo de la región andina. La clasificación comprende, variables como el contenido de oxalato, clasificando así los tubérculos de Oca con mayor o menor acidez, el sabor amargo, clasificando como Ocas dulces o amargas. Según la forma se pueden clasificar principalmente como

ovoide, claviforme y cilíndrica, generalmente de tamaño pequeño <sup>[8]</sup>. A su vez también se puede clasificar la Oca en tres variedades hortícolas.

- **Forma alba:** tubérculos blancos o hialinos.
- **Forma flava:** tubérculos amarillo claro o pigmentados posiblemente de flavonas y amarillo intenso o naranjado con caroteno.
- **Forma roseo-violácea:** tubérculos con coloración desde rosa claro hasta el violáceo muy oscuro, casi negro (rojas, magentas y púrpuras).

La Oca se puede utilizar de muchas maneras. En la región de los Andes, dependiendo de la variedad los tubérculos pueden ser consumidos crudos. Sin embargo, la mayoría, se consumen siendo añadidos a los guisos y sopas, cocidos al vapor o al horno. En la región Andina, los tubérculos se colocan a menudo en el sol durante unos días, convirtiéndose en tubérculos dulces, este proceso es conocido como proceso de endulzado que se lleva a cabo con la exposición al sol durante aproximadamente doce días, para disminuir el contenido de ácido oxálico y aumentar la cantidad de glucosa casi al doble. Las variedades amargas casi siempre se convierten en productos secos, durante el cual la amargura desaparece para dejar el producto insípido, que pueden almacenarse sin refrigeración <sup>[3]</sup>.

### 3.1.1 Condiciones de cultivo, siembra y cosecha

El cultivo de Oca parece indiferente en cuanto al tipo de suelo y pueden tolerar suelos ácidos a pH entre 5,3 y 7,8 <sup>[3], [9]</sup>. Pero principalmente la Oca prefiere suelos francos, profundos y con buen contenido de materia orgánica, este cultivo responde muy bien a la fertilización con materia orgánica, integrada con fertilizantes ricos en nitrógeno y fósforo a niveles adecuados de 80-40-0 (fertilizantes N-P-K) <sup>[8]</sup>.

Debido a que la Oca es un cultivo tradicionalmente andino, es un suplente del cultivo de papa, aunque presentan diferentes tipos manejo y tiempos de labranza, la Oca muestra mayor resistencia a plagas, de esta manera es más estable. Otra característica importante es que una vez sembrada no necesita mayores cuidados. El cultivo se encuentra en la franja comprendida entre los 2300 y 4100 msnm, principalmente en zonas con clima frío, con temperaturas inferiores a 28 °C, temperaturas elevadas pueden afectar considerablemente su desarrollo. Requiere suficiente precipitación (570-2150 mm), pero sin la incidencia de heladas extremas y periodos diurnos menores a 12 horas para que inicie la formación adecuada del tubérculo <sup>[6], [4], [10]</sup>.

La plantación de Oca se realiza habitualmente mediante la rotación del cultivo, después de la recolección de papa, por lo cual demanda poca labor de preparación del suelo. Estudios anteriores, han demostrado que un adecuado control de malezas favorece considerablemente la producción, complementado de una apropiada fertilización <sup>[8]</sup>. El período de luz y la temperatura influyen tanto en la tasa de crecimiento de la planta y la formación de tubérculos. Por esta razón, generalmente la cosecha del cultivo de Oca tiene un período vegetativo aproximado entre 220 y 270

días. La cosecha se efectúa cuando la planta está totalmente amarilla evidenciando la madurez de sus tubérculos <sup>[11]</sup>. Estos tubérculos se recolectan como las papas, pero tienden a ser más frágiles, y deben ser excavados y manipulados con cuidado <sup>[3]</sup>. El rendimiento de este cultivo suele ser menor que el de la papa, ya que es un tubérculo de maduración tardía, pero sin embargo es más resistente a las plagas.

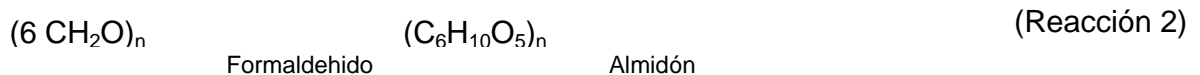
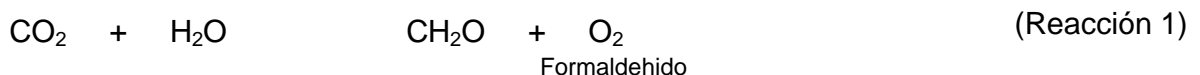
### 3.1.2 Cultivo de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” en Colombia

En Colombia la ausencia de información en la literatura antigua sobre la plantación de Oca y la baja propagación de su cultivo, conciben que el cultivo posiblemente estuviera entre los Chibchas de manera limitada o no era del todo popular en esta comunidad <sup>[12]</sup>. En la actualidad el cultivo de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” en Colombia, no se ha dado a conocer activamente. Sin embargo, es un cultivo importante en el departamento de Nariño, especialmente en agroecosistemas de páramo, principalmente para comunidades indígenas. No obstante, se ha observado un incremento en la siembra de este tubérculo en departamentos como Boyacá y Cauca, sin embargo, en el Cauca se ha empezado a difundir en los últimos años. Para su siembra se maneja un sistema de policultivos, donde se realiza la asociación de cultivos, con la siembra conjunta de Oca, haba, olluco, maíz, quinua y papa <sup>[13]</sup>.

## 3.2 ALMIDÓN

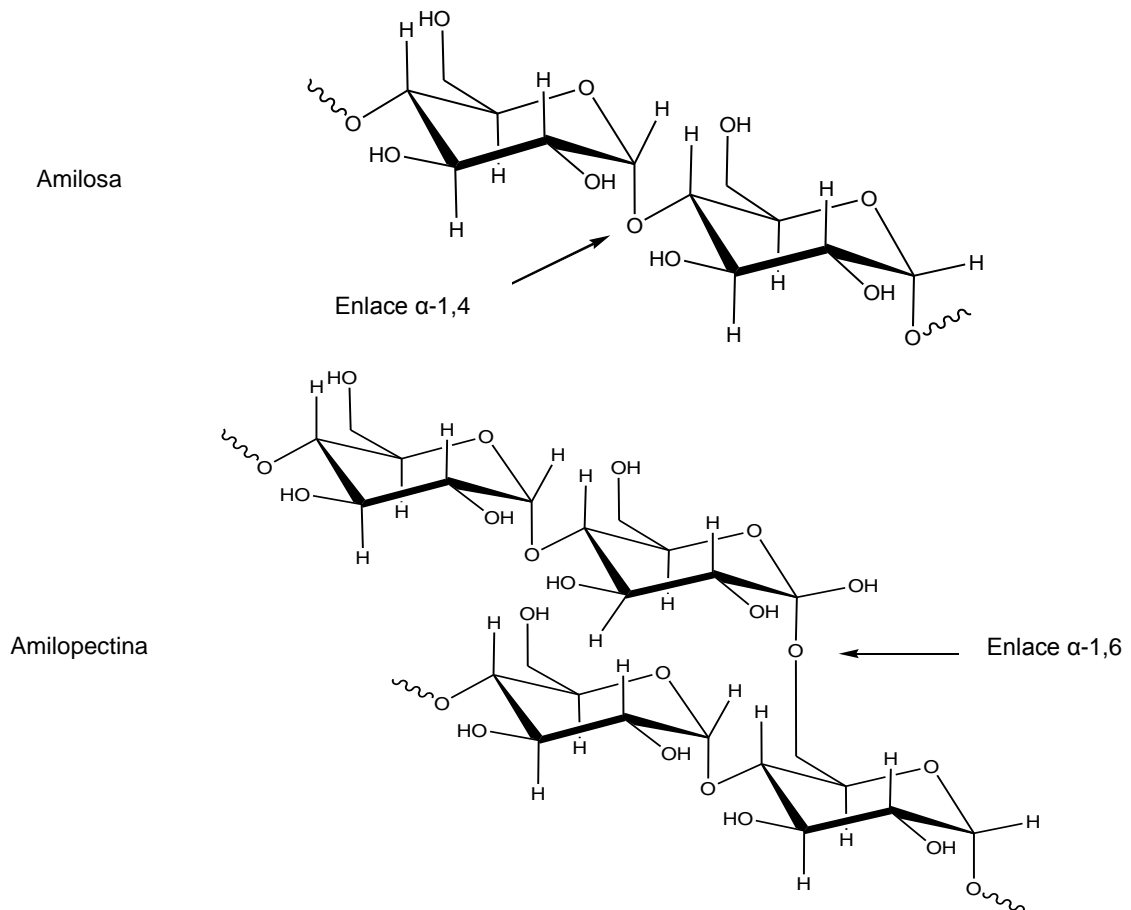
### 3.2.1 Características generales

Los tubérculos andinos son una fuente de energía, principalmente debido a su alto contenido de almidón, este es un carbohidrato propio de tejidos vegetales e importante constituyente de reserva, que se acumula en forma de gránulos, cuya forma y tamaño varían según el vegetal del que hacen parte y puede llegar a constituir hasta el 70% del peso de granos, cereales o tubérculos <sup>[14]</sup>. El almidón es un compuesto homoglucono, polisacárido formado por un solo tipo de azúcar, la glucosa. Se sintetiza como una forma de almacenamiento temporal de carbono, fijado en los cloroplastos durante los períodos activos de la fotosíntesis, almacenado como gránulos de almidón, que se convierte en sacarosa y se trasladan a los órganos de almacenamiento (semillas y tubérculos), donde vuelve a formarse. La fórmula química básica de la molécula de almidón es  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , se genera a partir de dióxido de carbono y agua hasta producir formaldehído, a continuación se lleva a cabo la polimerización del formaldehído a glucosa según las reacciones 1 y 2.



El almidón se almacena como una estructura granular compleja, que contiene dos polímeros diferentes de glucosa, conocidos como amilosa y amilopectina (Figura 2), cuya posición relativa en el gránulo no se conoce con certeza <sup>[15]</sup>. Estas moléculas presentan elevado peso molecular que intervienen directamente en las propiedades del almidón, especialmente en su capacidad de hidratación y gelatinización <sup>[16]</sup>.

**Figura 2.** Estructura molecular del almidón



La amilosa se considera generalmente como un polímero amorfo esencialmente lineal, constituida por glucosas unidas por enlace  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4), mientras que la amilopectina es un polímero muy ramificado, principal fracción de almidón, se cree que es la base de la arquitectura semicristalina del gránulo formada por glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) y  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) <sup>[17]</sup>. A los cuales debe en gran parte su funcionalidad, estos componentes son importantes en la producción de fibras y plásticos, y en la industria alimenticia <sup>[14]</sup>.

El almidón además de ser consumido directamente en los alimentos, puede ser extraído de los tubérculos que los contienen y sufrir una serie de transformaciones que cambian sus características y propiedades, convirtiéndolo en un producto de gran

valor para la industria y el comercio. El almidón es un compuesto versátil y de bajo costo, el cual tiene muchos usos como espesante, compactante, aglutinante de agua, estabilizador de emulsión y agente gelificante. Durante los últimos años la obtención de bioetanol ha presentado un incremento significativo, siendo el almidón una materia prima importante en su producción, mostrando buenas proyecciones a futuro a partir de recursos naturales renovables.

### **3.2.2 Almidón de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”**

La Oca es una importante fuente de almidón, por esta razón se constituye como una materia prima adecuada para la obtención de éste. No obstante, los datos técnicos disponibles acerca de la calidad y de sus propiedades son insuficientes. En promedio el rendimiento de extracción del almidón producido por este tubérculo es 14,18%, el porcentaje promedio de amilosa y amilopectina en el almidón es 29% y 71% respectivamente, con gránulos que presentan un tamaño en un rango de 20 a 29 micras. Algunas propiedades de este almidón, como su considerable poder de hinchamiento y su contenido de amilosa, logran ser producidas para diversos procesos industriales. No obstante estudios manifiestan que aspectos como sus propiedades deben ser necesariamente sometidas a mayores estudios para precisar su capacidad para el uso y su explotación comercial <sup>[18]</sup>.

El uso de almidones en la industria como el derivado a partir de la Oca, se fundamenta en el interés en el uso de materias primas naturales para el desarrollo de materiales, ya sea para la obtención de nuevos productos o para sustituir productos elaborados a partir de fuentes no renovables, generando a su vez el desarrollo regional. Los almidones de diferentes fuentes naturales y almidones modificados obtenidos a través de la hidrólisis con ácidos o enzimas son candidatos prometedores para contribuir al logro de este objetivo debido a su completa biodegradabilidad, bajo costo, fácil disponibilidad y renovabilidad <sup>[19]</sup>.

## **3.3 HIDRÓLISIS**

El almidón pocas veces es utilizado en forma natural, por ello han diseñado diferentes métodos físicos y químicos con el fin de transformar las características estructurales y funcionales de almidón. Propiedades como la digestibilidad, biodegradabilidad y estabilidad térmica son importantes aspectos que determinan el uso final del almidón, que se centran habitualmente con fines de modificación <sup>[20]</sup>. Los polisacáridos son hidrolizados en sus constituyentes monosacáridos, ya sea por la acción de enzimas o por medio de ácidos diluidos. En el caso del almidón, como polímero de la D-glucosa, se espera que al finalizar la hidrólisis completa genere D-glucosa.

La hidrólisis de almidón sucede en varias etapas, inicialmente se obtienen dextrinas (oligosacáridos de menor peso molecular), luego la maltosa (disacárido de glucosa) y por último la glucosa, como se presenta en la reacción 3. El almidón se hidroliza tradicionalmente mediante ácidos, pero la especificidad de las enzimas, sus



inherentes condiciones de reacción suaves y la ausencia de reacciones secundarias han hecho de las amilasas, los catalizadores más utilizados <sup>[21], [22]</sup>.

(Reacción 3)

Almidón

Glucosa

### 3.3.1 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo utilizando  $\alpha$ -amilasas y  $\beta$ -amilasas o por acción de amilasas presentes en la saliva, donde es necesario considerar las variables, la velocidad y la generación de productos, los cuales deben ser controlados por condiciones como: especificidad de la enzima, pH del medio, tiempo y temperatura. Las amilasas más conocidas y utilizadas son:

- **$\alpha$ -amilasas:** enzima glucanasa endoactiva que participa en la hidrólisis mediante la fragmentación de los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  al azar <sup>[23]</sup>, es decir que cuando actúa sobre la amilosa la degrada produciendo maltosa y glucosa y sobre la amilopectina generando dextrinas, maltosa y glucosa.
- **$\beta$ -amilasas:** interviene rompiendo enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  desde el extremo no reductor de la cadena, cada dos moléculas de glucosa. Sobre la amilosa actúa produciendo maltosa, mientras que sobre la amilopectina, maltosa y dextrinas (indica el límite del punto de ataque de la enzima). Estas dextrinas se producen porque la enzima no rompe enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ .

### 3.3.2 Hidrólisis ácida

En general la hidrólisis ácida es realizada con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, a temperaturas moderadas para proporcionar una adecuada hidrólisis de polisacáridos, con escasa descomposición de azúcares. Al tratar el almidón con ácidos diluidos se presenta el rompimiento de su estructura principal, generando inicialmente la formación de cadenas cortas de oligosacáridos, en esta hidrólisis se rompen los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $(1\rightarrow6)$  del almidón, liberándose finalmente glucosa.

En la hidrólisis ácida, se manejan aspectos importantes como concentración del ácido, temperatura y tiempo, estos parámetros ejercen gran influencia en el resultado final de la hidrólisis. Cuando el almidón se encuentra en medio ácido, tanto el peso molecular y la viscosidad de los compuestos iniciales disminuyen, aumentando así el poder reductor de los productos generados. Este tipo de proceso es una hidrólisis inespecífica, ya que se destruye totalmente el polímero de glucosa.

Industrialmente, la hidrólisis ácida de almidones se realiza mezclando ácido clorhídrico y almidón, o bien tratando el almidón húmedo, que consiste en agitación con gas de cloruro de hidrógeno; la mezcla se calienta hasta que se obtiene el grado esperado de despolimerización. Posteriormente el ácido se neutraliza y se recupera el producto, tras procesos de lavado y desecación <sup>[24]</sup>.

### 3.3.3 Azúcares reductores

Los azúcares reductores, son monosacáridos o disacáridos que poseen la capacidad de ceder electrones a otras moléculas, por esta razón actúan como agentes reductores. La presencia de un grupo libre de aldehído (-CHO) o de cetona (-CO-) les consiente funcionar como azúcares reductores en una estructura de cadena abierta. El producto de interés en la hidrólisis del almidón es la obtención de azúcares reductores, que pueden ser utilizados en etapas de fermentación para la producción de bioetanol. Tras este proceso cada molécula de maltosa generada se divide en monómeros de glucosa, generándose así dos extremos reductores.

## 3.4 FERMENTACIÓN

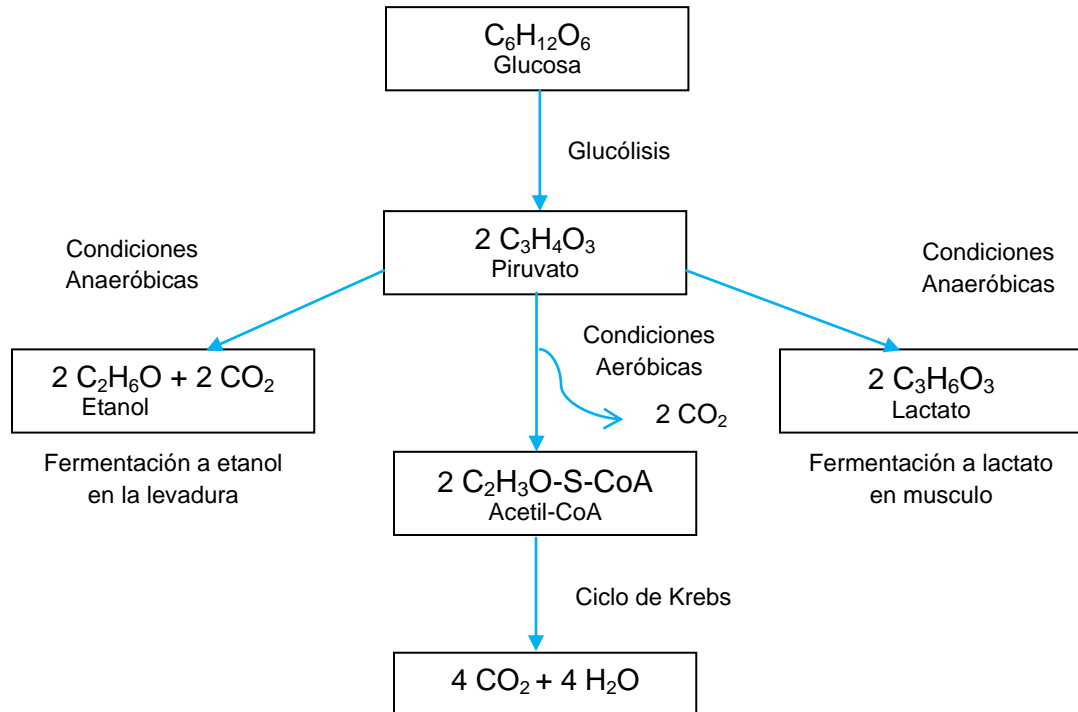
La fermentación es un proceso bioquímico, propio del catabolismo anaeróbico donde una sustancia orgánica actúa al mismo tiempo como donador y aceptor de electrones, produciendo ATP a nivel sustrato. Esta es realizada por diferentes microorganismos, quienes adquieren energía a partir de una fuente de carbono en medios anaerobios, es una oxidación incompleta debido a la ausencia de oxígeno en el medio. Los microorganismos, como bacilos, bacterias, levaduras y mohos, se nutren del medio que los rodean, multiplicándose y variando la composición del compuesto inicial.

El primer paso para la fermentación se da durante la glucólisis, vía metabólica que transforma la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) en piruvato ( $2 C_3H_4O_3$ ), cuando el oxígeno no se encuentra disponible en el medio.

Durante la glucólisis, tras una serie de reacciones una molécula de glucosa se transforma hasta obtener dos moléculas de piruvato (Figura 3) <sup>[25]</sup>. El piruvato, reacciona en condiciones aerobias o anaerobias. En presencia de oxígeno, el ácido pirúvico entra en una serie de reacciones químicas conocidas como el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ciclo de Krebs) y resulta en la cadena respiratoria. En ausencia de oxígeno, el ácido pirúvico puede seguir dos rutas metabólicas dependiendo de la célula. Se convierte en etanol y dióxido de carbono a través de la vía de la fermentación alcohólica en presencia de levaduras, o se transforma en lactato mediante la fermentación del ácido láctico ( $2 C_3H_6O_3$ ). La fermentación se produce cuando determinadas condiciones en el medio permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos. Existen diferentes tipos de fermentación, acética, butírica, láctica y alcohólica.

En la fermentación alcohólica, con ayuda de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se genera etanol y dióxido de carbono, productos de desecho para las células de la levadura de gran utilidad para la humanidad. Entre tanto el etanol que se produce a partir de estas levaduras es el presente en las bebidas alcohólicas, mientras que el dióxido de carbono elaborado por las levaduras es responsable de que la masa del pan aumente de tamaño <sup>[26]</sup>.

**Figura 3.** Rutas catabólicas del piruvato producido durante la glucólisis



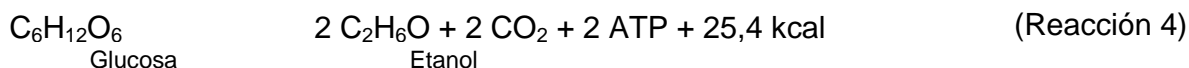
Células animales, vegetales y microorganismos en condiciones aerobias

Fuente: Nelson, David L. y Cox, Michael M. <sup>[25]</sup>

### 3.4.1 Fermentación alcohólica

Cualquier materia prima compuesta principalmente por carbono es potencialmente fermentable, es decir que es idónea para ser transformada en alcohol a través de una serie de procesos. Así, se encuentran dos clases de materias primas, las directamente fermentables y las indirectamente fermentables. Las primeras están compuestas por azúcares del tipo monosacáridos como la glucosa y fructosa. Mientras, que las indirectamente fermentables, se dividen en dos subgrupos, que contienen en su composición azúcares provenientes de polisacáridos <sup>[27]</sup>.

Los métodos como la hidrólisis ácida o enzimática de polisacáridos, permite el uso de los azúcares generados en el proceso de fermentación alcohólica con el fin de obtener bioetanol. Los azúcares son transformados a partir de dos vías químicas, al final del proceso gran parte de los azúcares se ha reducido para formar alcohol y en menor proporción se han oxidado para producir dióxido de carbono. Durante el proceso de fermentación alcohólica se genera la conversión del sustrato inicial, típicamente en presencia de levaduras en un medio anaerobio, transformando la glucosa a etanol, con desprendimiento de dióxido de carbono y producción de energía. El proceso de fermentación alcohólica se representa según reacción 4, establecida por Gay-Lussac.



La fermentación es un proceso complejo durante el cual se producen además otros cambios, que inciden sobre la calidad del producto final (Figura 4). En el proceso de fermentación se convierte esencialmente azúcares a etanol y dióxido de carbono, pero también se producen paralelamente una serie de sustancias químicas, como alcoholes superiores, ácidos orgánicos volátiles, aldehídos, etc. Por esta razón existen parámetros importantes en el proceso de fermentación, que deben ser tenidas en cuenta durante este proceso, como la concentración inicial del sustrato, las levaduras y las condiciones del proceso. Dentro de las condiciones del método de fermentación alcohólica es necesario tener en cuenta variables como pH (4,5-6,5), temperatura (25-35 °C), tiempo, agitación, presión, etc., para obtener un mejor rendimiento durante esta etapa en la obtención de etanol <sup>[28]</sup>.

**Figura 4.** Esquema del proceso fermentativo

Microorganismos	Elementos Nutrientes	Condiciones Ambientales Adecuadas	Productos
Bacterias, hongos, levaduras, tejido celular, etc.	+ C, H, O, N, S, P, minerales, vitaminas, etc.	+ pH, viscosidad, temperatura, oxígeno disuelto, etc.	Microorganismos + CO <sub>2</sub> + Productos intra y extracelular

Fuente: Pérez, Edier Humberto <sup>[27]</sup>

La concentración alcohólica, es un parámetro importante durante la fermentación, dependiendo del microorganismo utilizado durante este proceso, que dará un mayor o menor rendimiento en la obtención de alcohol. Por ejemplo, la *Zymomona mobilis* es un microorganismo que muestra mayor resistencia al alcohol en comparación con la *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.4.2 Levadura

Las levaduras son microorganismos importantes en tratamientos de fermentación, utilizadas en la industria panadera, vinícola y cervecera, además de su uso en farmacéutica, nutrición y destilería. En la obtención de etanol la fermentación alcohólica compone una etapa trascendente producida por levaduras. La principal levadura en participar en este proceso es la *Saccharomyces cerevisiae*, son organismos eucarióticos unicelulares, un hongo capaz de fermentar azúcares como glucosa y fructosa presentes en altas concentraciones, estos azúcares fermentables son transformados finalmente a etanol y dióxido de carbono, se asume que la levadura inicia la fermentación alcohólica, pero no forma parte en la reacción, conservándose sin cambios a lo largo de las reacciones bioquímicas durante la obtención de alcohol. La *Saccharomyces cerevisiae*, carece de α-amilasa y

glucoamilasa, en consecuencia no es capaz de hidrolizar almidón, por lo tanto requiere almidón hidrolizado anteriormente para la eficiencia de fermentación <sup>[29]</sup>.

La *Saccharomyces cerevisiae* cuando el sustrato es glucosa presenta una constante de saturación ( $k_s$ ) de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , si se aumenta la concentración del sustrato a niveles superiores, la velocidad de crecimiento pueden disminuir debido a la inhibición por sustrato. Esta, levadura, es capaz de fermentar una solución de azúcar con una concentración inferior a  $120 \text{ g L}^{-1}$ , se inactiva cuando la concentración es superior a  $150 \text{ g L}^{-1}$ , por la presión osmótica del medio <sup>[30]</sup>. Para sustratos como la glucosa u otros carbohidratos la mayoría de los microorganismos son capaces de crecer a concentraciones de  $100\text{-}150 \text{ g L}^{-1}$ , pero muy pocos crecerán a  $300\text{-}500 \text{ g L}^{-1}$ . Es decir, a altas concentraciones de azúcar se observa la inhibición de los microorganismos debido al fenómeno de ósmosis que se da en las células, lo cual es aprovechado en la industria de conservación de alimentos.

Las características de una fermentación son diferentes debido a la composición de azúcar, temperatura, pH, ausencia o presencia de nitrógeno, lo que indica la capacidad de adaptación de la levadura a diferentes condiciones ambientales. Los microorganismos como las levaduras, deben su crecimiento y desarrollo, principalmente a los nutrientes y sustancias asimilables presentes en el medio de reacción, influyendo directamente en el proceso de fermentación y en el rendimiento del alcohol. La adecuada actividad de las levaduras esta aproximadamente en un rango de pH de 3,5 a 5,5. En el caso de la *Saccharomyces cerevisiae* el crecimiento se ve favorecido por un pH aproximado de 4,0 a 5,0. En cuanto a la temperatura los procesos de fermentación se dan debidamente en un rango de  $25$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , ya que a temperaturas superiores puede producirse la muerte de la levadura.

Para crecer un microorganismo necesita fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Las levaduras requieren condiciones especiales para su crecimiento, los minerales como sodio, magnesio, potasio y calcio, constituyen los elementos necesarios. Además se ha encontrado que microelementos como boro, manganeso, hierro, zinc, molibdeno y yodo, ayudan a obtener una mayor actividad de la levadura en procesos de fermentación.

### **3.4.3 Destilación**

Terminado el proceso de fermentación, es necesario separar el etanol producido del medio donde ocurrió la fermentación, para esto se recurre a la destilación. Se fundamenta en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a fase de vapor y, posteriormente, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación y obtener el compuesto deseado.

Los distintos métodos utilizados en la destilación se clasifican en destilación simple y destilación fraccionada. La destilación simple se identifica porque no se crea ningún tipo de contacto entre el vapor formado por el líquido hirviendo y un líquido cualquiera, de constitución distinta a la del equilibrio; el vapor generado y el líquido en ebullición están en equilibrio. Mientras que la destilación fraccionada consiste en continuos

procesos de evaporación y condensación por medio del reflujo de una parte del destilado al condensador y goteo por una larga columna a una serie de placas, y al mismo tiempo el vapor que se dirige al condensador burbujea en el líquido de esas placas, el vapor y el líquido interaccionarán de forma que parte del agua del vapor se condensará y parte del alcohol del líquido se evaporará. Así pues, la interacción en cada placa es equivalente a una redestilación.

### 3.5 BIOETANOL

El etanol o alcohol etílico, con fórmula química  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$  es una sustancia química incolora, transparente e inflamable, sus propiedades físicas y químicas se muestran en la tabla 3, es uno de los productos más importantes en la industria. El etanol se obtiene principalmente a partir de procesos de fermentación o descomposición de azúcares y mediante procesos de destilación. Igualmente es elaborado a partir de la transformación química del etileno, se sintetiza a través de su hidratación catalítica usando como catalizador ácido sulfúrico.

**Tabla 3.** Propiedades físicas y químicas del etanol

Constante	Etanol
Estado físico	Líquido
Apariencia	Incoloro
Olor	Olor característico fragante. Umbral del olor: 100-180 mg L <sup>-1</sup>
pH	No reportado
Temperatura de ebullición	78,3 °C
Temperatura de fusión	-114.0 °C
Densidad	0,789 kg L <sup>-1</sup> a 20 °C
Presión de vapor	44.3 mm Hg a 20 °C
Densidad de vapor	1.59
Solubilidad	Agua <sup>*</sup> , Cetonas, Esteres, Éteres, Glicoles y otros Alcoholes.

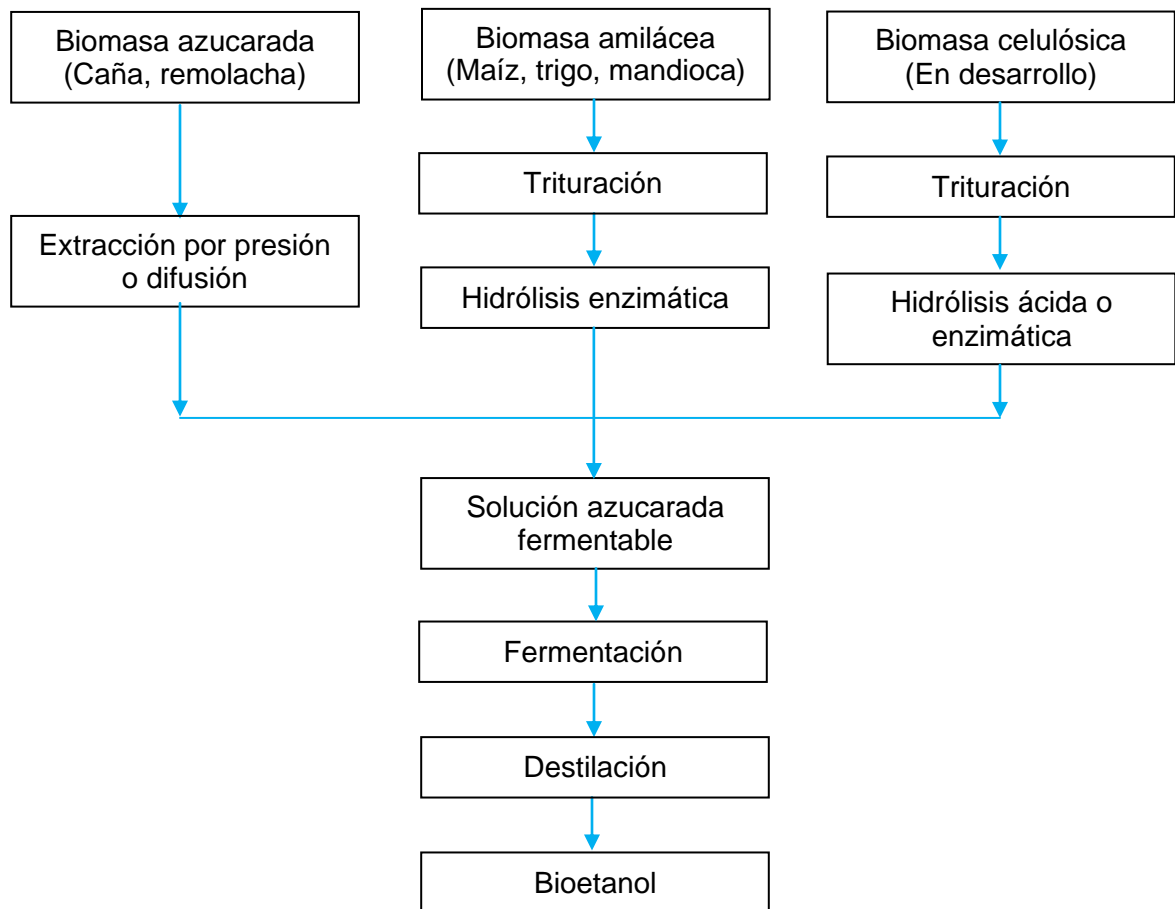
\*Soluble en todas proporciones en Agua a 20 °C.

El etanol producido mediante procesos de fermentación de carbohidratos provenientes de fuentes vegetales, combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa es conocido como bioetanol <sup>[31]</sup>. Actualmente la elaboración productiva de bioetanol se fundamenta en la fermentación de la sacarosa de la caña de azúcar y melaza o glucosa derivada de los cultivos a base de almidón, tales como maíz, trigo y yuca <sup>[29]</sup>. Dependiendo del origen de preparación, su fabricación involucra principalmente métodos de separación de azúcares, fermentación y destilación <sup>[31]</sup>. En el caso del almidón, este se transforma en azúcares mediante un proceso enzimático o por medio de ácidos. Así, los azúcares libres pueden fermentarse con levaduras, y el producto resultante se somete a destilación para la purificar el bioetanol <sup>[32]</sup>.

La cadena productiva del etanol presenta gran diversidad de materias primas, cuyo proceso conduce a la obtención de etanol, las rutas tecnológicas para la producción

de bioetanol (Figura 5), hace uso de materias primas de interés, basándose en la extracción de azúcares que pueden ser fermentados. La elaboración de bioetanol a partir de biomasa azucarada posee azúcares disponibles como caña de azúcar, por lo tanto la obtención de etanol necesita menos fases, haciéndola una técnica más simple. Existen técnicas para la elaboración de bioetanol que requieren más etapas para finalizar el proceso, entre ellas está la biomasa amilácea a partir de granos y cereales, además de biomasa celulósica, pero esta última aún se encuentra en estudios a nivel de laboratorio y plantas piloto, presentando problemas tecnológicos y económicos <sup>[32]</sup>.

**Figura 5.** Rutas tecnológicas para la producción de bioetanol



Fuente: Bioetanol de Caña de Azúcar <sup>[32]</sup>

### 3.5.1 Obtención de etanol a partir de almidón

Cualquier materia prima con suficiente contenido de almidón y carbohidratos puede convertirse en bioetanol. Una de esas materias primas es el almidón procedente de cultivos básicos como maíz, trigo, cebada, sorgo, papa, yuca, entre otros. La *Oxalis tuberosa* Molina "Oca", dado su alto contenido de almidón, es una materia prima importante a tener en cuenta para la producción de bioetanol, principalmente en

países en vía de desarrollo pertenecientes a la zona andina, ya que este es un cultivo apto para clima frío.

La Oca es un producto agrícola que se cultivan en algunas zonas frías de Colombia, a partir de sus tubérculos se elabora el almidón que mediante procesos de hidrólisis se convierte en azúcares. La obtención de etanol a partir de almidón, se llevan a cabo a través de una serie de etapas, entre las cuales están hidrólisis, fermentación y destilación.

### **3.5.2 Usos del bioetanol**

El alcohol etílico es una materia prima importante en el sector industrial como disolvente extractor y anticongelante, en farmacéutica como principio activo de medicamentos y cosméticos, en el sector alimenticio principalmente en la elaboración de bebidas alcohólicas. Igualmente es consumido en la producción de derivados químicos, como el etanal proveniente de la oxidación del etanol, que tras su oxidación genera ácido etanoico. Al llevarse a cabo un proceso de deshidratación, el etanol se transforma en dietiléter. Otros productos obtenidos a partir del etanol son el butadieno, utilizado en la fabricación de caucho sintético y el cloroetano, un anestésico local. Sin embargo, actualmente la mayor producción de bioetanol se utiliza como combustible, combinado con gasolina.

El etanol, obtenido a partir de una fuente renovable, ha ganado un creciente interés como sustituto de combustibles fósiles, con la posibilidad de mejorar la calidad del aire urbano, la disminución de la emisión de gases de efecto invernadero, y la minimización de la dependencia del petróleo <sup>[33]</sup>. Colombia se encuentra a la vanguardia de este proceso, desde 2005 se emplea en automóviles una composición de 10% alcohol carburante y 90% gasolina, conocida como mezcla E10 <sup>[32]</sup>. La política nacional de biocombustibles, comprende cuatro principios importantes:

- Desarrollo rural.
- Desarrollo de empleos en las zonas agrícolas.
- Balance de la canasta energética.
- Mejoramiento del ambiente.

El uso del bioetanol como combustible constituye el 61% de la producción mundial, principalmente para combinar o sustituir combustibles provenientes del petróleo y sus derivados, aproximadamente el 23% es destinado a la industria en el procesamiento de cosméticos, fármacos, químicos, entre otros. Mientras que el 16% sobrante se destina a la industria de bebidas <sup>[31]</sup>. El etanol, puede ser utilizada como combustible en motores de combustión interna con ignición a chispa de dos maneras, básicamente: 1) en mezclas de gasolina y etanol anhidro, o 2) como etanol puro, generalmente hidratado <sup>[32]</sup>.

Con el uso de los biocombustibles se busca mitigar el impacto ambiental creado por combustibles fósiles, debido a que la combinación presenta ventajas entre las que se



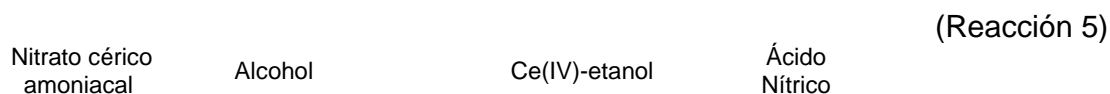
destacan la reducción de emisiones tóxicas a la atmósfera y aumento en el calor de vaporización y combustión. Según el IPCC (Expertos sobre el Cambio Climático) (2007) los biocombustibles tienen un gran potencial para la reducción de emisiones de gases efecto invernadero en el sector transporte.

### 3.5.3 Métodos de análisis para determinación de etanol

Existen diferentes métodos para determinar la presencia de alcohol en una muestra, análisis cualitativos y cuantitativos. Dentro de las pruebas cualitativas se encuentran la prueba de nitrato cérico amoniacal, la oxidación de Jones y la prueba de Lucas entre otras. En los análisis cuantitativos están técnicas como el UV-Vis con métodos colorimétricos y la cromatografía de gases.

#### 3.5.3.1 Prueba cualitativa con nitrato cérico amoniacal

El nitrato cérico amoniacal, reacciona con alcoholes primarios, secundarios y terciarios, que poseen menos de 10 átomos de carbono, dan prueba positiva, la cual se evidencia por un cambio de color. Este método se basa en la reacción de nitrato de cerio amoniacal (complejo de color amarillo) y un alcohol para producir un complejo de color rojo de Ce(IV)-etanol como muestra la reacción 5.



La prueba del nitrato cérico amoniacal es un análisis específico y rápido para alcoholes en comparación con otros métodos cualitativos. La oxidación de Jones o prueba del anhídrido crómico que se basa en la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos o ácidos, y alcoholes secundarios a cetonas, sin embargo, los aldehídos dan positivo, puesto que ellos pueden ser oxidados a su correspondiente ácido carboxílico. En la prueba de Lucas o del HCl/ZnCl<sub>2</sub> los alcoholes primarios con menos de 6 átomos de carbono son solubles en el reactivo de prueba, pero reaccionan muy lentamente <sup>[34]</sup>.

#### 3.5.3.2 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica eficaz para la medición de las especies volátiles en muestras con matrices complejas. En este método cromatográfico en columna, el análisis cuantitativo se fundamenta en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas. Esta es una técnica de separación, utilizada principalmente como técnica de detección, de confirmación y cuantificación. En este método se encuentran diferentes tipos de detectores y su elección obedece a diversos elementos como sensibilidad, selectividad, precio, facilidad para operar con él, dificultad para encontrar repuestos, etc. Para realizar un análisis cromatográfico es necesario que el analito de interés sea bastante volátil para que su molécula este en

forma de vapor o gas a una temperatura equivalente o menor a 400 °C y además que no se descomponga a esas temperaturas.

La cromatografía de gases es ampliamente aceptada para el análisis de muestras volátiles, debido a que tiene excelente selectividad con columnas capilares y buena sensibilidad con detección de ionización de llama (FID), conductividad térmica (DCT) y espectrometría de masas (MS), entre otros <sup>[35]</sup>. Esta técnica radica en la inyección de pequeñas cantidades de analito en el inyector del cromatógrafo de gases, donde la muestra sufre procesos de vaporización y posteriormente es transportada por un gas inerte a través de una columna con un líquido de partición que presenta solubilidad selectiva con los componentes de la muestra, produciendo su disociación. Al llegar al detector se genera una señal eléctrica proporcional a la concentración del analito, la cual se transforma en un cromatograma. La cuantificación por cromatografía de gases, se puede llevar a cabo principalmente por medio de tres métodos como: patrón externo, patrón interno y normalización. Con base en el cromatograma se obtienen las áreas bajo la curva del etanol y del patrón interno, posteriormente se grafica concentración de etanol contra la relación de las áreas de etanol y el patrón interno.

### **3.6 *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE CULTIVOS ILÍCITOS EN CLIMA FRIO**

Los cultivos ilícitos son plantaciones destinadas a la fabricación de sustancias psicoactivas consideradas ilegales. El cultivo de plantas utilizadas como materia prima para la producción de sustancias narcotizantes es una actividad que crea problemáticas sociales, políticas y económicas de enormes proporciones y generan un gran impacto ambiental debido a la afectación que producen en los suelos, porque son sometidos a prácticas como quema, corte y medios químicos de fertilización, que crean problemas de erosión y pérdida de nutrientes. Además durante el procesamiento de estas sustancias se emplean una considerable cantidad de productos químicos los cuales producen gran contaminación cuando pasan a las corrientes tanto superficiales como subterráneas, provocando pérdida de la flora y fauna acuática, afectación hidrológica e intoxicación humana y animal.

En Colombia la presencia de cultivos ilícitos muestra una gran problemática para la sociedad, comenzó a finales de la década los setenta con cultivos de marihuana en la costa atlántica y posteriormente en el departamento del Meta, por su parte la siembra de coca se daba inicialmente en las comunidades indígenas de la Sierra Nevada de Santa Marta y Putumayo. Mientras que en la zona andina el cultivo de amapola fue una consecuencia de la ruptura del pacto del café <sup>[36]</sup>. Estas prácticas tienen una dependencia en aspectos importantes como la diversidad biofísica, cultural y regional del territorio generando que la mayoría de las zonas de cultivos ilícitos estén igualmente creando zonas con alta marginalidad e inseguridad social, donde las condiciones de pobreza y exclusión social se presentan en las comunidades que se ven afectadas por estos fenómenos en el país.

La fragilidad ambiental que genera la presencia de cultivos ilícitos, se ubica en la frontera agrícola contribuyendo a su ampliación mediante la deforestación de zonas de conservación y de reserva forestal. La continua degradación de los recursos naturales causada por la contaminación y la destrucción sistemática de ecosistemas situados en zonas ambientalmente indispensables son parte de las consecuencias más graves de la expansión de la siembra y producción de cultivos ilícitos <sup>[37]</sup>.

La reducción de cultivos ilícitos se imputa principalmente a las estrategias de las autoridades y a la implementación de cultivos alternativos, estableciendo que los cultivos son actualmente más pequeños, menos concentrados y ubicados en territorios apartados, esparcidos con menor producción. Lo cual ha evitado su siembra en zonas altamente vulnerables, permitiendo la formación de asociaciones campesinas que promueven el desarrollo de la agricultura a través de la plantación de productos alternativos, donde los cultivos ilegales son reemplazados por café, banano, piña, palma africana y otros cultivos adecuados para el clima tropical.

Teniendo en cuenta que la *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" es un cultivo de clima frío que representa una opción viable para la sustitución de cultivos ilícitos, que puede someterse a las condiciones que implica la altura y el clima de las zonas andinas, que además garantiza el uso de la cosecha para la obtención de alimentos y productos como el bioetanol. Contribuyendo como fuente alternativa de energía a partir de una fuente renovable y limpia, con una adecuada disposición de los desechos originados y derivados, evitando el impacto al medio ambiente que ocasionaría su incorrecta disposición, una de estas opciones es aplicarlas al campo, de acuerdo con las especificaciones físicas y químicas del suelo y los niveles críticos de nutrientes que requieren las diferentes variedades de cultivos, según el sitio donde se siembren.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La materia prima utilizada fue *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”, cultivada en el corregimiento de Paletará, municipio de Puracé, departamento del Cauca, mediante sistema de policultivos (Figura 6). La cantidad procesada para la obtención de etanol a nivel de laboratorio a partir de almidón, fue 30 kg de Oca. Teniendo en cuenta el buen estado de la muestra y sometiendo a calentamiento solar para el proceso deshidratación y endulzado durante 12 días.

**Figura 6.** Cultivo de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”



Fuente: Rosero Alpala, María Gladys <sup>[13]</sup>

### 4.2 EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

#### 4.2.1 Humedad

El contenido de agua en un alimento varía entre 60 y 95%, el porcentaje de humedad se representa el contenido de agua en proporción al peso o volumen de la masa del alimento. La humedad se determinó por el método gravimétrico, con la relación entre la masa de agua libre y de agua ligada. Se fundamenta en pesar la muestra antes y después del calentamiento a 70 °C (no se debe exceder esta temperatura debido al alto contenido de azúcares que presentan alimentos como el tubérculo de la *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”) en una estufa con circulación de aire forzado con el objetivo de eliminar el agua superficial <sup>[38]</sup>. Se calcula según la ecuación 1.

Ecuación 1

Dónde:

$W_s$ = Peso de la muestra seca en g

$W_m$ = Peso de la muestra húmeda en g

#### 4.2.2 Cenizas

El valor de cenizas se refiere al residuo final después de la combustión completa de los compuestos orgánicos de un alimento en condiciones establecidas. Tras la incineración completa de la muestra, este residuo corresponde al contenido de minerales en el alimento. Se determinó por incineración seca y consiste en incinerar en una mufla Thermolyne tipo F1400 desde 425 a 550 °C una muestra previamente pesada con el objetivo de eliminar las sustancias orgánicas tras la combustión formando  $CO_2$ , agua y la sustancias inorgánicas quedan en forma de residuo hasta obtener cenizas de color gris o gris claro <sup>[38]</sup>. Se calcula mediante la ecuación 2.

Ecuación 2

Dónde:

$W_c$ = Peso de las cenizas en g

$W_m$ = Peso de la muestra húmeda en g

#### 4.2.3 pH

Se determinó por el método potenciométrico, se homogenizó la muestra y a partir de la suspensión alimento agua, en relación 1:10, se agitó y dejó reposar, posteriormente se midió el pH <sup>[6]</sup>. Para este procedimiento se utilizó un pH-metro METROHM E-744 con electrodo combinado de vidrio.

#### 4.2.4 Proteína

El contenido de proteína se determinó por el método de Kjeldahl, este es un método oficial y descrito en múltiples normativas (AOAC, US-EPA, ISO y distintas Directivas Comunitarias). Utilizado mundialmente para la determinación cuantitativa de nitrógeno procedente de diversos materiales, se compone de tres etapas <sup>[38], [39]</sup>:

##### a) Oxidación de la muestra

Se basa principalmente en la digestión de la muestra en ácido sulfúrico concentrado a ebullición, con la adición de un catalizador. Las muestras se tratan con  $H_2SO_4$  y una mezcla catalizadora de Se,  $CuSO_4$  y  $K_2SO_4$  para oxidar la materia orgánica y transformar el nitrógeno en sulfato ácido de amonio (reacción 6).



El equipo utilizado en la digestión fue el BÜCHI B-426.

**b) Descomposición del sulfato ácido de amonio**

Adicionando exceso de NaOH, el  $\text{NH}_4\text{HSO}_4$  se descompone liberando amoníaco, el cual se almacena por medio de destilación sobre ácido bórico (reacciones 7, 8 y 9).

(Reacción 7)

(Reacción 8)

(Reacción 9)

El equipo de destilación empleado fue BÜCHI K-314.

**c) Titulación del borato de amonio**

El borato de amonio formado anteriormente se titula con HCl o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N en presencia de una mezcla de indicadores, rojo de metilo y verde de bromocresol (reacciones 10 y 11).

(Reacción 10)

(Reacción 11)

El cálculo de la proteína total se puede realizar empleando la ecuación 3.

Ecuación 3

Dónde:

$V_{\text{HCl}}$ = Volumen corregido de HCl en mL (muestra - blanco)

$N_{\text{HCl}}$ = Normalidad del HCl

F= Factor de conversión de nitrógeno a proteína

$W_m$ = Peso de la muestra en mg

#### **4.2.5 Extracto etéreo o grasa bruta**

El contenido en grasa bruta de un producto se define convencionalmente como la parte del mismo extraíble por éter etílico en condiciones determinadas. Incluye, además de la grasa, otras sustancias solubles en éter etílico, como: ceras, pigmentos, vitaminas, etc. Este tipo de análisis sigue a la determinación de humedad, porque la grasa se extrae sobre el producto seco, además el método requiere realizar un ajuste de la humedad previo a la extracción de la materia grasa, ya que la extracción de grasas se realizó basándose en la miscibilidad de estas sustancias en disolventes orgánicos, en este caso éter etílico, que a su vez son insolubles en agua e inmiscibles con ella. Esta extracción se realizó con un equipo Soxhlet, durante 6 horas aproximadamente, después se secó el residuo en estufa a 100 °C por 30 minutos <sup>[38]</sup>. La ecuación 4, determina el porcentaje de grasas.

Ecuación 4

Dónde:

$W_g$ = Peso de la muestra húmeda en g

$W_m$ = Peso de la grasa extraída en g

#### 4.2.6 Fibra bruta y extracto no nitrogenado

La fibra cruda radica en el residuo orgánico combustible e insoluble que queda después de que la muestra se ha tratado en condiciones determinadas. El método consiste en digerir la muestra desengrasada con una solución de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio; lavar con agua destilada, secar, pesar, calcinar, pesar; la pérdida de peso después de la calcinación representa el contenido de fibra cruda en la muestra. Este tratamiento proporciona la fibra cruda que consiste principalmente del contenido en celulosa además de la lignina y hemicelulosa contenidas en la muestra. Las cantidades de estas sustancias en la fibra cruda pueden variar con las condiciones que se emplean. En este caso, se aplicó sobre una muestra previamente desengrasada con éter, en primer lugar una digestión con ácido sulfúrico seguida de filtración y lavado con agua caliente, luego digestión con hidróxido de sodio y de nuevo filtrado y lavado con agua caliente, después se secó a 105 °C, se pesó una vez llegó a temperatura, finalmente se calcinó y pesó en frío para corregir el aporte generado por las cenizas <sup>[38]</sup>, se determina según la ecuación 5.

Ecuación 5

Dónde:

$P_1$ = Peso de la muestra desengrasada tratada con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio seca en g

C= Peso de las cenizas en g

$W_m$ = peso de la muestra en g

#### 4.2.7 Carbohidratos

Finalmente para determinar el porcentaje de carbohidratos se requiere conocer los porcentajes de todos los demás componentes del alimento, por esta razón es necesario realizar todos los análisis con anterioridad. Así, la ecuación 6 permite determinar de manera indirecta el porcentaje de carbohidratos.

Ecuación 6

Dónde:

% H= Porcentaje de humedad

% C= Porcentaje de cenizas en base húmeda

% P= Porcentaje de proteína en base húmeda

% G= Porcentaje de grasas en base húmeda

% F= Porcentaje de fibra en base húmeda

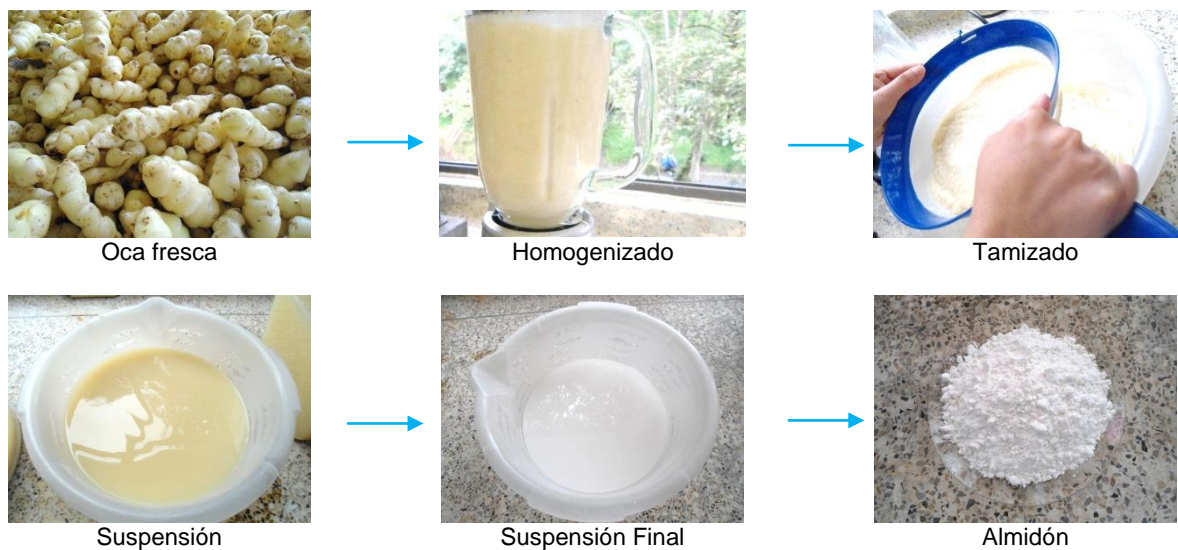
#### 4.2.8 Grados Brix

Los grados Brix proporcionan una medida objetiva de la concentración de azúcar disuelto en un producto. Para medir la cantidad de sacarosa presente en muestras de alimentos, se utilizó el refractómetro (instrumento que mide la refracción de la luz en una solución), basado en este método la concentración se mide en grados Brix. Se homogenizó la muestra por medio de maceración y a partir de la suspensión se dejó reposar y se midieron los grados Brix <sup>[38]</sup>. Para este procedimiento se usó un Refractómetro ABBE Marca Exttech perteneciente a la Unidad de Análisis Industriales, Laboratorio de Aguas de la Universidad del Cauca.

#### 4.3 ELABORACIÓN DE ALMIDÓN

Para la elaboración del almidón a partir de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” (Figura 7). Inicialmente se realizó un lavado con agua, para remover el exceso de impurezas presentes en los tubérculos y se dejaron secar a temperatura ambiente. La muestra limpia se trituró en trozos pequeños y se homogenizó con agua destilada, a través de un proceso de licuado por 2 minutos, hasta obtener la suspensión esperada. La mezcla obtenida se pasó por tamiz de 2 mm y posteriormente por tamiz malla 80, para obtener partículas más finas, el líquido obtenido se dejó sedimentar por 12 horas.

**Figura 7.** Proceso de extracción de almidón de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”



Fuente: Autor

Después de este periodo de tiempo se decantó el sobrenadante y se agregó agua destilada homogenizando nuevamente la mezcla y dejando en reposo hasta que sedimentó el almidón extraído, este proceso se realizó sucesivamente hasta obtener el almidón (pasta blanca) libre de impurezas, este se dejó secar a temperatura



ambiente <sup>[40]</sup>. Para el almidón obtenido se determinó rendimiento de extracción, además de humedad, cenizas y nitrógeno total (según la metodología 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.4 respectivamente).

#### 4.4 HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN

Para la hidrólisis ácida, se prepararon soluciones de almidón de Oca (25,0 g L<sup>-1</sup>) en un volumen de 100 mL de ácido, utilizando un diseño aleatorio multifactorial bajo las siguientes condiciones: 3 concentraciones de HCl (1, 2 y 3 N) X 3 temperaturas (25, 30 y 35 °C) X 6 tiempos (2, 4, 8, 12, 16 y 20 días), para un total de 54 tratamientos con dos réplicas por procedimiento. Una vez cumplido el tiempo de hidrólisis ácida, la suspensión fue filtrada, el sólido obtenido se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente se pesó y se determinó el rendimiento de la hidrólisis al compararlo con el peso inicial del almidón <sup>[41]</sup>. El rendimiento de la hidrólisis se calculó según la ecuación 7, en función del almidón no hidrolizado, es decir del almidón que no reaccionó durante la hidrólisis.

Ecuación 7

Dónde:

Wa= Peso de almidón (base seca) después de hidrólisis ácida.

W= Peso (base seca) antes de la hidrólisis ácida

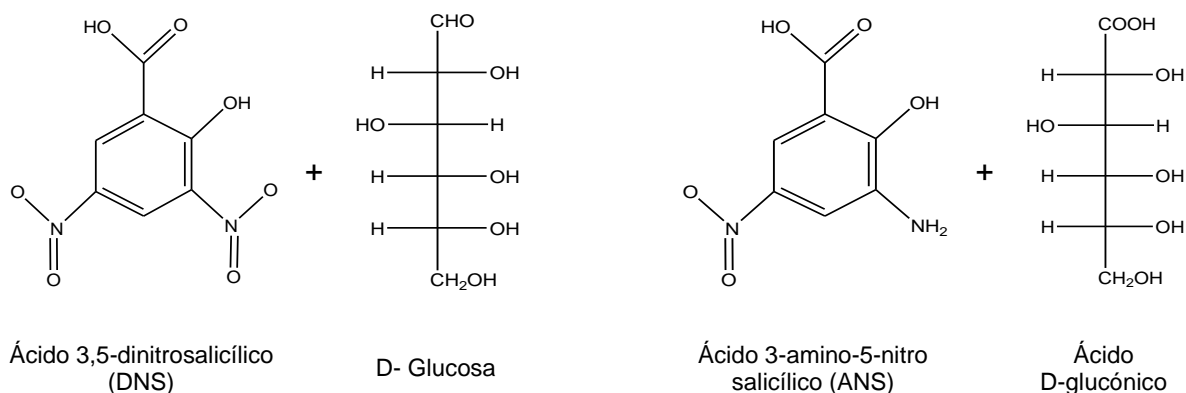
El filtrado se almacenó para la determinación del contenido de azúcares reductores producidos a partir de la hidrólisis ácida del almidón.

#### 4.5 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Para la determinación de azúcares reductores generados de la hidrólisis de almidón, se utilizan distintos métodos. Un ensayo ampliamente practicado, recomendado por la IUPAC es el método del reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), la reacción que se genera a partir del DNS es la reducción de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de color amarillo a 3-amino-5-nitrosalicílico (ANS) de color rojo <sup>[42]</sup>, según la reacción 12. Así, durante este proceso, el grupo aldehído del azúcar reductor se oxida para formar su respectivo grupo carboxílico bajo condiciones alcalinas <sup>[40]</sup>.

El fundamento de esta técnica consiste en la oxidación de la glucosa, que en solución acuosa se encuentra en forma cíclica (muy estable), por esta razón es necesario calentar la muestra para generar la apertura del anillo, dejando expuesto el grupo aldehído donde se produce la reacción. Para que se dé adecuadamente la reacción es necesario un medio alcalino adicionando NaOH, en la solución acuosa se ioniza liberando Na<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup> en el medio de reacción permitiendo la oxidación de la glucosa. El

esquema de la reacción 12, muestra que un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Sin embargo, se sospecha que se presentan muchas reacciones secundarias durante el proceso y la estequiometría de la reacción real es más complicada. El tipo de reacción secundaria depende de básicamente de la naturaleza estructural exacta de los azúcares reductores.



(Reacción 12)

#### 4.5.1 Implementación del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis

Se implementó el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito anteriormente. Preparando curvas de calibración con soluciones de D-glucosa en diferentes niveles de concentración en un rango de 0,10 a 1,40 g L<sup>-1</sup>. Inicialmente se validó el sistema instrumental, en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 20, se determinó la longitud de onda de máxima absorción haciendo un barrido de 400 a 600 nm.

Se evaluó la Linealidad Instrumental, valorando 8 niveles de concentración de D-Glucosa durante 5 días diferentes, preparando tres curvas de calibración por día, las cuales fueron sometidas al método descrito previamente.

Se estimó la Precisión Instrumental, bajo condiciones de repetibilidad (mismo día) y precisión intermedia (días diferentes). Para repetibilidad se prepararon 3 curvas de calibración con 8 niveles de concentración, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones. En la precisión intermedia se prepararán 5 curvas de calibración durante 5 días diferentes, una curva de calibración por día. Se determinaron los Límites Críticos, de detección y cuantificación teóricamente usando el método sugerido por la IUPAC<sup>[43]</sup>.

#### 4.5.2 Método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis

El ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es utilizado ampliamente en la estimación de la reducción de azúcares. Se preparó una solución con 1,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico

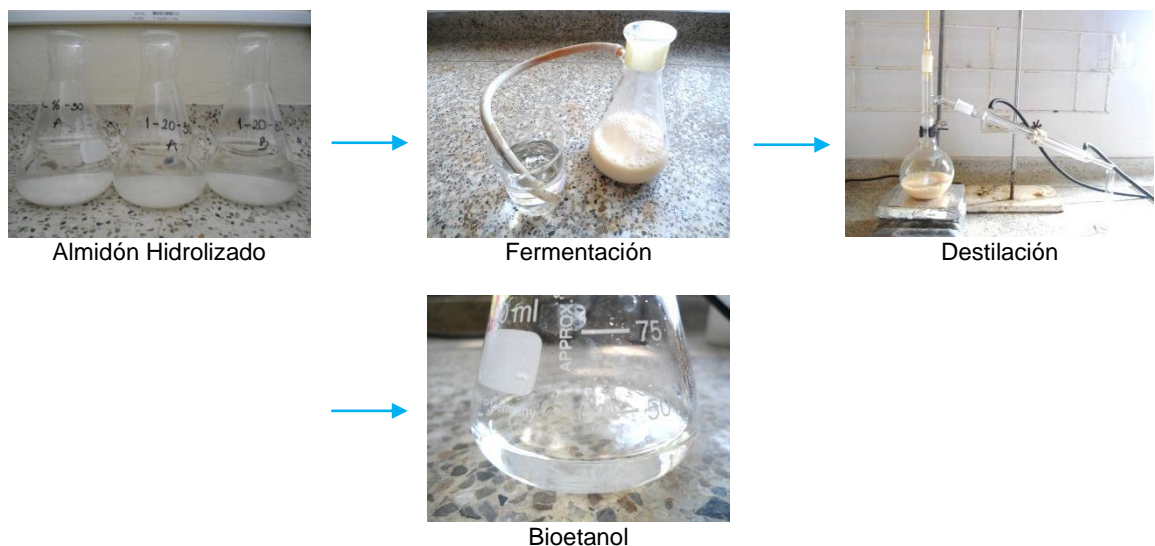
y 30,0 g de tartrato de sodio y potasio, disueltos en 80 mL de solución de NaOH 0,5 N, se agitó y se calentó suavemente. Posteriormente se aforó a 100 mL con agua destilada<sup>[42]</sup>. Se conservó el reactivo DNS refrigerado para posteriores análisis.

A las muestras procedentes de la hidrólisis química con HCl, fue necesario ajustar su pH en un rango entre 5,0 y 7,0 con NaOH, ya que el reactivo DNS no reacciona en medio fuertemente ácido. Posteriormente se adicionan 0,5 mL de reactivo DNS a 0,5 mL de muestra, se agitó en vortex por 30 segundos y se calentó por 5 minutos en baño de agua a 100 °C. Consecutivamente se enfrió en baño de agua hielo por 5 minutos, se adicionaron 5 mL de agua destilada y se agitó por 30 segundos<sup>[44]</sup>. Se determinó la concentración de azúcares reductores por espectrofotometría a la longitud de onda de máxima absorción (540 nm), interpolando la Absorbancia en una curva de calibración elaborada con D-Glucosa.

#### 4.6 OBTENCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE PROCESO DE FERMENTACIÓN

Se sometió a proceso de fermentación (Figura 8) el almidón hidrolizado a azúcares reductores, utilizando un diseño aleatorio multifactorial consistente en 3 concentraciones de almidón hidrolizado a azúcares reductores (25, 50 y 75,0 g L<sup>-1</sup> de almidón) X 3 temperaturas (25, 30 y 35 °C) X 3 tiempos de fermentación (2, 5 y 8 días) X 2 valores de pH (4,0 y 5,0) para un total de 54 tratamientos con dos réplicas por procedimiento. Una vez ajustado el pH de fermentación, se agregó *Saccharomyces cerevisiae* (10 g L<sup>-1</sup>). También se agregó (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O (0,25 g L<sup>-1</sup>) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 g L<sup>-1</sup>) como fuente de micronutrientes<sup>[45]</sup>.

**Figura 8.** Proceso de fermentación y obtención de bioetanol



Fuente: Autor

A partir de la muestra fermentada se obtuvo el alcohol de la mezcla hidroalcohólica por destilación, establecido a partir del punto de ebullición del agua y el etanol, el producto final se sometió a proceso de destilación simple.

## 4.7 DETERMINACIÓN DE ETANOL

### 4.7.1 Prueba con nitrato cérico amoniacal

La prueba colorimétrica del nitrato cérico amoniacal, permite determinar específicamente la presencia de alcoholes de cadena corta en una muestra. Se preparó disolviendo 4,0 g de nitrato de amonio cérico  $[(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$  en 10 mL de  $\text{HNO}_3$  2 N <sup>[34]</sup>, si es necesario se debe calentar con cuidado. En un tubo de ensayo se agregan 5 gotas de nitrato cérico amoniacal y se adicionan 2 gotas de muestra, un cambio rápido de color amarillo a rojo determina la presencia de alcohol.

### 4.7.2 Determinación de alcoholes por cromatografía de gases

El procedimiento propuesto de cromatografía de gases es un método preciso para determinar etanol y es un procedimiento fácilmente adaptable para evaluar fermentos en proceso. Se debe enfatizar que el método es específico para etanol y no para otro tipo de alcoholes que pueden estar presentes en menores cantidades <sup>[46]</sup>. Se utilizó el equipo Cromatógrafo de gases con detector FID y MSD HP6890, marca Hewlett Packard de la Unidad de Análisis Industriales de la Universidad del Cauca.

#### 4.7.2.1 Condiciones de referencia para realizar la cromatografía de gases

Las condiciones de trabajo para el cromatógrafo de gases fueron <sup>[47]</sup>:

Columna cromatográfica	HP-INNOWax polietilenglicol (PEG), 25 m x 0,2 mm x 0,2 $\mu\text{m}$
Detector	FID, 190 °C
Gas de arrastre	Hidrógeno a 1,5 mL min <sup>-1</sup>
Temperaturas	Inyector 170 °C, detector 190 °C, columna 60 °C
Combustible	Hidrógeno y aire

#### 4.7.2.2 Análisis cromatográfico

- **Calibración**

Se preparó soluciones patrón de etanol con concentraciones de 1, 3, 6, 9, 12, 15 y 18% (v/v), en balones volumétricos con adición de 0,1 mL de n-butanol como patrón interno, homogenizando completamente la mezcla. Se inyectaron 0,2  $\mu\text{L}$  de cada solución en el cromatógrafo de gases y se corrieron bajo las condiciones descritas. Se realizó un triplicado del análisis de cada concentración y se implementó el método del patrón interno para determinar las relaciones de área, estas relaciones de áreas son

graficadas en función de la relaciones de masa. Se promediaron las relaciones para cada concentración; para graficar la relación promedio en función de la concentración, obteniendo una relación lineal en este intervalo con todos los puntos cercanos a la línea a partir de la curva de calibración indirecta <sup>[45]</sup>. A partir del cromatograma se obtuvieron las áreas del analito y del patrón interno, se calculó la relación de la [concentración de analito]/[concentración de patrón interno] y la relación del [área de analito]/[área de patrón interno]. Con estos datos se construyó la curva de calibración, representando “[área de analito]/[área de patrón interno]” en función de la “[concentración de analito]/[concentración de patrón interno]”, mediante la ecuación de la recta se calculó la [concentración de analito]/[concentración de patrón interno], correspondiente al [área de analito]/[área de patrón interno].

- **Preparación de muestras**

Se tomó cada muestra y se adicionaron 0,1 mL de n-butanol, se homogenizó y aforó a 10 mL. Posteriormente se inyectaron 0,2 µL por triplicado en el cromatógrafo de gases. El tiempo de análisis fue de 4,0 minutos, con etanol eluyendo a 1,5 minutos y n-butanol (patrón interno) alrededor de 3,0 minutos. La temperatura de la columna se ajustó para obtener aproximadamente estos tiempos de retención. Antes del análisis de las muestras, se inyectaron algunas alícuotas de esta solución patrón y se calculó la relación (altura pico de etanol/altura pico de n-butanol) en cada caso.

#### **4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

En la evaluación de la obtención de bioetanol a partir de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”, se realizó un diseño multifactorial, donde las variables independientes fueron: niveles de concentración de HCl, concentración de almidón, temperatura, pH y tiempo. Las variables dependientes fueron: porcentaje de almidón no hidrolizado, contenido de azúcares reductores y porcentaje de etanol.

El diseño del método comprendió para la evaluación de la hidrólisis ácida del almidón, fueron: 3 concentraciones de ácido X 3 temperaturas X 6 tiempos de incubación para cada determinación, cada tratamiento se efectuará con 2 réplicas teniendo en total 108 unidades experimentales consistentes en recipientes de vidrio, utilizando el método en paralelo.

Para la evaluación de la fermentación de azúcares reductores provenientes de la hidrólisis ácida del almidón, se utilizaron 3 concentraciones de almidón hidrolizado X 3 temperaturas X 3 tiempos de incubación X 2 medios de pH para cada determinación, cada tratamiento se efectuará 2 réplicas obteniendo en total 108 unidades experimentales permanentes en recipientes de vidrio, utilizando el método en paralelo.

Los resultados obtenidos en cada diseño fueron sometidos a tratamientos estadísticos mediante el paquete estadístico SPSS Statistics versión 18.0.

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

Los resultados del análisis proximal de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” (tabla 4) corresponden al promedio de tres réplicas.

**Tabla 4.** Análisis proximal de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

Componente	Resultado
Humedad (%)	78,63 ± 0,22
Cenizas (%)	2,91 ± 0,05
Proteína (%)	3,64 ± 0,07
Grasa (%)	0,20 ± 0,01
Fibra (%)	0,78 ± 0,02
Carbohidratos (%)	13,84 ± 0,19
pH	4,46 ± 0,06
Grados Brix	5,90 ± 0,17

La determinación de la cantidad de humedad en alimentos es uno de los análisis más trascendentes y ampliamente empleados en el proceso y control de alimentos debido a que revela el porcentaje de agua involucrada en su composición, su proporción interviene en el valor nutricional y su estabilidad frente a los procesos deteriorativos. La Oca analizada presenta alta humedad (78,63%), porcentaje comprendido dentro del rango reportado (70-80%)<sup>[3]</sup>, normal en tubérculos andinos ya que estos presentan un elevado contenido de humedad.

El contenido de cenizas se refiere principalmente a la cantidad de minerales en un tubérculo, el porcentaje de cenizas (2,91%) de la Oca analizada es superior al valor reportado en la composición química de la Oca (1%)<sup>[3]</sup> y superior al tubérculo de papa (0,9%)<sup>[48]</sup>, con el cual se compara debido a que la papa es un cultivo utilizado conjuntamente con la Oca en cultivos de diversificación y rotación del suelo. Este valor de cenizas expresa un contenido importante de minerales en el alimento, especialmente de aquellos que no se volatilizan durante el tratamiento, convertidos en óxidos, sulfatos, fosfatos, cloruros y silicatos. De acuerdo con Fennema (2000)<sup>[24]</sup>, la composición de las partes comestibles de las plantas están influenciadas y controladas por la fertilidad del suelo, la genética de la planta y el ambiente donde crece, presentando variabilidad de minerales en los tubérculos.

La proteína en la Oca es el segundo componente de mayor importancia después de los carbohidratos, el nivel de proteína varía y depende de su contenido de aminoácidos esenciales. El valor de proteína para la Oca analizada fue 3,64%, inferior al reportado para este tubérculo (9%)<sup>[3]</sup>, sin embargo, de acuerdo con Palate (2013)<sup>[2]</sup> el nivel de proteína varía notablemente entre las diferentes variedades. Este porcentaje de proteína es inferior al contribuido por alimentos de origen animal, no obstante es superior al aportado tanto por la papa (2,1%)<sup>[39]</sup> como por la mayoría de los cereales, tubérculos y raíces, siendo una fuente importante de proteína, valor que

puede favorecer a la estrategia de seguridad alimentaria de los consumidores. El porcentaje de proteína en los alimentos depende directamente de la variabilidad en el contenido de aminoácidos, el tubérculo de la Oca presenta en mayor proporción lisina (59,08 mg kg<sup>-1</sup>), leucina (53,63 mg kg<sup>-1</sup>) y valina (48,17 mg kg<sup>-1</sup>)<sup>[48]</sup>, contribuyendo en ese aporte importante de proteína.

El contenido de grasa (0,20%) y de fibra (0,78%), son inferiores a los reportados para la Oca (1% grasa y 1% fibra)<sup>[3]</sup>, este tubérculo al igual que la papa presentan bajo porcentaje de grasa, encontrándose generalmente en la piel y constituyendo una ventaja en el consumo de este tipo de alimentos. El porcentaje bajo de fibra y extracto no nitrogenado que se concentra principalmente en la cascara, no se considera como fuente de fibra.

El porcentaje de carbohidratos de la Oca analizada es de 13,84% y se encuentra dentro del rango reportado (11-22%)<sup>[3]</sup>, fuente fundamental de azúcares y carbohidratos de cadena larga, en especial de almidón, reflejando la capacidad de constituirse como un alimento energético, aun cuando en comparación a los cereales y a la papa que aporta cerca del 28,7%<sup>[48]</sup>, el contenido es inferior, probablemente atribuido al grado de maduración de los tubérculos de Oca.

La *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” analizada presenta pH de 4,46 por debajo del valor reportado por Cajamarca (2010)<sup>[6]</sup> para este tubérculo (pH= 4,54 Oca fresca y pH= 5,70 Oca endulzada), el pH varía de acuerdo con la madurez del tubérculo, cuando éste se encuentra fresco la acidez es mayor y se atribuye a la presencia de ácido oxálico, valores bajos de pH indican que la Oca es menos propensa al desarrollo y ataque de microorganismos no deseables<sup>[6]</sup>, National Research Council (1989)<sup>[3]</sup> reporta que este tubérculo puede contener hasta 500 mg kg<sup>-1</sup> de ácido oxálico. A medida que se amplía el tiempo de maduración aumenta el pH, por lo tanto se incrementan los grados Brix debido a la disminución de ácido oxálico y a la transformación de almidones en azúcares, dando sabor dulce y agradable al producto.

La Oca presenta 5,90 grados Brix, que corresponden a la concentración de sacarosa, contenido 2,4 veces inferior al del jugo de la caña de azúcar<sup>[50]</sup>, normalmente utilizada para la obtención de bioetanol, pero que es promisoría en clima frío para este mismo fin. Aun cuando la Oca fue sometida a calentamiento solar para el proceso de deshidratación y endulzado, con pérdida de ácido oxálico menor valor de pH e incremento del contenido de azúcares y grados Brix, es necesario continuar estudios para encontrar el grado óptimo de maduración.

Los datos del análisis proximal fueron sometidos a tratamiento estadístico con el paquete SPSS (versión 18.0), planteando siempre dos hipótesis: Una hipótesis nula (H<sub>0</sub>) y una hipótesis alternativa (H<sub>a</sub>). Inicialmente se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, encontrándose una distribución normal ( $p > 0,05$ ) entre los datos, con homogeneidad de varianzas ( $p > 0,05$ ), permitiendo emplear pruebas paramétricas.

La prueba de ANOVA (tabla 5) indica que no existe diferencia significativa entre las variables del análisis proximal realizado a las muestras de Oca ( $p > 0,05$ ). Aun cuando,

el pH presenta diferencia significativa ( $p=0,00$ ), el rango de variación no incide en los grados Brix ni en el contenido de carbohidratos, reflejando homogeneidad en el grado de maduración de los tubérculos analizados provenientes de diferentes cosechas y resultados precisos en la composición nutricional de la Oca. La prueba de Tukey (tabla 6) para pH revela que existen diferencias significativas en el valor de pH de las diferentes muestras ( $p<0,05$ ), que podrían atribuirse a diferentes grados de maduración, sin embargo no incide en el contenido de carbohidratos ni en ningún parámetro del análisis proximal.

**Tabla 5.** ANOVA de análisis proximal de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

		Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Humedad	Inter-Grupos	,169	2	,084	2,249	,187
	Intra- Grupos	,225	6	,038		
	Total	,394	8			
Cenizas	Inter-Grupos	,001	2	,001	,180	,840
	Intra- Grupos	,019	6	,003		
	Total	,020	8			
Proteína	Inter-Grupos	,022	2	,011	5,351	,056
	Intra- Grupos	,012	6	,002		
	Total	,034	8			
Grasa	Inter-Grupos	,000	2	,000	,586	,586
	Intra- Grupos	,000	6	,000		
	Total	,000	8			
Fibra	Inter-Grupos	,000	2	,000	,337	,726
	Intra- Grupos	,003	6	,000		
	Total	,003	8			
Carbohidratos	Inter-Grupos	,075	2	,038	1,138	,381
	Intra- Grupos	,198	6	,033		
	Total	,273	8			
pH	Inter-Grupos	,027	2	,013	241,800	,000
	Intra- Grupos	,000	6	,000		
	Total	,027	8			
Grados Brix	Inter-Grupos	,240	2	,120	.	.
	Intra- Grupos	,000	6	,000		
	Total	,240	8			

**Tabla 6.** Prueba de Tukey para pH en el análisis proximal de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

	Muestra	N	Subgrupo para alfa = 0.05		
			1	2	3
<b>Tukey HSD<sup>a</sup></b>	3	3	4,39		
	2	3		4,46	
	1	3			4,52
	Sig.		1,000	1,000	1,000

La correlación de Pearson (tabla 7) manifiesta que el contenido de carbohidratos y humedad en las muestras evaluadas correlacionan de manera negativa y altamente significativa, por lo tanto se aprecia que a mayor contenido de humedad en la muestra



menor porcentaje de carbohidratos, lo cual se corrobora con que la pérdida de agua en la Oca genera un incremento en el contenido de carbohidratos y otras sustancias importantes en el tubérculo [6]. Confirmando lo inicialmente señalado en la prueba de ANOVA, el pH y los grados Brix se correlacionan alta y significativamente. Valores superiores en los grados Brix implica elevar el pH, lo cual coincide con que el incremento en el tiempo de maduración aumenta el pH y el nivel de grados Brix, debido a que se genera la pérdida de ácido oxálico y como consecuencia aumenta el contenido de azúcares reductores libres.

**Tabla 7.** Correlación de Pearson de análisis proximal de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

		Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Fibra	Carbohidratos	pH	Brix
Humedad	Correlación de Pearson	1	-,278	-,426	-,499	-,492	-,908**	-,214	-,317
	Sig. (bilateral)		,469	,253	,172	,179	,001	,581	,407
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
Cenizas	Correlación de Pearson	-,278	1	,050	,464	,392	-,013	-,123	-,088
	Sig. (bilateral)	,469		,899	,209	,297	,974	,752	,821
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
Proteína	Correlación de Pearson	-,426	,050	1	,256	,070	,131	-,105	-,073
	Sig. (bilateral)	,253	,899		,506	,859	,736	,787	,852
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
Grasa	Correlación de Pearson	-,499	,464	,256	1	,152	,330	-,318	-,219
	Sig. (bilateral)	,172	,209	,506		,696	,385	,404	,572
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
Fibra	Correlación de Pearson	-,492	,392	,070	,152	1	,352	,063	,121
	Sig. (bilateral)	,179	,297	,859	,696		,353	,871	,756
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
Carbohidratos	Correlación de Pearson	-,908**	-,013	,131	,330	,352	1	,333	,426
	Sig. (bilateral)	,001	,974	,736	,385	,353		,381	,253
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
pH	Correlación de Pearson	-,214	-,123	-,105	-,318	,063	,333	1	,990**
	Sig. (bilateral)	,581	,752	,787	,404	,871	,381		,000
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
Grados Brix	Correlación de Pearson	-,317	-,088	-,073	-,219	,121	,426	,990**	1
	Sig. (bilateral)	,407	,821	,852	,572	,756	,253	,000	
	N	9	9	9	9	9	9	9	9

Del análisis proximal del tubérculo de la *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” se deduce que tiene gran valor nutricional, con bajo contenido de grasa y fibra, porcentaje adecuado de proteína para este tipo de tubérculo y con alta fuente energética debido al alto contenido de carbohidratos.

## 5.2 OBTENCIÓN DE ALMIDÓN

El almidón obtenido a partir del tubérculo de la *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” fue del 6,73% (tabla 8), porcentaje inferior al promedio de extracción reportado (14,18%)<sup>[18]</sup>, asociado al contenido inferior de carbohidratos, reflejando probablemente menor calidad del tubérculo proveniente de deficiencias nutricionales en los suelos de baja fertilidad donde es cultivado. Es importante destacar que de acuerdo con Cajamarca (2010)<sup>[6]</sup> dependiendo de los procesos de endulzamiento a los que pueden ser sometidos los tubérculos el contenido de almidón puede variar, principalmente porque el almidón obtenido de la Oca fresca es mayor en comparación al de la Oca endulzada, esto debido a que el almidón contenido originalmente se convierte en glucosa generado por la hidrólisis ocasionada durante la exposición al sol.

Además, las pérdidas en el afrecho descartado durante el procesamiento, en cada una de las etapas de sedimentación y deshecho de agua pueden influir en el menor rendimiento. Para esta especie es necesario ensayar otros métodos de extracción a fin de mejorar el rendimiento de extracción de almidón. Sin embargo los rendimientos de extracción obtenidos de las diferentes muestras procesadas son muy cercanos entre sí, por lo que se consiguió reproducibilidad de la metodología empleada a esta escala de operación.

**Tabla 8.** Caracterización del almidón de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca”

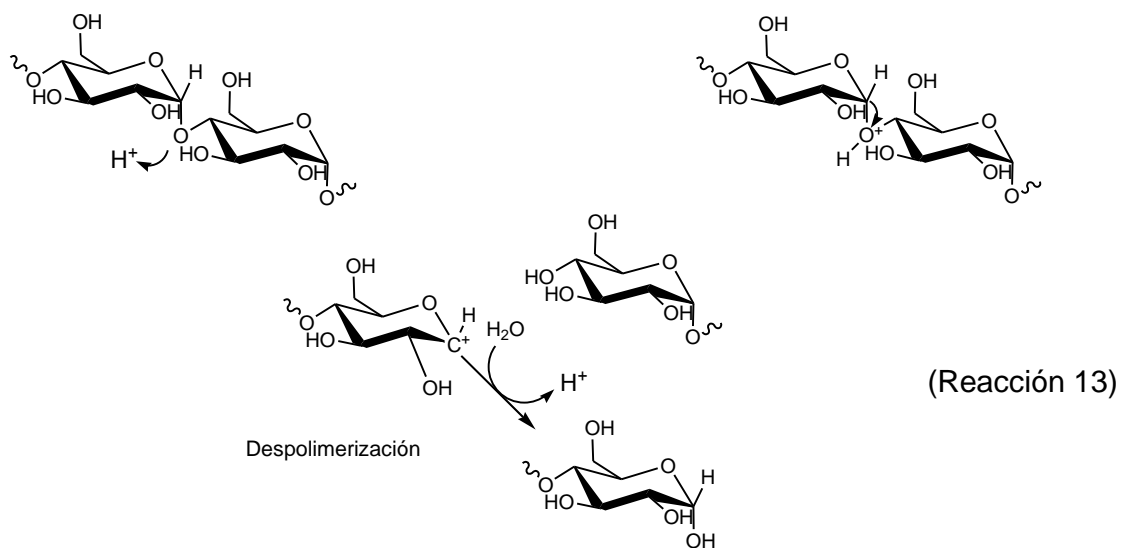
Componente	Resultado
Rendimiento (%)	6,73 ± 0,26
Humedad (%)	13,59 ± 1,03
Cenizas (%)	0,12 ± 0,01
N total (%)	0,18 ± 0,01

Para la caracterización del almidón se realizaron otras determinaciones encontrando los resultados de la tabla 8. El almidón de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” analizado presenta un porcentaje de humedad del 13,59% (86,41% de materia seca), valor cercano al rango recomendado para el contenido de materia seca de los almidones que debe estar entre 87-90%, permitiendo determinar la estabilidad del almidón en el tiempo, almidones con contenidos de materia seca menores de 87% indican probabilidad de contaminación con hongos y otros microorganismos. El porcentaje de cenizas en el almidón fue igual al valor reportado al cual no debe exceder una muestra de almidón 0,12%, indicando un contenido adecuado de minerales en la muestra, descartando cualquier tipo de contaminación, caso que se presenta cuando se presentan altos contenidos de cenizas en la muestra. El porcentaje de nitrógeno total 0,18% está por encima del valor que no debe exceder 0,06%, indicando que el proceso de extracción de almidón afecta la funcionalidad del producto final, como se dijo anteriormente es necesario probar otros métodos de extracción de almidón para mejorar el rendimiento de extracción.

### 5.3 HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

Este procedimiento fue realizado con el fin de establecer un método adecuado para la hidrólisis de almidón de Oca. El porcentaje de almidón no hidrolizado, es decir el almidón que no reacciona durante el tratamiento, se consideró teniendo en cuenta una concentración de almidón constante con las variables: temperatura, concentración de HCl y tiempo de hidrólisis con dos réplicas en cada caso, de acuerdo a la metodología establecida en 4.4.

Durante la hidrólisis ácida los polisacáridos se despolimerizan a bajos valores de pH y altas temperaturas, el enlace glucosídico se rompe creando un carbocatión, el cual es capaz de reaccionar rápidamente con el agua, por la formación de azúcares reductores, según la reacción 13. La mayoría de los componentes de la hidrólisis ácida son estables en los ácidos diluidos y temperaturas controladas. Los azúcares reductores, producto de la hidrólisis del almidón, al ser sometidos a altas temperaturas puede generar la oxidación de los azúcares, proceso también conocido como caramelización (temperatura de caramelización de la glucosa 160 °C). El calor influye en el rompimiento de los enlaces químicos de los átomos de las moléculas del azúcar reductor, formando distintos fragmentos de moléculas que reaccionan a su vez entre sí por efecto del calor y por la presencia del oxígeno del aire. Valores bajos de pH aumentan la velocidad de reacción, causando que el proceso de caramelización ocurra más rápido y se dé a menor temperatura.



A continuación se presentan los resultados de la determinación del porcentaje de almidón no hidrolizado (tabla 9), en las condiciones establecidas: almidón (25 g L<sup>-1</sup>), 3 concentraciones de HCl (1, 2 y 3 N), 3 temperaturas (25, 30 y 35 °C) y 6 intervalos de tiempo (2, 4, 8, 12, 16 y 20 días), se presenta la hidrólisis ácida del almidón en función de la temperatura y el tiempo, el porcentaje de almidón no hidrolizado hace referencia al almidón que no reacciona durante la hidrólisis ácida (Ecuación 7) y a su vez

disminuye con el incremento de la temperatura, la concentración de ácido y el tiempo de reacción.

**Tabla 9.** Porcentaje de almidón no hidrolizado

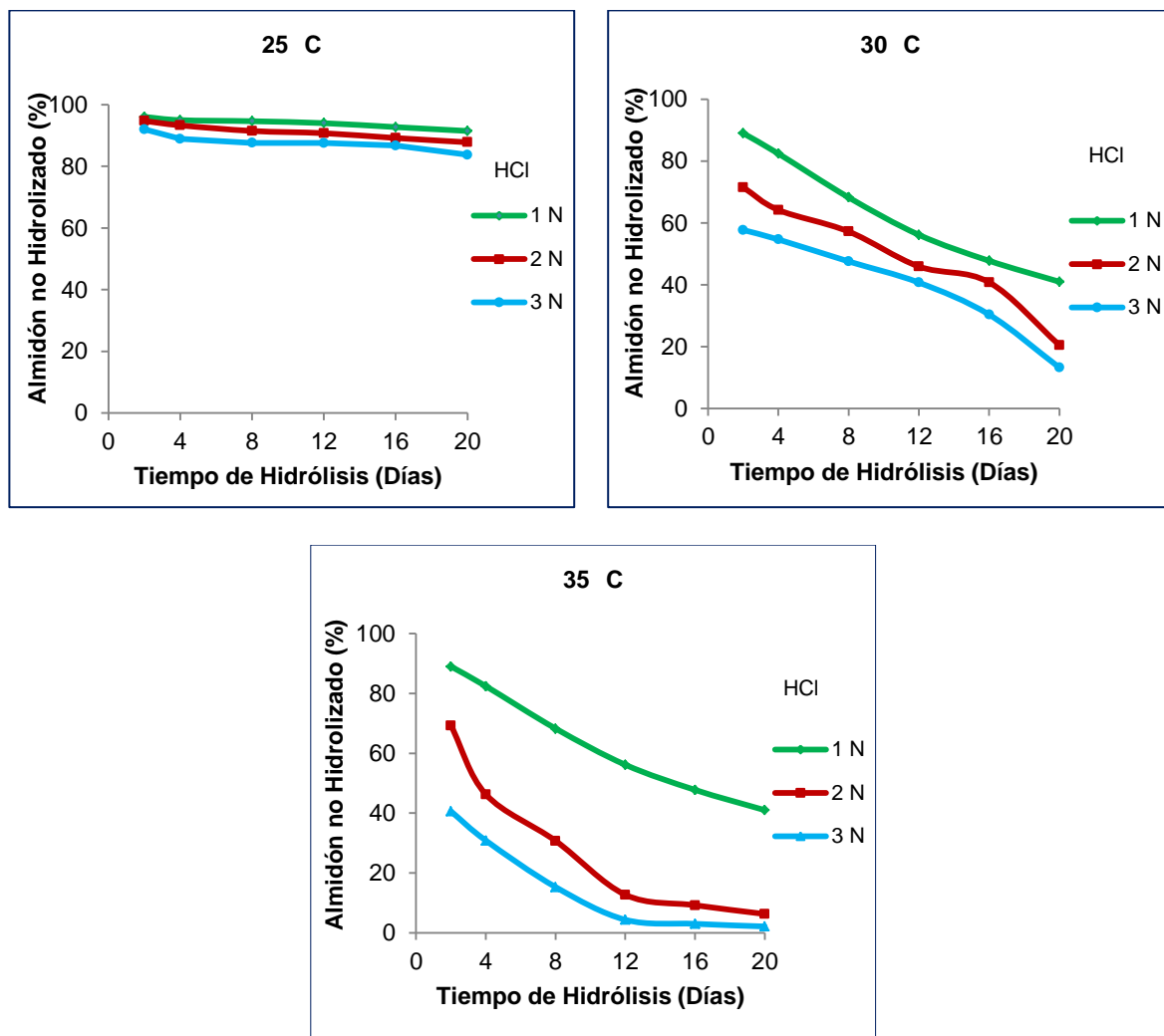
Tiempo de hidrólisis (Días)	Almidón no Hidrolizado (%)								
	Temperatura (°C)								
	25			30			35		
	Concentración de HCl (N)								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2	96,35	94,45	91,66	88,85	71,18	57,85	81,68	68,78	40,88
	95,70	94,95	92,34	89,13	71,87	57,57	82,30	69,78	40,27
4	93,83	92,82	89,44	82,55	64,20	54,60	68,80	45,60	31,18
	96,11	93,73	88,34	82,30	64,19	54,70	67,95	46,92	30,45
8	94,63	91,33	89,00	67,98	57,34	47,52	67,76	24,25	15,25
	94,62	91,59	86,21	68,54	57,10	47,60	65,10	25,18	15,30
12	93,33	91,33	87,16	55,66	45,62	40,82	52,64	12,96	4,30
	94,63	90,12	87,89	56,65	46,21	40,63	53,16	12,43	4,37
16	93,10	88,33	86,73	47,55	40,73	30,37	45,22	9,32	3,03
	92,32	90,01	86,70	47,95	40,85	30,35	45,92	9,04	2,91
20	92,95	87,14	83,64	41,11	20,69	13,28	39,25	6,27	2,12
	89,95	88,44	83,77	40,85	20,27	13,17	38,13	6,24	2,06

En la figura 9 se muestra la hidrólisis ácida de almidón de Oca en función de la temperatura y del tiempo a diferentes concentraciones de HCl. Durante los primeros días de reacción, ocurre la fase con menor velocidad de reacción y es consecuencia de la hidrólisis propia a la región amorfa del almidón, correspondiente a la periferia del polímero. A mayor tiempo de reacción en medio ácido el proceso de hidrólisis presenta menor velocidad, con elevada alteración química de la composición del almidón perteneciente principalmente a la hidrólisis de la región cristalina del almidón de acuerdo con Shujun Wang y colaboradores (2008) <sup>[41]</sup>. La interacción entre el almidón y las variables es fundamental durante el proceso para obtener un rendimiento adecuado en la hidrólisis ácida del almidón hasta obtener azúcares reductores libres.

Las gráficas de la figura 9, representan la hidrólisis realizada en función del porcentaje de almidón no hidrolizado a 25, 30 y 35 °C de temperatura durante un intervalo de 20 días de reacción, se observa que a medida que aumenta la temperatura y la concentración de ácido el porcentaje de almidón no hidrolizado disminuye con el incremento en el tiempo de reacción. Siendo 25 °C una temperatura baja para obtener resultados considerables en la conversión de almidón a azúcares reductores durante el proceso de hidrólisis, independientemente de la concentración de HCl y del tiempo. Sin embargo, con 30 y 35 °C el proceso demuestra un incremento considerable durante la reacción. En cuanto al tiempo y la concentración de ácido, las curvas indican que independientemente de la temperatura, a mayor tiempo y concentración de ácido disminuye la cantidad de almidón no hidrolizado. A 35 °C de temperatura los primeros días la velocidad de reacción es mayor, modificando la concentración del almidón rápidamente durante la hidrólisis, pero a partir de los 12 días de hidrólisis se

presenta una disminución en la velocidad de reacción para las concentraciones de HCl 2 y 3 N, porque se alcanza el equilibrio de la reacción.

**Figura 9.** Curvas de hidrólisis ácida de almidón de Oca en función del porcentaje de almidón no hidrolizado, temperatura y tiempo



A continuación se presenta el análisis estadístico de cada variable involucrada durante el proceso de hidrólisis ácida de almidón de Oca, considerando inicialmente la variable concentración de ácido. Así, la prueba de normalidad para los resultados de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la concentración de HCl, indica que estos datos no se ajustan a la normalidad ( $p < 0,05$ ), por lo tanto se aplican pruebas no paramétricas.

La prueba Kruskal Wallis (tabla 10), demuestra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la concentración de HCl. La prueba de U de Mann-Whitey (tabla 11), revela que el incremento en la concentración

del ácido disminuye el porcentaje de almidón no hidrolizado, siendo significativamente superior el contenido de almidón no hidrolizado cuando la concentración es 1 N. El porcentaje de hidrólisis es superior con las concentraciones de HCl 2 y 3 N sin existir diferencia entre ellos, demostrando que la concentración de 2 N es suficientemente adecuada.

**Tabla 10.** Prueba de Kruskal Wallis de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la concentración de HCl

Almidón no Hidrolizado (%)	
Chi-Cuadrado	12,621
gl	2
Sig. Asintótica	,002

Variable Agrupada: Concentración HCl (N)

**Tabla 11.** Prueba U de Mann-Whitney de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la concentración de HCl

	Concentración HCl (N)	N	Rango promedio	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
Almidón no Hidrolizado (%)	1	36	41,89	454,000	,029
	2	36	31,11		
	1	36	45,06	340,000	,001
	3	36	27,94		
	2	36	40,03	521,000	,153
	3	36	32,97		

A continuación se analizan los datos de porcentaje de almidón no hidrolizado se consideran en función de la variable temperatura, estos datos se ajustan a la normalidad ( $p>0,05$ ), por lo tanto se aplicaron pruebas paramétricas. La prueba de ANOVA (tabla 12) manifiesta diferencia significativa ( $p<0,05$ ) entre los datos de porcentaje de almidón no hidrolizado.

**Tabla 12.** ANOVA de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la temperatura

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-Grupos	60608,408	2	30304,204	86,323	,000
Intra- Grupos	36860,915	105	351,056		
Total	97469,322	107			

La prueba de Tukey (tabla 13) muestra que a una temperatura de 25 °C se presenta el mayor porcentaje de almidón no hidrolizado, por lo tanto no hay una reacción completa de la muestra. Mientras que a 30 y 35 °C se presentan menores porcentajes de almidón no hidrolizado, siendo 35 °C la temperatura donde se presenta menor porcentaje de almidón no hidrolizado con superior rendimiento de la hidrólisis. Se deduce que el incremento de la temperatura incrementa el rendimiento en el proceso de hidrólisis, probablemente a temperaturas superiores se genera mayor rompimiento

de los enlaces glucosídicos. Además, incrementar la temperatura provoca un incremento en la energía cinética de las moléculas, lo que hace que sea mayor el número de moléculas que alcanza la energía de activación.

**Tabla 13.** Prueba Tukey de porcentaje de almidón no hidrolizado en función de la temperatura

		Almidón no Hidrolizado (%)			
		N	Subgrupo para alfa = 0.05		
Temperatura (°C)	1		2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>	35	36	34,356		
	30	36		51,606	
	25	36			90,962
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Finalmente se considera el tiempo para los porcentaje de almidón no hidrolizado como variable independiente, la prueba de normalidad no muestra ajuste a una distribución normal ( $p < 0,05$ ), por lo tanto se emplean pruebas no paramétricas. La prueba de Kruskal Wallis (tabla 14) expone la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para el porcentaje de almidón no hidrolizado en función del tiempo de hidrólisis.

**Tabla 14.** Prueba de Kruskal Wallis de porcentaje de almidón no hidrolizado en función del tiempo

Almidón no Hidrolizado (%)	
Chi-Cuadrado	16,452
gl	5
Sig. Asintótica	,006

Variable Agrupada: Tiempo (Días)

La prueba de U de Mann-Whitey (tabla 15), muestra que el porcentaje de almidón no hidrolizado es superior con un tiempo de hidrólisis de 2 y 4 días, indicando que el porcentaje de almidón sin reaccionar es significativamente superior en estos dos intervalos de tiempo, esto se debe a que no se da un rompimiento adecuado de la estructura principal del almidón, promoviendo la baja producción de cadenas cortas de oligosacáridos durante este intervalo de tiempo. El porcentaje de almidón hidrolizado es significativamente superior ( $p > 0,05$ ) con un tiempo de hidrólisis de 8, 12, 16 y 20 días de reacción, sin existir diferencia entre los porcentajes de hidrólisis durante los intervalos de tiempo de reacción con el ácido, demostrando que 8 días es suficiente para llevar a cabo una hidrólisis adecuada. Sin embargo, la figura 9 muestra que con 35 °C de temperatura y 12 días de reacción no hay una diferencia significativa en la conversión de almidón a azúcares reductores durante la reacción con concentraciones de HCl 2 y 3 N, por lo que 12 días sería un tiempo óptimo para llevar a cabo una hidrólisis adecuada. Aún cuando estadísticamente no existe diferencia significativa entre el porcentaje de almidón no hidrolizado entre 8 y 12 días de tiempo de reacción, el rendimiento es superior a los 12 días de reacción.

**Tabla 15.** Prueba U de Mann-Whitney de porcentaje de almidón no hidrolizado en función del tiempo

	Tiempo de Hidrólisis (Días)	N	Rango promedio	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
	<b>Almidón no Hidrolizado (%)</b>	2	18	369	126,000
4		18	297		
2		18	396	99,000	0,046
8		18	270		
2		18	408	87,000	0,018
12		18	258		
2		18	416	79,000	0,009
16		18	250		
2		18	426	69,000	0,003
20		18	240		
4		18	354	141,000	0,506
8		18	312		
4		18	381	114,000	0,129
12		18	285		
4		18	399	96,000	0,037
16		18	267		
4		18	409	86,000	0,016
20		18	257		
8		18	367	128,000	0,282
12		18	299		
8	18	375	120,000	0,184	
16	18	291			
8	18	395	100,000	0,05	
20	18	271			
12	18	359	136,000	0,411	
16	18	307			
12	18	375	120,000	0,184	
20	18	291			
16	18	362	133,000	0,359	
20	18	304			

La correlación de Pearson (tabla 16) indica que el porcentaje de almidón no hidrolizado a partir de una concentración constante de almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" y las condiciones de los parámetros establecidos para el proceso de hidrólisis: concentración de HCl, temperatura y tiempo evaluados correlacionan de manera negativa y altamente significativa, por esta razón bajo mínimas condiciones experimentales de estos parámetros, se hidroliza la menor cantidad de almidón, siendo la temperatura la que presenta mayor influencia sobre el proceso de hidrólisis. De esta manera a medida que aumentan los valores de las variables experimentales disminuye el porcentaje de almidón no hidrolizado.

En la hidrólisis ácida del almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" se da una hidrólisis relativamente rápida seguida por un periodo de velocidad lenta, teniendo en cuenta que la concentración de almidón es constante, se deduce que las mejores condiciones para que se promueva la máxima hidrólisis de almidón son: concentración de HCl 2 N,



35 °C y 12 días, con aproximadamente 12,70% de almidón no hidrolizado, con un rendimiento de la hidrólisis de 87,30%.

**Tabla 16.** Correlación de Pearson de porcentaje de almidón no hidrolizado

		Concentración HCl (N)	Temperatura (°C)	Tiempo (Días)
<b>Almidón no</b>	Correlación de Pearson	-,329**	-,769**	-,383**
<b>Hidrolizado</b>	Sig. (bilateral)	,001	,000	,000
<b>(%)</b>	N	108	108	108

## 5.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

### 5.4.1 Implementación y estandarización del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis

Inicialmente se realizó un barrido en el rango de 400 a 600 nm con soluciones de 0,1 y 0,2 g L<sup>-1</sup> de D-Glucosa para seleccionar la longitud de onda de máxima absorción. Esta longitud de onda fue obtenida por interpolación de la curva obtenida del espectro de absorción del complejo y corresponde a 540 nm, longitud de onda empleada para la lectura de las soluciones patrón de D-Glucosa a diferentes concentraciones en presencia de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Se implementó el método expuesto en la metodología 4.5.1, preparando curvas de calibración en el rango de 0,1 a 1,4 g L<sup>-1</sup> de D-Glucosa a partir de una solución estándar de 5 g L<sup>-1</sup>, teniendo como blanco de reactivos agua destilada, con lecturas de absorbancia en la longitud de onda seleccionada.

Se valoró la linealidad instrumental, en términos de repetibilidad y precisión intermedia, además se determinaron los límites críticos. Se realizó un tratamiento estadístico aplicando pruebas como Shapiro-Wilk y análisis de varianza (ANOVA) empleando el software estadístico SPSS (Versión 18.0).

#### 5.4.1.1 Linealidad instrumental del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis

Se evaluaron durante 5 días diferentes 8 niveles de concentración de D-Glucosa que reacciona con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para formar una solución colorimétrica. Preparando tres curvas de calibración por día, las cuales se sometieron al método descrito en la metodología 4.5.1, los resultados de las absorbancias en función de la concentración se muestran en la tabla 17.

Se deduce la normalidad de los datos obtenidos para las absorbancias de D-Glucosa en función del día y del nivel de concentración, utilizando la prueba de Shapiro-Wilk,

en la que se tiene como hipótesis nula ( $H_0$ ) “los datos obtenidos provienen de una población normal”, para aplicar pruebas paramétricas en caso de que los datos sean normales o pruebas no paramétricas si los datos no se ajusten a la normalidad.

**Tabla 17.** Evaluación de la linealidad instrumental del método para absorbancia de D-Glucosa

Nivel de Concentración D-Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	Absorbancia					
	Curva	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
0,1	1	0,038	0,038	0,038	0,039	0,039
	2	0,036	0,039	0,037	0,040	0,038
	3	0,038	0,038	0,036	0,040	0,040
0,2	1	0,094	0,094	0,092	0,092	0,093
	2	0,093	0,094	0,093	0,094	0,093
	3	0,092	0,093	0,093	0,094	0,092
0,4	1	0,205	0,205	0,208	0,205	0,204
	2	0,207	0,204	0,207	0,207	0,206
	3	0,205	0,206	0,204	0,201	0,206
0,6	1	0,293	0,293	0,297	0,298	0,299
	2	0,293	0,296	0,294	0,301	0,301
	3	0,297	0,299	0,293	0,296	0,297
0,8	1	0,433	0,433	0,437	0,432	0,433
	2	0,433	0,435	0,433	0,432	0,431
	3	0,432	0,431	0,430	0,434	0,435
1,0	1	0,525	0,525	0,524	0,528	0,530
	2	0,528	0,530	0,528	0,529	0,526
	3	0,528	0,529	0,522	0,548	0,527
1,2	1	0,632	0,632	0,634	0,631	0,629
	2	0,633	0,629	0,633	0,632	0,627
	3	0,631	0,631	0,626	0,626	0,630
1,4	1	0,738	0,738	0,737	0,738	0,738
	2	0,736	0,737	0,737	0,737	0,738
	3	0,738	0,749	0,738	0,731	0,736

Considerando la curva de D-Glucosa en función del día de evaluación, presenta una distribución normal ( $p > 0,05$ ) según la prueba de normalidad para los datos de absorbancia, por esta razón se aplican pruebas paramétricas. La prueba de ANOVA (tabla 18) para valores de absorbancia en función del día de evaluación para las diferentes concentraciones de D-Glucosa demuestra que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ), revelando reproducibilidad en los valores de absorbancia de cada concentración en los diferentes días del ensayo, de esta manera se deduce que el método es reproducible.

**Tabla 18.** ANOVA para absorbancia de D-Glucosa en función del día

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-Grupos	,000	4	,000	,002	1,000
Intra- Grupos	6,718	115	,058		
Total	6,719	119			

La evaluación de la curva de D-Glucosa en función de la concentración, muestra que según la prueba de normalidad para los datos de absorbancia presenta una distribución normal ( $p>0,05$ ), razón por la cual se aplican pruebas paramétricas. La prueba de ANOVA (Tabla 19) manifiesta que existe diferencia significativa ( $p<0,05$ ) para los datos de absorbancia en función de la concentración.

**Tabla 19.** ANOVA para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-Grupos	6,706	7	,958	8598,183	,000
Intra- Grupos	,012	112	,000		
Total	6,719	119			

La prueba de Tukey (tabla 20) revela la diferencia significativa entre absorbancias y concentraciones de cada patrón de D-Glucosa ( $p>0,05$ ), demostrando que el incremento en la concentración produce proporcionalmente incremento en el valor de absorbancia.

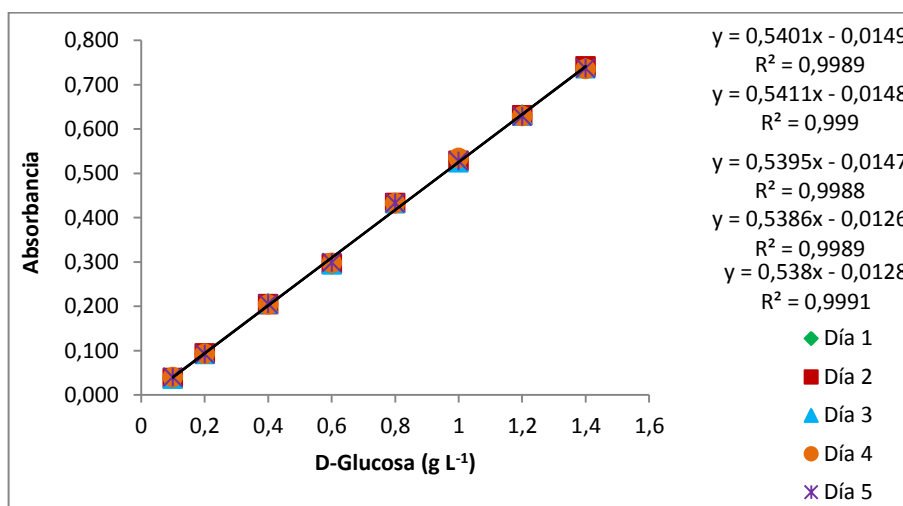
**Tabla 20.** Prueba de Tukey para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración

	Concentración de D-Glucosa (g/L)	N	Subgrupo para alfa = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Tukey HSD <sup>a</sup>	0,1	15	,039								
	0,2	15		,100							
	0,4	15			,205						
	0,6	15				,296					
	0,8	15					,433				
	1,0	15						,528			
	1,2	15							,630		
	1,4	15								,734	
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

La tendencia de los datos se evaluó a través de un gráfico relacionando la absorbancia y los patrones de D-Glucosa en  $g L^{-1}$  (Figura 10), donde se observa la tendencia lineal de los resultados en cada uno de los días de evaluación. Se aplicó el método de mínimos cuadrados para hallar una ecuación lineal dependiendo de la cantidad de D-Glucosa y la absorbancia.

A partir de los datos de las ecuaciones de la recta de cada curva, se calcularon los valores para la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y sus pertinentes desviaciones estándar (tabla 21). El coeficiente de correlación se evaluó estadísticamente planteando la hipótesis nula: "No existe correlación entre x e y". La prueba de correlación de Pearson (tabla 22) es significativa (Sig. 0,000), rechazando la hipótesis nula y se concluye que existe una correlación altamente significativa entre la cantidad de D-Glucosa ( $g L^{-1}$ ) y la respuesta brindada por el equipo (absorbancia).

**Figura 10.** Curva de calibración de D-Glucosa bajo condiciones de precisión intermedia para determinación de azúcares reductores por UV-Vis



**Tabla 21.** Evaluación de la linealidad instrumental del método para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración

Parámetro	Símbolo	Valor
Coefficiente de Correlación	r	0,999
Pendiente	b	0,5395
Intercepto	a	-0,0140
Desviación Estándar pendiente	Sb	0,0012
Desviación Estándar intercepto	Sa	0,0012

La evaluación estadística de la pendiente y el intercepto plantea las siguientes hipótesis: Para la pendiente se tiene que  $H_0$ : “b no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa ( $p < 0,05$ ). Mientras que para el intercepto se tiene que  $H_0$ : “a no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 22.** Correlación de Pearson para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración

		Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	Absorbancia
Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	Correlación de Pearson	1	,999**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	120	120
Absorbancia	Correlación de Pearson	,999**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	120	120

La tabla 23 indica que la significancia estadística para la pendiente y el intercepto son menores a 0,05 rechazando las hipótesis nulas y se concluye que la pendiente y el intercepto son significativamente diferentes de cero.

**Tabla 23.** Evaluación estadística de la pendiente y el intercepto para absorbancia de D-Glucosa en función de la concentración

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	Intercepto	-,011	,002		-5,038	,000	-,016	-,007
	Pendiente	,537	,003	,999	200,274	,000	,532	,542

Por medio de la prueba de ANOVA (tabla 24) se comprueba que la regresión de la curva de calibración, estableciendo como hipótesis nula: “No hay regresión significativa en la curva de calibración ( $R^2=0$ )”, y como hipótesis alternativa “Hay regresión significativa en la curva de calibración ( $R^2\neq 0$ )”, la significancia es inferior de 0,05 por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se admite la hipótesis alternativa, cumpliendo que existe regresión significativa en la curva de calibración.

**Tabla 24.** ANOVA de absorbancia en función de la concentración de Glucosa

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	6,699	1	6,699	40109,655	,000
	Residual	,020	118	,000		
	Total	6,719	119			

Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad permiten concluir que el método instrumental empleado es lineal en el rango entre 0,1 y 1,4 g L<sup>-1</sup> de D-Glucosa, con un alto coeficiente de correlación de 0,999.

#### 5.4.1.2 Precisión instrumental del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis

La precisión instrumental se calculó bajo condiciones de repetibilidad (el mismo día) y precisión intermedia (días diferentes). En condiciones de repetibilidad se prepararon 3 curvas de calibración con 8 niveles de concentración y un blanco, las cuales se analizaron el mismo día bajo las mismas condiciones (tabla 15). Para el ensayo de precisión intermedia se prepararon curvas de calibración durante 3 días diferentes, tres curvas de calibración por día. Se calculó el %C.V. por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Como se observa en la tabla 25 los %C.V. son inferiores al 5%, tanto en repetibilidad como en precisión intermedia, indicando que el método sería exacto y preciso para niveles iguales o superiores a 0,1 g L<sup>-1</sup> de D-glucosa, con alta reproducibilidad del método y alta precisión instrumental.

**Tabla 25.** Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia para la determinación de azúcares reductores

Nivel	Repetibilidad		Precisión Intermedia	
	Desviación Estándar	%C.V.	Desviación Estándar	%C.V.
1	0,001	2,703	0,001	2,564
2	0,001	0,623	0,001	0,623
3	0,002	1,009	0,001	0,562
4	0,002	0,706	0,002	0,669
5	0,004	0,810	0,002	0,462
6	0,003	0,582	0,002	0,395
7	0,004	0,691	0,002	0,243
8	0,001	0,078	0,001	0,157

#### 5.4.1.3 Límites Críticos del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis

Los límites de detección y cuantificación se determinaron teóricamente aplicando el método sugerido por la IUPAC <sup>[43], [51]</sup>. Se prepararon 3 curvas de calibración las cuales se analizaron el mismo día, bajo las mismas condiciones (tabla 26). Con los resultados logrados, se elaboró un gráfico que relaciona la absorbancia versus la concentración, el cual se presenta en la figura 11.

Se calculó mediante el método de mínimos cuadrados las ecuaciones de las líneas de tendencia en cada curva, obteniendo los interceptos y las pendientes para cada una de las tres curvas de calibración, con estos datos se determinó la desviación estándar de los interceptos ( $S_a$ ) y el promedio de las pendientes ( $m_{\text{promedio}}$ ). Posteriormente se aplicaron las ecuaciones 8 y 9 para establecer teóricamente los valores para calcular el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) (tabla 27).

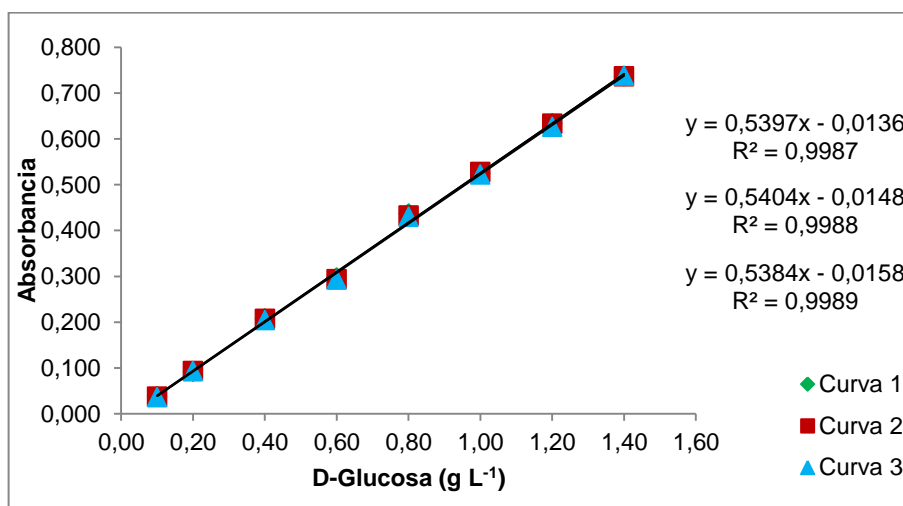
**Tabla 26.** Curvas de calibración bajo condiciones de repetibilidad para determinación de azúcares reductores

Nivel de concentración (g L <sup>-1</sup> )	Absorbancia de azúcares reductores por el método del DNS por UV-Vis		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,1 (N1)	0,038	0,037	0,036
0,2 (N2)	0,092	0,093	0,093
0,4 (N3)	0,208	0,207	0,204
0,6 (N4)	0,297	0,294	0,293
0,8 (N5)	0,437	0,433	0,430
1,0 (N6)	0,524	0,528	0,522
1,2 (N7)	0,634	0,633	0,626
1,4 (N8)	0,737	0,737	0,738

y

Ecuaciones  
8 y 9

**Figura 11.** Curva de calibración de D-Glucosa bajo condiciones de repetibilidad para determinación de azúcares reductores por UV-Vis



**Tabla 27.** Cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para determinación de azúcares reductores

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3	$S_a$	Promedio m	LOD (g L <sup>-1</sup> )	LOQ (g L <sup>-1</sup> )
<b>Pendiente (m)</b>	0,5397	0,5404	0,5384				
<b>Intercepto (a)</b>	-0,0136	-0,0148	-0,0158	0,0011	0,5395	0,006	0,020

Se deduce que el nivel de menor concentración en la curva de calibración (0,1 g L<sup>-1</sup>) del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis utilizado en las curvas de calibración evaluadas es superior al límite de cuantificación.

#### 5.4.1.4 Validación del método espectrofotométrico del DNS para determinación de azúcares reductores por UV-Vis

En la validación de la metodología se valoraron los parámetros linealidad, exactitud, precisión y límites críticos. Para la evaluación estadística de estos parámetros empleando el software estadístico SPSS (Versión 18.0). La linealidad, propia a la linealidad instrumental, por lo que se emplearon curvas de calibración sometidas a la metodología planteada. Para evaluar la precisión y la exactitud, se prepararon curvas de calibración durante 5 días diferentes, tres curvas de calibración por día, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14. Posteriormente se estableció la precisión y la exactitud por nivel de concentración en las curvas de calibración, en términos de porcentaje de recuperación (%R) los cuales fueron calculados aplicando la ecuación 10, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 28.

**Tabla 28.** Porcentajes de Recuperación de concentración de D-Glucosa en términos de Precisión Intermedia

Nivel	Precisión intermedia		
	DESV. EST	% C.V.	%R
N1	2,194	2,265	96,85
N2	0,999	1,006	99,22
N3	0,432	0,425	101,64
N4	0,281	0,293	95,91
N5	0,243	0,235	103,56
N6	0,229	0,228	100,56
N7	0,229	0,230	99,54
N8	0,234	0,236	99,53

Los %C.V. para concentraciones de D-Glucosa superiores a  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  son inferiores al 0,5% y presentan un ligero incremento para niveles inferiores a esta concentración, demostrando que entre más bajo es el nivel de concentración la variabilidad en la respuesta es superior. En cuanto a los porcentajes de recuperación la prueba de ANOVA (tabla 29) demuestra diferencia significativa en los valores y la prueba de Tukey (tabla 30) confirma que son superiores en los niveles 3 y 5, sin embargo los valores están comprendidos en el rango adecuado (95-105%)<sup>[52]</sup>.

**Tabla 29.** ANOVA para porcentaje de recuperación en función del nivel de concentración de D-Glucosa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	631,390	7	90,199	114,619	,000
Intra-grupos	88,138	112	,787		
Total	719,528	119			

**Tabla 30.** Prueba de Tukey para porcentaje de recuperación en función del nivel de concentración de D-Glucosa

	Nivel de Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a</sup>	4	15	95,914				
	1	15	96,847				
	2	15		99,216			
	8	15		99,534			
	7	15		99,543			
	6	15			100,555		
	3	15				101,636	
	5	15					103,564
	Sig.			,087	,972	1,000	1,000



Considerando las pruebas de ANOVA y Tukey en función del tiempo (tablas 31 y 32) se aprecia que no existe diferencia significativa, por esta razón fue posible calcular un %R<sub>Prom</sub> (tabla 33) y un %CV para la metodología global.

**Tabla 31.** ANOVA para porcentaje de recuperación en función del día de evaluación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17,473	7	4,368	,716	,583
Intra-grupos	702,055	112	6,105		
Total	719,528	119			

**Tabla 32.** Prueba de Tukey para porcentaje de recuperación en función del día de evaluación

	Día de Evaluación	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
Tukey HSD <sup>a</sup>	4	24	99,035
	5	24	99,282
	2	24	99,722
	1	24	99,971
	3	24	99,995
	Sig.		,664

**Tabla 33.** Exactitud y precisión para la metodología global en la determinación de azúcares reductores

	Nivel								%R Promedio	S	%C.V.
	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4			
% R	96,85	99,22	101,64	95,91	103,56	100,56	99,54	99,53	99,60	2,452	2,462

Se permite deducir un método exacto y preciso en la determinación de azúcares reductores por el método espectrofotométrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por UV-Vis con un %R para la metodología global del 99,60% con base en la media y un %CV inferior de 5%.

#### 5.4.2 Determinación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis del almidón por el método espectrofotométrico del DNS por UV-VIS

Este procedimiento fue realizado con el fin de determinar mediante el método espectrofotométrico del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) el contenido de azúcares reductores provenientes del almidón hidrolizado. Para la concentración de almidón, concentración de HCl, temperatura y tiempo de hidrólisis establecidos, con dos réplicas de acuerdo con la metodología establecida en 4.5.2. Los resultados obtenidos para los azúcares reductores (g kg<sup>-1</sup>) se muestran a continuación (tabla 34).

A partir de la hidrólisis del almidón se genera el rompimiento de los enlaces que forman la estructura principal de este carbohidrato de cadena larga, al fragmentar los enlaces glucosídicos durante el periodo de hidrólisis liberando los azúcares reductores

más solubles en agua que el mismo almidón. Las condiciones establecidas para la hidrólisis del almidón fueron concentración de almidón ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ), temperaturas (25, 30 y  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ), concentración de HCl (1, 2 y 3 N) y tiempo (2, 4, 8, 12, 16 y 20 días), como se estableció anteriormente.

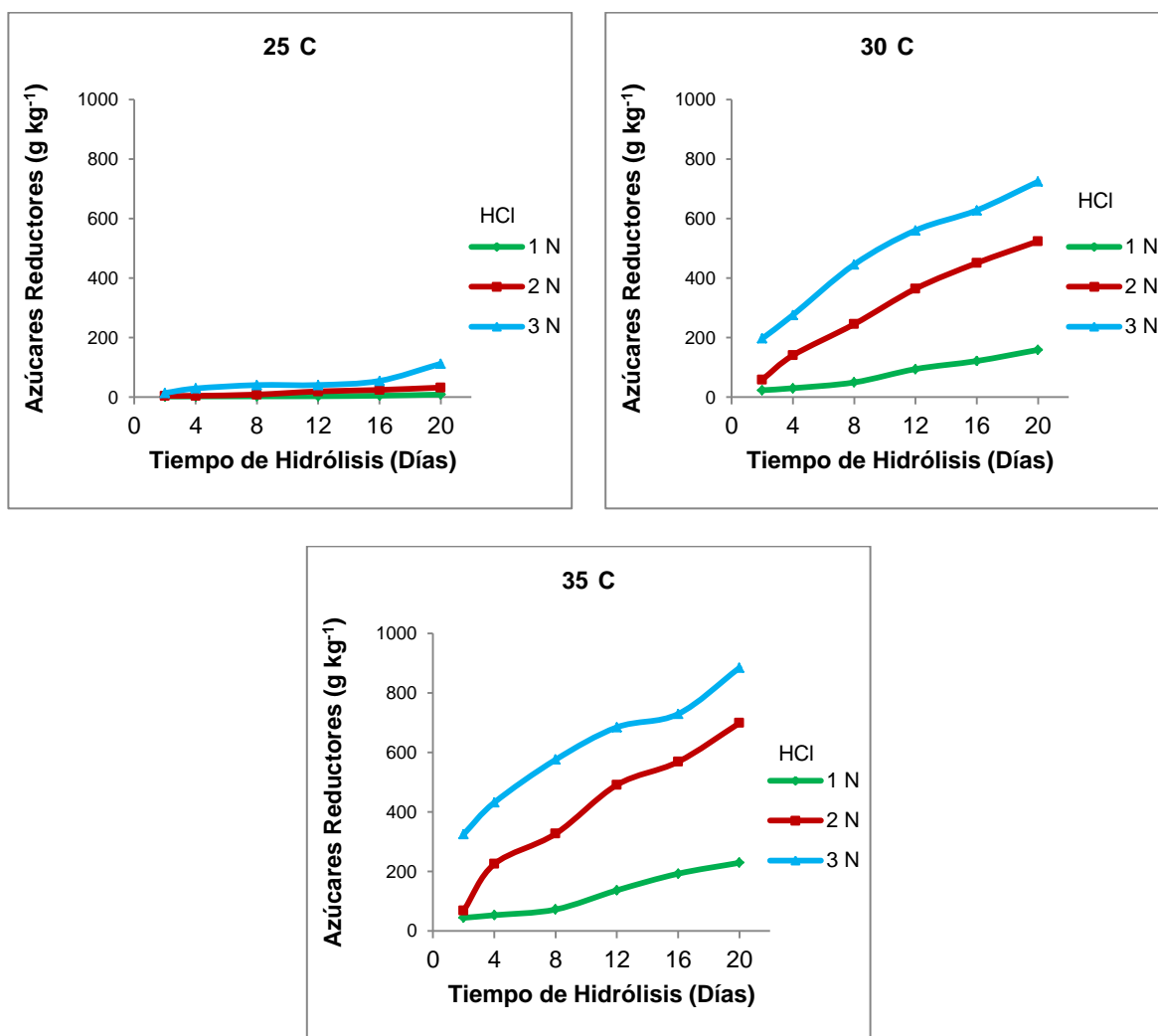
**Tabla 34.** Azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de concentración de ácido, temperatura y tiempo de hidrólisis

Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado ( $\text{g kg}^{-1}$ )									
Tiempo de hidrólisis (Días)	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )								
	25			30			35		
	Concentración de HCl (N)								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2	2,11	4,01	13,70	22,99	58,82	197,75	44,99	68,51	325,37
	2,11	4,16	13,78	23,28	58,97	196,28	43,57	68,54	325,17
4	2,18	4,38	29,04	29,90	140,48	276,67	53,80	222,68	429,66
	2,18	4,31	29,10	30,04	140,46	275,43	52,33	227,13	433,82
8	2,55	8,49	40,20	49,45	246,19	445,27	72,95	323,72	575,10
	2,62	8,63	40,62	49,47	244,67	446,65	71,44	329,88	576,51
12	2,91	19,12	40,79	93,54	363,72	561,24	135,98	493,96	687,66
	2,99	19,26	40,49	95,00	365,10	559,74	137,51	488,04	681,81
16	4,75	23,99	54,58	122,87	451,75	627,70	191,73	565,84	731,68
	4,82	24,04	54,41	119,93	449,96	628,40	193,28	571,65	727,29
20	8,71	31,98	112,27	159,57	529,44	724,73	229,96	697,76	886,35
	8,79	32,40	112,02	158,07	519,05	724,14	228,53	699,65	882,57

La figura 12 indica que el contenido de azúcares reductores provenientes del almidón aumenta con el incremento de la temperatura, la concentración de ácido y el tiempo de hidrólisis ácida. Las gráficas representan los azúcares reductores obtenidos a partir de la reacción de hidrólisis ácida realizada a 25, 30 y  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura durante un intervalo de 20 días, las curvas indican que al incrementar la temperatura y la concentración de ácido el contenido de azúcares reductores aumenta con el aumento en el tiempo de reacción, siendo este un proceso inversamente proporcional a la hidrólisis de almidón.

De acuerdo con Chandler y colaboradores (2012) <sup>[53]</sup>, el incremento de la temperatura durante la hidrólisis tiene un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores. Según la figura 12, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  no se obtienen resultados importantes en la transformación de almidón a azúcares reductores independientemente de la concentración de ácido y del tiempo de reacción. Al intensificar la temperatura, a 30 como a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  el proceso demuestra un incremento considerable, manifestando que a mayor tiempo y concentración de ácido multiplica el contenido de azúcares reductores provenientes de la hidrólisis del almidón, bajo estas condiciones se obtuvieron valores máximos de conversión y rendimiento en la producción de azúcares reductores. A partir de 12 días de reacción a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  se observa un aumento considerable en el porcentaje de azúcares reductores y presentando una tendencia similar en lo que respecta a las concentraciones de HCl 2 y 3 N, sin mostrar diferencia significativa.

**Figura 12.** Curvas de Azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de temperatura y tiempo de hidrólisis



Según el análisis estadístico, la prueba de normalidad, para los datos de contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la concentración de ácido, muestra que los datos no se ajustan a una distribución normal ( $p < 0,05$ ), por lo tanto se aplican pruebas no paramétricas. La prueba de Kruskal Wallis (tabla 35), muestra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la concentración de HCl. El incremento en el nivel de la concentración de ácido bajo estas condiciones de reacción, aumenta la conversión a azúcares reductores libres, provenientes de la hidrólisis del almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca".

La prueba de U de Mann-Whitey (tabla 36) indica que existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en todos los casos, presentando que el contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado es inferior con la concentración 1 N y es significativamente

superior con las concentraciones 2 y 3 N, sin existir diferencia entre estas dos últimas, enseñando que para obtener una cantidad de azúcares reductores significativa es suficientemente eficiente la concentración de HCl 2 N.

**Tabla 35.** Prueba de Kruskal Wallis de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la concentración de HCl

Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg <sup>-1</sup> )	
Chi-Cuadrado	25,303
gl	2
Sig. Asintótica	,000

Variable Agrupada: Concentración HCl (N)

**Tabla 36.** Prueba U de Mann-Whitney de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la concentración de HCl

	Concentración HCl (N)	N	Rango promedio	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg<sup>-1</sup>)</b>	1	36	28,72	368,000	,002
	2	36	44,28		
	1	36	24,72	224,000	,000
	3	36	48,28		
	2	36	30,89	446,000	,023
	3	36	42,11		

La prueba de normalidad, para los datos de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la temperatura, no muestra una distribución normal ( $p < 0,05$ ), por esta razón se aplican pruebas no paramétricas. Así, la prueba de Kruskal Wallis (tabla 37), muestra diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la temperatura.

**Tabla 37.** Prueba de Kruskal Wallis de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la temperatura

Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg <sup>-1</sup> )	
Chi-Cuadrado	63,289
gl	2
Sig. Asintótica	,000

Variable Agrupada: Temperatura (°C)

La prueba de U de Mann-Whitey (tabla 38), determina que el contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado es significativamente superior ( $p > 0,05$ ) con 35 °C de temperatura. También demuestra que el incremento en la temperatura genera incremento en la capacidad de producción de azúcares reductores procedentes del almidón hidrolizado.

**Tabla 38.** Prueba U de Mann-Whitney para azúcares reductores de almidón hidrolizado en función de la temperatura

	Temperatura (°C)	N	Rango promedio	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg<sup>-1</sup>)</b>	25	36	20,28	64,000	,000
	30	36	52,72		
<b>Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg<sup>-1</sup>)</b>	25	36	19,17	24,000	,000
	35	36	53,83		
	30	36	32,83	516,000	,137
35	36	40,17			

Finalmente la prueba de normalidad para datos azúcares reductores de almidón hidrolizado en función del tiempo muestra que los resultados no provienen de una distribución normal ( $p < 0,05$ ), por lo tanto el análisis estadístico se realiza a partir de pruebas no paramétricas. La prueba de Kruskal Wallis (tabla 39) indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado en función del tiempo.

**Tabla 39.** Prueba de Kruskal Wallis para azúcares reductores de almidón hidrolizado en función del tiempo

<b>Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg<sup>-1</sup>)</b>	
Chi-Cuadrado	15,317
gl	5
Sig. Asintótica	,009

Variable Agrupada: Tiempo (Días)

Aplicando la prueba de U de Mann-Whitey (tabla 40), se demuestra que el contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado es significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) con un tiempo de hidrólisis de 2 y 4 días, indicando que el porcentaje de almidón sin hidrolizar es significativamente superior en estos dos intervalos de tiempo. El contenido de azúcares reductores de almidón hidrolizado es significativamente superior en los tiempos de hidrólisis de 8, 12, 16 y 20 días sin existir diferencia entre ellos ( $p > 0,05$ ), por esta razón se toma 8 días como tiempo suficientemente eficiente para llevar a cabo la conversión del almidón a azúcares reductores mediante una hidrólisis adecuada. Sin embargo, la figura 12 presenta que a 35 °C de temperatura y 12 días de reacción no hay una diferencia significativa entre el porcentaje de azúcares reductores durante la reacción con las concentraciones de HCl 2 y 3 N, mientras que con 8 días de reacción existe una discrepancia importante entre el porcentaje de azúcares reductores en comparación con 12 días de hidrólisis. Por lo que 12 días de reacción serían adecuados para llevar a cabo la conversión de almidón a azúcares reductores libres.

La correlación de Pearson (tabla 41) indica que la capacidad de producción de azúcares reductores por medio de la hidrólisis ácida del almidón bajo las variables establecidas: concentración de HCl, temperatura y tiempo evaluadas, correlacionan de manera positiva y altamente significativa, consecuentemente el incremento de

estas condiciones experimentales produce la mayor cantidad de azúcares fermentables con una concentración constante de almidón de Oca, indicando que la variable que presenta mayor influencia durante la reacción es la temperatura.

**Tabla 40.** Prueba U de Mann-Whitney para azúcares reductores de almidón hidrolizado en función del tiempo de hidrólisis

Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg <sup>-1</sup> )	Tiempo de Hidrólisis (Días)	N	Rango promedio	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
		2	18	16,83	132,000
	4	18	20,17		
	2	18	15,61	110,000	0,104
	8	18	21,39		
	2	18	14,61	92,000	0,027
	12	18	22,39		
	2	18	13,94	80,000	0,009
	16	18	23,06		
	2	18	13,28	68,000	0,002
	20	18	23,72		
	4	18	16,61	128,000	0,293
	8	18	20,39		
	4	18	15,94	116,000	0,152
	12	18	21,06		
	4	18	15,06	100,000	0,051
	16	18	21,94		
	4	18	14,17	84,000	0,013
	20	18	22,83		
	8	18	16,89	133,000	0,372
	12	18	20,11		
	8	18	16,17	120,000	0,192
	16	18	20,83		
	8	18	15,50	108,000	0,091
	20	18	21,50		
	12	18	17,28	140,000	0,501
	16	18	19,72		
	12	18	16,17	120,000	0,192
	20	18	20,83		
	16	18	17,28	140,000	0,501
	20	18	19,72		

**Tabla 41.** Correlación de Pearson para azúcares reductores de almidón hidrolizado por el método espectrofotométrico del DNS por UV-Vis

Azúcares Reductores de Almidón Hidrolizado (g kg <sup>-1</sup> )	Correlación de Pearson	Concentración HCl (N)	Temperatura (°C)	Tiempo (Días)
		Sig. (bilateral)	,508**	,582**
N	,000	,000	,000	
		108	108	

Así, se deduce que las mejores condiciones para que se produzca la máxima hidrólisis de almidón y a su vez se genere la mayor transformación de azúcares reductores se ocasiona bajo las siguientes condiciones: concentración de HCl 2 N, 12 días y 35 °C, obteniendo aproximadamente 491 g de azúcares reductores por kg de almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca". Con un rango de eficiencia de conversión de almidón a azúcares reductores de 49,2% a 88,45%.

## 5.5 DETERMINACIÓN DE ETANOL

Este procedimiento se realizó para establecer el contenido de etanol generado a partir de los métodos de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y destilación, bajo las condiciones de concentración de almidón hidrolizado con una eficiencia en la conversión de azúcares reductores de 88,45%, temperatura, pH y tiempo de fermentación determinadas, de acuerdo con la metodología establecida en 4.6 para la fermentación y 4.7 para la determinación de etanol. Para obtener bioetanol a partir de azúcares reductores de almidón de Oca hidrolizado es indispensable tener en cuenta factores determinantes tales como la presencia de nutrientes indispensables para que los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae*, puedan descomponer el almidón, concentración del sustrato, temperatura, pH y tiempo de fermentación.

Durante el proceso fermentativo se utilizaron concentraciones de sustrato inferiores a 120 g L<sup>-1</sup> de glucosa, donde la *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de fermentar una solución de azúcares para producir bioetanol, porque si la concentración inicial de sustrato es superior a este valor la velocidad de crecimiento disminuye debido a la inhibición por sustrato. Altas concentraciones de azúcar implica la inhibición por deshidratación de los microorganismos debido al fenómeno de osmosis en las células. Se tomaron concentraciones de almidón de 25, 50 y 75 g L<sup>-1</sup> con una eficiencia de conversión de almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" a azúcares reductores del 86,45% obteniendo 22,11; 44,23 y 66,34 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores respectivamente, valores que se encuentran por debajo del nivel máximo de presencia de sustrato donde se produce el adecuado crecimiento microbiano, aumentando la concentración del sustrato se acelera la velocidad de crecimiento.

Al igual que en cualquier reacción química la temperatura afecta las reacciones que ocurren dentro de las células durante el proceso de fermentación, dependiendo de la temperatura óptima para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se optó por tres niveles en la fermentación de azúcares reductores, implementando temperaturas de 25, 30 y 35 °C; encontrando así que a temperaturas elevadas (>30 °C) no se produjo bioetanol, puesto que se genera un decaimiento en la velocidad de crecimiento de los microorganismos aumenta su mortalidad e inhibiendo el proceso fermentativo debido a la desnaturalización de las proteínas, provocando que el requerimiento de energía de mantenimiento celular aumente. Mientras que el proceso fermentativo a 25 y 30 °C es adecuado debido a que el crecimiento celular es estable y existe una interacción adecuada de los microorganismos con el sustrato.

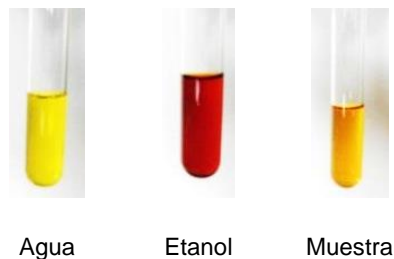
El pH tiene menos efecto sobre la actividad biológica de los microorganismos, las levaduras crecen en un intervalo de pH de 3,0 a 6,0. Las fermentaciones con levadura *Saccharomyces cerevisiae* se realizan a pH bajo para reducir la contaminación por bacterias. En la fermentación de azúcares reductores para producir bioetanol se tomaron dos valores de pH 4,0 y 5,0 para garantizar un proceso adecuado. Durante el desarrollo de la fermentación el tiempo afecta estos procesos dependiendo de la concentración del sustrato y la temperatura.

Los nutrientes agregados durante la fermentación alcohólica afectan directamente la actividad de la levadura, sus necesidades nutricionales buscan medios de cultivo que aporten elementos imprescindibles para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir los requerimientos energéticos de las levaduras. Un medio de cultivo debe de tener elementos indispensables para el crecimiento microbiano, agregar nutrientes como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$  en niveles apropiados garantiza que la *Saccharomyces cerevisiae* tenga una actividad adecuada y sea capaz de producir etanol.

### 5.5.1 Prueba con nitrato cérico amoniacal

Como prueba preliminar para la determinación de etanol en las muestras destiladas tras el proceso de fermentación, se utilizó la prueba cualitativa del nitrato cérico amoniacal de acuerdo con la metodología empleada en 4.7.1, este análisis es específico para alcoholes que contienen menos de 10 átomos de carbono. La prueba resulto positiva al observar un cambio de color de amarillo a rojo, o naranja dependiendo del grado de alcohol (Figura 13), este es un análisis selectivo y rápido en comparación con otros métodos de oxidación.

**Figura 13.** Resultados de la prueba cualitativa con nitrato cérico amoniacal



Las muestras sometidas a fermentación y destilación dieron resultados positivos, excepto cuando la temperatura de fermentación fue 35 °C, puesto que la temperatura influencia directamente el crecimiento de la levadura, para la *Saccharomyces cerevisiae* la temperatura optima es de 25 a 30 °C, incrementos de la temperatura reducen la actividad enzimática de la levadura, por ende el proceso de fermentación disminuye porque a temperaturas elevadas se favorece el desarrollo bacteriano. Además, se promueve la evaporación del alcohol.



## 5.5.2 Determinación de etanol por cromatografía de gases

Las muestras de etanol obtenidas en las diferentes condiciones de fermentación, con concentración de almidón (eficiencia de hidrólisis del 88,45% en la conversión a azúcares reductores), pH y temperatura, fueron cuantificadas por cromatografía de gases, con excepción de las muestras obtenidas a 35 °C, descartadas al no obtener prueba positiva para etanol con nitrato cérico amoniacal. Los resultados obtenidos en la determinación de etanol por cromatografía de gases se muestran en la tabla 42.

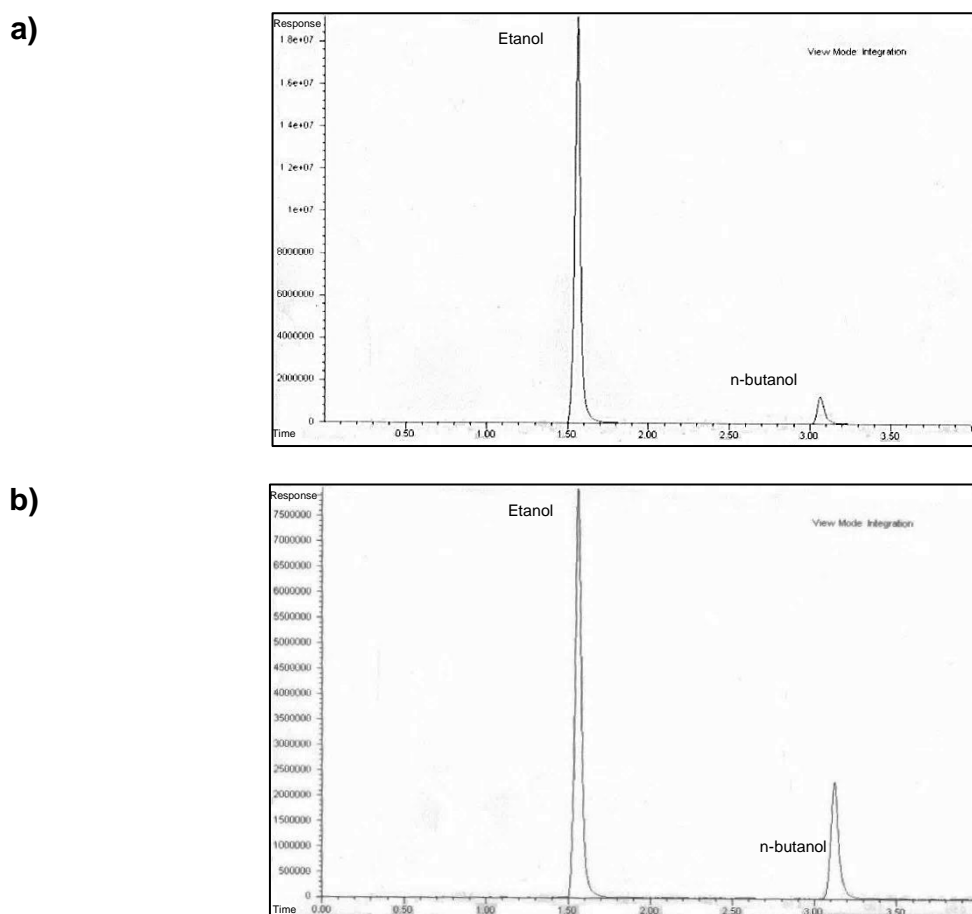
**Tabla 42.** Resultados de determinación de etanol por CG-FID

Tiempo (Días)	Almidón (g L <sup>-1</sup> )	Azúcares Reductores (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)							
			25				30			
			pH							
			4,0		5,0		4,0		5,0	
Etanol (%v/v)	Eficiencia (%)	Etanol (%v/v)	Eficiencia (%)	Etanol (%v/v)	Eficiencia (%)	Etanol (%v/v)	Eficiencia (%)			
2	25	22,11	1,67	11,89	14,88	101,83	4,49	31,67	10,72	73,66
			1,73	±	14,77	±	4,68	±	10,45	±
			1,70	0,22	14,05	3,17	4,42	0,93	10,44	1,10
	50	44,23	10,57	37,61	4,10	14,01	3,93	13,57	14,11	50,79
			10,73	±	3,85	±	3,84	±	14,55	±
			10,98	0,73	4,08	0,49	3,88	0,16	14,93	1,42
	75	66,34	3,84	9,25	14,04	32,66	5,28	12,39	14,29	33,31
			3,99	±	13,54	±	5,42	±	13,91	±
			4,08	0,28	14,47	1,08	5,24	0,22	14,68	0,90
5	25	22,11	4,41	30,47	6,56	48,00	10,65	75,21	8,85	63,25
			4,40	±	6,99	±	10,73	±	9,23	±
			4,26	0,59	7,05	1,87	10,90	0,90	9,06	1,31
	50	44,23	12,34	43,97	4,97	17,37	12,18	43,86	15,66	53,28
			12,77	±	5,03	±	13,04	±	15,16	±
			12,63	0,78	4,9	0,22	12,42	1,54	14,9	1,35
	75	66,34	16,92	39,25	16,35	37,92	14,26	32,46	18,74	42,58
			16,15	±	16,24	±	13,6	±	18,3	±
			17,45	1,52	16,23	0,16	13,94	0,77	17,78	1,13
8	25	22,11	3,95	26,40	6,21	43,77	11,64	82,06	6,73	48,65
			3,66	±	6,35	±	11,68	±	6,91	±
			3,73	1,05	6,22	0,53	11,90	0,97	7,23	1,77
	50	44,23	5,64	19,85	16,89	59,10	16,29	57,58	12,55	43,98
			5,74	±	16,93	±	16,18	±	12,55	±
			5,66	0,19	16,91	0,07	16,95	1,45	12,65	0,22
	75	66,34	10,82	25,34	17,11	39,54	19,06	44,34	14,23	33,09
			10,71	±	17,02	±	19,27	±	14,00	±
			11,09	0,45	16,77	0,41	18,75	0,61	14,37	0,44

Los datos referentes a la curva de calibración por el método del patrón interno para la determinación del porcentaje de etanol a partir de las muestras fermentadas y el porcentaje de eficiencia de la fermentación se muestran en el anexo A y B respectivamente.

La figura 14 presenta los cromatogramas obtenidos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). El cromatograma a) representa un patrón de etanol al 18% (%v/v) usando n-butanol como patrón interno. Según el orden de elución, el primer pico representa al etanol y el segundo a n-butanol, el tiempo de análisis fue de 4 minutos, con el etanol eluyendo a 1,5 minutos y el n-butanol a 3,0 minutos aproximadamente. El cromatograma b) constituye el alcohol producido en la destilación del fermentado con n-butanol como patrón interno de la muestra bajo las siguientes condiciones: 66,34 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores derivados de la hidrólisis de 75 g L<sup>-1</sup> de almidón de Oca, 30 °C, pH 5,0 y 5 días de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo resultados similares en todas las muestras.

**Figura 14.** Cromatogramas de etanol y n-butanol como patrón interno por CG-FID

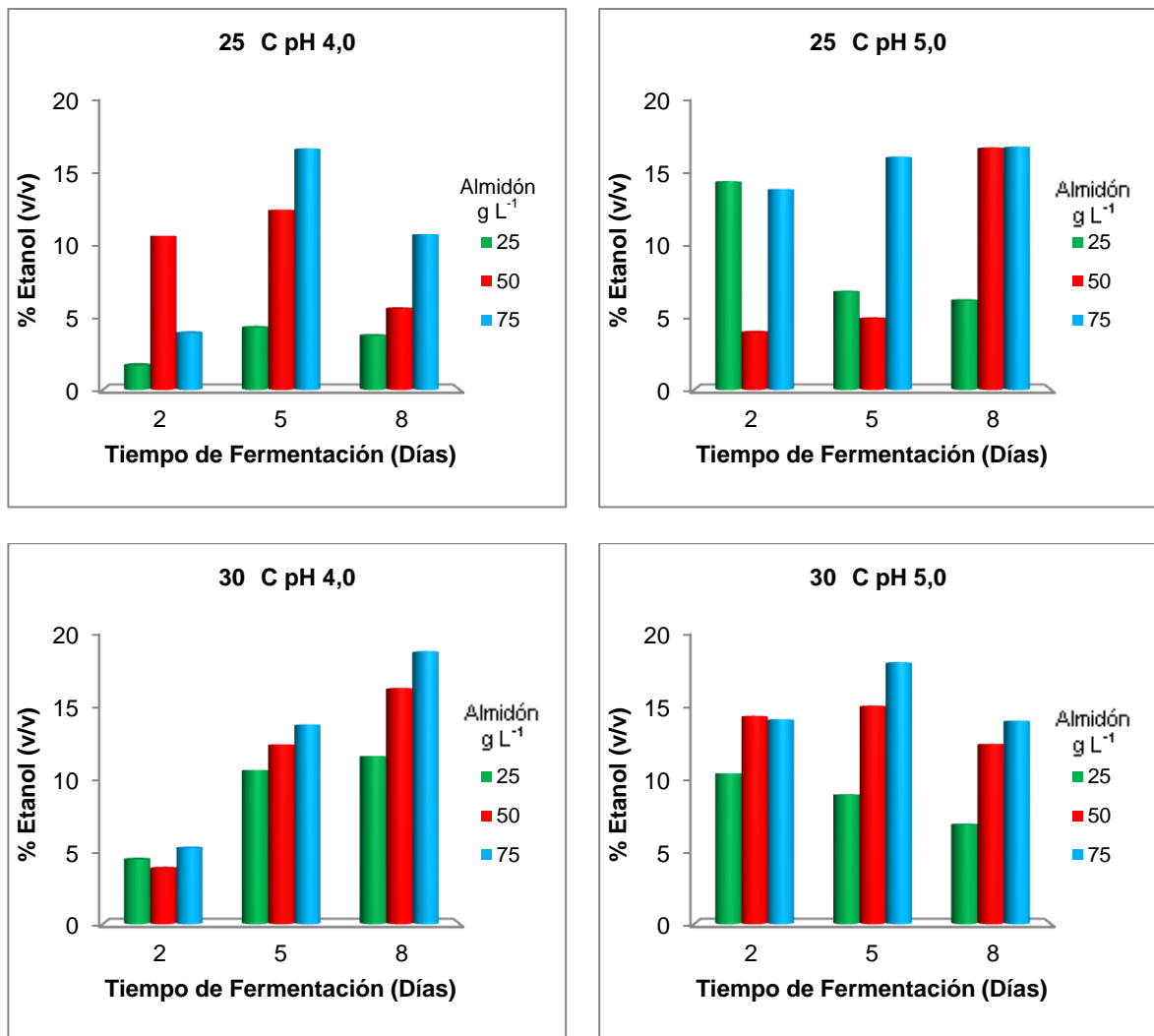


*Cromatogramas obtenidos por CG-FID. a) Patrón de etanol al 18% y b) Muestra fermentada (concentración de azúcares reductores 66,34 g L<sup>-1</sup>, 30 °C, pH 5,0 y 5 días de fermentación) con n-butanol como estándar interno en los dos casos.*

Durante este análisis no se observó la presencia de otros alcoholes producidos en las muestras analizadas, encontrando que la especie mayoritaria en las muestras es el etanol, no se detectó metanol bajo estas condiciones de análisis. La figura 15, muestra el incremento de la producción de etanol durante el proceso de fermentación

con *Saccharomyces cerevisiae*, presentando los resultados para el porcentaje de etanol en función de temperatura y pH tras el proceso de fermentación de azúcares reductores provenientes de la hidrólisis ácida del almidón de Oca en las condiciones establecidas, posterior destilación y análisis por cromatografía de gases. El bioetanol obtenido mediante proceso de fermentación, se realizó con: concentración de azúcares reductores (22,11-44,23 y 66,34 g L<sup>-1</sup> con una eficiencia en la hidrólisis ácida de 88,45% a partir de 25, 50 y 75 g L<sup>-1</sup> de almidón respectivamente), temperatura (25 y 30 °C), pH (4,0 y 5,0) y tiempo (2, 5, y 8 días), los datos obtenidos se interpolan en la curva de calibración para porcentaje de etanol (anexo A).

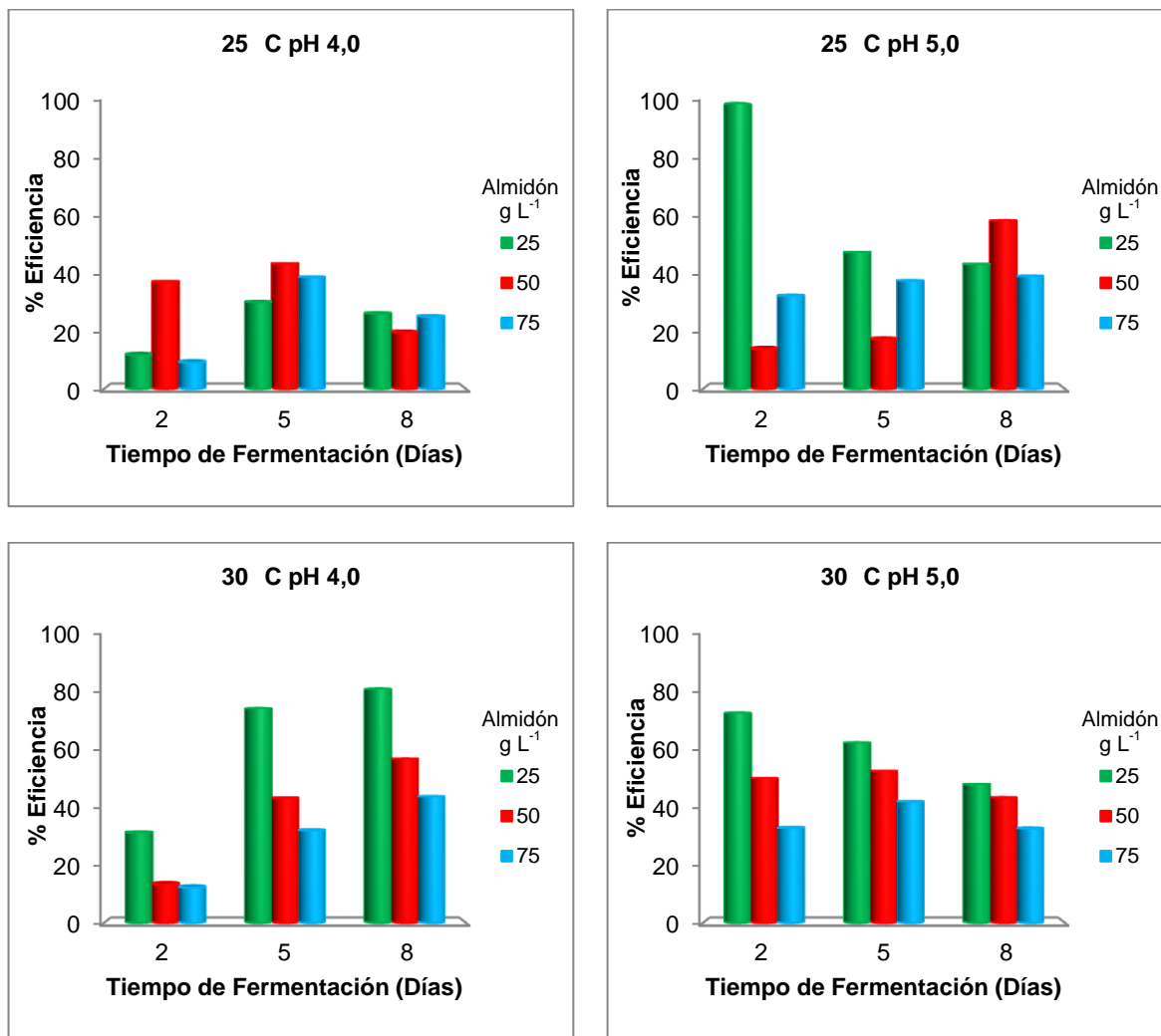
**Figura 15.** Etanol (%v/v) en función de temperatura y pH



Como se observa en la figura 15 en la mayoría de los casos a 25 °C (temperatura ambiente) se presentan mayores variaciones en el porcentaje de etanol obtenido, indicando que los cambios en la temperatura afectan directamente los procesos de fermentación. A temperatura ambiente se presentan cambios en la temperatura

durante el proceso de fermentación, no posibles de controlar, factor que afecta notablemente el crecimiento microbiano provocando que la actividad de las levaduras se vea perturbada. Esto se debe a que la fermentación es un proceso exotérmico que necesita mantener control constante de temperatura, para conservar el proceso dentro del rango de valores óptimos para la conversión adecuada de azúcares reductores a etanol. Sin embargo, a 30 °C con temperatura constante el porcentaje de alcohol es proporcional a la cantidad de almidón hidrolizado en la mayoría de los casos.

**Figura 16.** Eficiencia en la fermentación en función de temperatura y pH



La figura 16 presenta la eficiencia de la fermentación en función de temperatura y pH, tomando una eficiencia mínima viable del proceso como 70%. A 25 °C (temperatura ambiente) el porcentaje de etanol generado después de la fermentación muestra una mayor variación, encontrando que a pH 4,0 se obtiene 12,58% de etanol con una eficiencia del 43,97%, bajo las siguientes condiciones: 50 g L<sup>-1</sup> de almidón hidrolizado (44,23 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores) y 5 días de fermentación; eficiencia menor al

70%. Mientras que a pH 5,0 se obtuvo 14,57% de etanol con una eficiencia del 101,83 en las siguientes condiciones: 25 g L<sup>-1</sup> de almidón hidrolizado (22,11 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores) y 2 días de fermentación.

Con temperatura constante de 30 °C, se encontraron en cada valor de pH valores destacables de eficiencia (superior al 70%): A pH 4,0 un porcentaje de etanol de 10,76% con 25 g L<sup>-1</sup> de almidón hidrolizado (22,11 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores), 5 días de fermentación y 75,21% de eficiencia. Si las condiciones a este mismo valor de pH son: 25 g L<sup>-1</sup> de almidón hidrolizado (22,11 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores) y 8 días de fermentación, se obtiene 11,74% de etanol con una eficiencia de 82,06%. Cabe resaltar que 5 días de fermentación representan una mayor eficacia en el proceso. Con un valor de pH 5,0 se observa que 25 g L<sup>-1</sup> de almidón hidrolizado (22,11 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores) con 2 días de fermentación producen 10,74% de etanol con una eficiencia de 73,66%

Se realizó el análisis estadístico de los porcentajes de etanol en función de la concentración de almidón de Oca con una eficiencia de hidrólisis de 88,45%. La prueba de ANOVA (tabla 43) comprueba diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el porcentaje de etanol en función de la concentración de almidón hidrolizado previamente al proceso de fermentación alcohólica. La prueba de Tukey (tabla 44) demuestra que el porcentaje de etanol es significativamente superior con 75 g L<sup>-1</sup> de almidón de Oca, al aumentar la concentración de almidón en el medio de fermentación, el rendimiento de etanol se incrementa.

**Tabla 43.** ANOVA de etanol (%v/v) en función de la concentración de almidón hidrolizado

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	665,101	2	332,550	17,194	,000
Intra-grupos	2030,766	105	19,341		
Total	2695,867	107			

**Tabla 44.** Prueba de Tukey para etanol (%v/v) en función de la concentración de almidón hidrolizado

	Concentración de Almidón (g L <sup>-1</sup> )	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup>	25	36	7,591		
	50	36		10,846	
	75	36			13,664
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Sin embargo, cabe resaltar que con 25 g L<sup>-1</sup> de almidón, se obtiene aproximadamente la mitad del porcentaje de etanol que se alcanza a conseguir con 75 g L<sup>-1</sup>. Así, la menor concentración de almidón el proceso de fermentación es más viable energética, ambiental y económicamente, posiblemente como se explicó

anteriormente hay una máxima cantidad de sustrato adecuada para la degradación de azúcares por parte de los microorganismos.

La temperatura influye marcadamente sobre la eficacia de producción de etanol, al aumentar la temperatura, aumenta la velocidad de fermentación. Se presentan mayores variaciones en el porcentaje de etanol a 25 °C, independientemente de la concentración de almidón, del pH y del tiempo de fermentación. Mientras que a 30 °C el contenido de etanol en la mayoría de los casos aumenta a medida que reacciona una mayor cantidad de azúcares reductores provenientes de la hidrólisis de almidón.

La prueba de ANOVA (tabla 45) indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) del porcentaje de etanol en función de la temperatura, además con la prueba de medias (tabla 46) se deduce que el porcentaje de etanol es significativamente superior a 30 °C.

**Tabla 45.** ANOVA de etanol (%v/v) en función de la temperatura

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-Grupos	150,410	1	150,410	6,263	,014
Intra- Grupos	2545,457	106	24,014		
Total	2695,867	107			

**Tabla 46.** Prueba de medias de etanol (%v/v) en función de la temperatura

Temperatura (°C)	Media (%Etanol)	N	S
25	9,520	54	5,338
30	11,880	54	4,419
Total	10,700	108	5,019

De acuerdo con Ramírez y Pedroza (2001) <sup>[54]</sup>, la temperatura es un factor decisivo en la fermentación alcohólica en presencia de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. La reproducción y la fermentación oscila en un intervalo de temperaturas entre 22 y 27 °C, debido a que temperaturas superiores provoca que las levaduras pierdan la capacidad para desdoblarse azúcares y posteriormente dejan de crecer y reproducirse. Esto se debe principalmente a que a temperaturas superiores a 32 °C se produce la inactivación de las levaduras comprometidas de la transformación de azúcares fermentables en etanol y CO<sub>2</sub>. Al mismo tiempo existe la posibilidad de la evaporación del etanol presente en el fermentado bajo estas condiciones.

El tiempo influye marcadamente en el proceso de fermentación como se mencionó anteriormente. La prueba de ANOVA (tabla 47) confirma diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los porcentajes de etanol a diferentes tiempos de fermentación. La prueba de Tukey (tabla 48) para el porcentaje de etanol producido en función del tiempo indica que con 2 días de fermentación el porcentaje de etanol es menor, con 5 y 8 días el porcentaje de etanol es significativamente superior, sin existir diferencia significativa entre estos dos últimos, por tanto, 5 días de fermentación es suficiente para generar un adecuado porcentaje de etanol bajo estas condiciones de fermentación. No obstante, con 2 días de fermentación hay más viabilidad energética,

ambiental y económica de producción de etanol, porque se obtiene una cantidad cercana a la obtenida a los 5 y 8 días

**Tabla 47.** ANOVA de etanol (%v/v) en función del tiempo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	259,395	2	129,698	5,589	,005
Intra-grupos	2436,472	105	23,204		
Total	2695,867	107			

**Tabla 48.** Prueba de Tukey para etanol (%v/v) en función del tiempo

	Tiempo de fermentación (Días)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
<b>Tukey HSD<sup>a</sup></b>	2	36	8,509	
	8	36		11,786
	5	36		11,806
	Sig.		1,000	1,000

El pH presenta fuerte influencia en el proceso de fermentación del almidón de Oca, esto se expone con la prueba de ANOVA (tabla 49), que indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los porcentajes de etanol en función del pH, la prueba de medias (tabla 50) demuestra que el porcentaje de etanol proveniente de la fermentación a pH 5,0 es significativamente superior al proveniente de la fermentación a pH 4,0 mostrando que aumentar la acidez no permite que los microorganismos realicen el proceso en forma adecuada. El pH es un elemento significativo durante el proceso de fermentación, debido al efecto del crecimiento de las levaduras, la velocidad de fermentación y la producción de alcohol. De acuerdo con Lin y colaboradores (2012)<sup>[55]</sup>, un rango de pH de 4,0 a 5,0 se puede considerar como el límite de funcionamiento para el proceso de producción de etanol en condiciones anaerobias. En este caso, teniendo en cuenta la necesidad de ajustar el pH, se considera como el límite de funcionamiento de la fermentación pH 5,0 para el proceso de producción de etanol bajo estas condiciones.

**Tabla 49.** ANOVA de etanol (%v/v) en función del pH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	189,987	1	189,987	8,037	,005
Intra-grupos	2505,881	106	23,640		
Total	2695,867	107			

**Tabla 50.** Prueba de medias de etanol (%v/v) en función del pH

pH de Fermentación	Media (% Etanol)	N	S
4,0	9,374	54	5,219
5,0	12,027	54	4,477
Total	10,700	108	5,019

Las anteriores afirmaciones se validan con la prueba de correlación de Pearson (tabla 51) demostrando que la capacidad de producción de etanol (%v/v) correlaciona de manera positiva y altamente significativa, con la concentración de almidón con una eficiencia en la hidrólisis ácida del 88,45% en la conversión de azúcares reductores, temperatura, tiempo y pH de fermentación, indicando que la variable que presenta mayor influencia durante el proceso de fermentación es la concentración de almidón. Encontrando que a medida que aumentan los valores de las variables aumenta el porcentaje de alcohol generado durante el proceso de fermentación alcohólica. Además, la adición de nutrientes como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$  genera las condiciones óptimas para garantizar la actividad de la “*Saccharomyces cerevisiae*” durante la transformación de azúcares reductores a etanol durante la fermentación.

**Tabla 51.** Correlación de Pearson del porcentaje de etanol (%v/v)

		Almidón (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tiempo (Días)	pH
Etanol (% v/v)	Correlación de Pearson	,496*	,236*	,268**	,265**
	Sig. (bilateral)	,000	,014	,005	,005
	N	108	108	108	108

De esta manera bajo las condiciones del ensayo de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* de almidón obtenido de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” previamente sometido a proceso de hidrólisis ácida para obtener azúcares reductores, las condiciones más adecuadas para el proceso son: 25 g L<sup>-1</sup> de almidón de oca (22,11 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores), 30 °C, pH 5.0 y 2 días de reacción, con un porcentaje promedio de etanol de 10,54% (%v/v) y 73,66% de eficiencia en la fermentación.

Por otro lado la fermentación directa del tubérculo de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” durante 15 días a temperatura ambiente (25 °C), tras un ensayo realizado que permitió obtener un porcentaje de etanol del 6,27% (%v/v) a partir de 500 g L<sup>-1</sup> de Oca agregando *Saccharomyces cerevisiae* y fuente de micronutrientes, rendimiento inferior al obtenido a partir del almidón de Oca bajo las condiciones establecidas, con una eficiencia de 21,92%. Sin embargo, teniendo en cuenta que no se realizaron más ensayos, la producción de bioetanol a partir de la fermentación directa de la Oca con mayores estudios puede constituirse en una alternativa de interés, ya que no necesita gran demanda de reactivos, se aprovecha el producto por completo y la generación de residuos es menor.



## 6. CONCLUSIONES

La *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" presenta 78,63% de humedad, 2,91% de cenizas, 3,64% de proteína, 0,20% de grasa, 0,78% de fibra y 13,84% de carbohidratos, por lo tanto es posible considerar este tubérculo como un alimento que aporta un porcentaje considerable de energía en la dieta.

El almidón obtenido a partir de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" fue 6,73%, inferior al reportado en la literatura, de esta manera es necesario continuar el estudio para incrementar el rendimiento.

Las condiciones óptimas para la hidrólisis ácida del almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" y la conversión a azúcares reductores son: HCl 2 N, 35 °C y 12 días de proceso, obteniendo 12,70% de almidón no hidrolizado, con un rendimiento de la hidrólisis de 87,30%.

La hidrólisis ácida del almidón permite obtener 491 g de azúcares reductores por kg de almidón, demostrando la viabilidad del proceso de producción de azúcares fermentables del almidón del tubérculo de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" como alternativa para la obtención de bioetanol.

El método espectrofotométrico del DNS para la determinación de azúcares reductores, es lineal, preciso, repetible y reproducibles presentando linealidad para el método del DNS entre 0,1-1,4 g L<sup>-1</sup> de D-Glucosa; LOD 0,006 g L<sup>-1</sup>, LOQ 0,020 g L<sup>-1</sup> y el %R de 99,60%.

La cromatografía de gases con detector FID es una técnica adecuada para la cuantificación de etanol obtenido por la fermentación de almidón hidrolizado y del tubérculo de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca", demostrando fermentación adecuada sin detectar presencia de metanol en estas condiciones.

La hidrólisis de almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" y posterior fermentación a etanol puede llevarse a cabo eficazmente en presencia de *Saccharomyces cerevisiae* produciendo cantidades significativas de etanol, este proceso es un componente factible para fortalecer las economías rurales.

Las condiciones adecuadas para la producción de bioetanol a partir de de almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" son: 30 °C, 2 días, 25 g L<sup>-1</sup> de almidón (22,11 g L<sup>-1</sup> de azúcares reductores), pH 5,0 con 10,54% de etanol y 73,66% de eficiencia en la fermentación.

La *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" se debe utilizar fresca para extraer cantidades considerables de almidón, en cambio se debe someter a procesos de endulzamiento para obtener una mayor cantidad de azúcares libres en la muestra para obtener etanol a partir de la fermentación directa del tubérculo.

Los cultivos de *Oxalis tuberosa* Molina “Oca” son una alternativa viable para la obtención de bioetanol y como alimento debido a su alto valor nutricional, que puede contribuir en la estrategia de seguridad alimentaria de los moradores de clima frío, sirviendo como una opción para la sustitución de cultivos ilícitos y generación de ingresos para la comunidad agrícola.

## BIBLIOGRAFÍA

1. MORA GETIAL, Adriana Maricela y RUANO ENRÍQUEZ, Tatiana Mercedes. Incidencia de la Masa de Oca (*Oxalis tuberosa*) como Sustituto Parcial de la Harina de Trigo (*Triticum Spp.*) para la Elaboración de Pan Dulce. Trabajo de grado Ingeniero Agroindustrial. Ibarra. Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Escuela de Ingeniería Agroindustrial, 2012. 3 p.
2. PALATE AMAGUAÑA, Javier Eduardo. Estudio del Efecto de la Temperatura y el Tiempo en las Características Físico-Químicas y Sensoriales de la Oca (*Oxalis Tuberosa*) Durante su Maduración. Trabajo de grado Ingeniero de Alimentos. Ambato. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, 2013. 24, 26 p.
3. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academy Press. Washington D.C., 1989. 83, 87, 91 p.
4. SUQUILANDA VALDIVIESO, Manuel. Producción Orgánica de Cultivos Andinos. UNOCANC. Quito. 46, 58 p
5. CHIRINOS, Rosana; BETALLELUZ-PALLARDEL, Indira; HUAMAN, Anabel; ARBIZU, Carlos; PEDRESCHI, Romina y CAMPOS, David. HPLC-DAD Characterization of Phenolic Compounds from Andean Oca (*Oxalis Tuberosa Mol.*) Tubers and their Contribution to the Antioxidant Capacity. Lima. Food Chemistry. 2009. 1243 p.
6. CAJAMARCA RUIZ, Esther Elizabeth. Evaluación Nutricional de la Oca (*Oxalis tuberosa sara-oca*) Fresca, Endulzada y Deshidratada en Secador de Bandejas. Trabajo de grado Bioquímico Farmacéutico. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia, 2010. 29-30, 111, 113 p.
7. BARRERA, Víctor; TAPIA, Cesar y MONTEROS, Álvaro. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la Conservación y uso Sostenible en el Ecuador. Quito. 2003. 46, 58 p.
8. TAPIA, Mario y FRIES, Ana María. Guía De Campo de los Cultivos Andinos. Lima. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2007. 43-47 p.
9. FLORES, Hector; WALKER, Travis; GUIMARÃES, Rejame; PAL BAIS, Harsh y VIVANCO, Jorge. Andean Root and Tuber Crops: Underground Rainbows. Hort Science. 2003. 161 p.

10. JATIVA ÁLVAREZ, Hilda Marcela. Caracterización Físico, Química y Nutricional de la Oca (*Oxalis tuberosa*) Cultivada en Diferentes Suelos Edafológicos del Ecuador. Trabajo de grado Ingeniería en Industrialización de Alimentos. Quito. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de la Ingeniería. 2012. 16 p.
11. PAZMIÑO VACA, María Lurdes. Estudio y Análisis de la Oca (*Oxalis tuberosa*) y Propuesta Gastronómica. Trabajo de grado Administrador Gastronómico. Quito. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de Turismo y Preservación Ambiental. Escuela de Gastronomía, 2007. 17 p.
12. BUKASOV, S. Las Plantas Cultivadas de México, Guatemala y Colombia. Instituto Iberoamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Lima. 1963. 152 p
13. ROSERO ALPALA, María Gladys. Colección, Caracterización y Conservación de Variabilidad Genética de Oca (*Oxalis tuberosa* Mol) en Agroecosistemas Paramunos del Departamento de Nariño-Colombia. Trabajo de grado Magister en Ciencias. Palmira. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Coordinación General de Post Grado 2010. 18 p.
14. SURCO LAOS, Felipe Artemio. Caracterización de Almidones Aislados de Tubérculos Andinos: Mashua (*Troaeolum Tuberosum*), Oca (*Oxalis tuberosa*), Olluco (*Ullucus Tuberosus*) para su Aplicación Tecnológica. Trabajo de grado Magister en Ciencias de los Alimentos. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Unidad de Post Grado, 2004. 7, 14 p.
15. BULEÓN, Alain; COTTE, Marine; PUTAUX, Jean-Luc; D'HULST, Christophe y SUSINI, Jean. Tracking Sulfur and Phosphorus within Single Starch Granules Using Synchrotron X-Ray Microfluorescence Mapping. Nantes. Biochimica et Biophysica Acta. 2014. 113 p.
16. ZHANG, Pingyi; WHISTLER, Roy; BEMILLER, James y HAMAKER, Bruce. Banana Starch: Production, Physicochemical Properties, and Digestibility—A Review. Carbohydrate Polymers. 2005. 447-448 p
17. BULEÓN, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V. y BALL, S. Starch Granules: Structure and Biosynthesis. Nantes. International Journal of Biological Macromolecules. 1998. 85 p.
18. VILLACRÉS, Elena y ESPÍN, Susana. Evaluación del Rendimiento, Características y Propiedades del Almidón de Algunas Raíces y Tubérculos Andinos. En: Raíces Y Tubérculos Andinos Avances de Investigación I. 1 ed. Lima. 1999. 25-36 p.
19. LU, D.; XIAO y C. XU J. Starch-based completely biodegradable polymer materials. Quanzhou. eXPRESS Polymer Letters. 2009. 366, 371 p.

20. HERNÁNDEZ-JAIMES, C.; BELLO-PÉREZ, L.A.; VERNON-CARTER, E.J. y ALVAREZ-RAMIREZ, J. Plantain Starch Granules Morphology, Crystallinity, Structure Transition, and Size Evolution upon Acid Hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*. Iztapalapa. 2013. 207 p.
21. BALAT, Mustafa; BALAT, Havva y OZ Cahide. *Progress in Bioethanol Processing. Progress in Energy and Combustion Science*. Trabzon. 2008. 561 p.
22. SÁNCHEZ, Oscar y CARDONA, Carlos. Review: Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. Manizales. 2008. 5274 p.
23. CRUZ RUIZ, Kevin Alonso. Modelado del Proceso de Hidrólisis Enzimática de Almidones Gelatinizados del Fruto de la Planta de Banano. Trabajo de Grado Magister en Ingeniería – Ingeniería Química. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Minas. Escuela de Procesos y Energía, 2012. 8 p.
24. FENNEMA, Owen R. *Química de los Alimentos*. 2 ed. Acribia Editorial S.A. 2000. 238, 753 p.
25. NELSON, David L. y COX, Michael M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4 ed. Editorial Omega. Nueva York. 2005. 523, 525 p.
26. TORTORA, Gerard; FUNKE, Berdell y CASE, Christine. *Introducción a la Microbiología*. 9 ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2007. 137 p.
27. PÉREZ, Edier Humberto. Determinación y Cuantificación de Mono y Disacáridos en Melazas de Caña de Azúcar, su Control Durante el Proceso de Fermentación a Alcohol Etilico por CG, HPLC y CG/EM. Trabajo de grado Magister en Ciencias Químicas. Santiago de Cali. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, 1993. 8, 9 p.
28. VINCENT VELA, María Cinta; ÁLVAREZ BLANCO, Silvia y ZARAGOZA CARBONELL, José Luis. *Química Industrial Orgánica*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 2006. 78 p.
29. HASHEM, Mohamed y DARWISH, Soumia. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. Egypt. 2010. 954 p.
30. GARCÍA, Vera. *Introducción a la Microbiología*. 2 ed. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica. 2004. 108 - 116 p.
31. CADENA AGROINDUSTRIAL: ETANOL. Análisis de Estudios de Cadena Etanol. Nicaragua. 2004. 5-12 p.

32. BIOETANOL DE CAÑA DE AZÚCAR. Energía para el Desarrollo Sostenible. 1 ed. Rio de Janeiro. 2008. 41, 43, 69-70 p.
33. CONSEJO NACIONAL DE POLÍTICA ECONÓMICA Y SOCIAL. Lineamiento de Política para Promover la Producción Sostenible de Biocombustibles en Colombia. Documento Conpes 3510. Bogotá, D.C. 2008. 24 p.
34. CABEZAS, Fabio; BENÍTEZ, Ricardo y VIVAS, Guiovanni. Análisis Orgánico Cualitativo: Procesos a Micro Escala. 2 ed. Popayán. Universidad del Cauca. 2010. 36-37 p.
35. SKOOG, Douglas; WEST, Donald; HOLLER, James y CROUCH, Stanley. Fundamentos de Química Analítica. 8 ed. Editorial Thomson. Madrid. 2005. 964-966 p.
36. PÉREZ, Edelmira. Agricultura, Cultivos Ilícitos y Desarrollo Rural en Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. 232 p.
37. LALE-DEMOZ, Aldo. Informe Ejecutivo: Encuentro Nacional del Programa Presidencial Contra Cultivos Ilícitos (PCI). Sistema de seguimiento y Evaluación. Santa Marta. 2008. 31 p.
38. HOYOS, Olga Lucia y VÉLEZ, Patricia Helena. Análisis de Alimentos: Manual de Prácticas de Laboratorio. Popayán. Universidad del Cauca. 2001. 15-33 p.
39. GARCÍA, E. y FERNÁNDEZ, I. Determinación de Proteínas de un Alimento por el Método Kjeldahl. Valoración con un Ácido Fuerte. Universitat Politècnica de Valencia. 3, 6 p.
40. ALARCÓN, Freddy y DUFOR, Dominique. Almidón Agrío de Yuca en Colombia. Tomo 1: Producción y recomendaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. 199. 9 p.
41. WANG, Shujun; YU, Jinglin y YU, Jiugao. The semi-crystalline growth rings of C-type pea starch granule revealed by SEM and HR-TEM during acid hydrolysis. Carbohydrate Polymers. Tianjin. 2008. 732 p.
42. NAJMUS SAQIB, Abdul Aala y WHITNEY, Philip John. Differential Behaviour of the Dinitrosalicylic Acid (DNS) Reagent towards Mono and di-Saccharide Sugars. Biomass and Bioenergy. Guildford. 2011. 4749 p.
43. SWARTZ, Michael E. Analytical Method Development and Validation. 1 ed. CRC Press. New York. 1997.
44. SEGAL KISCHINEVSKY, Claudia y RODARTE MURGUÍA, Beatriz. Manual de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 2011. México. 13 p.

45. MURGAS TORRES, José David y VÁSQUEZ MONTERROSA, Miguel Ángel. Evaluación de la Obtención de Bioetanol a Partir del Almidón de Ñame (*Dioscörea Rotundata*, *Dioscörea Alata* y *Dioscörea Trífida*) Mediante la Hidrólisis Enzimática y Posterior Fermentación. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Cartagena. Universidad de San Buenaventura. Facultad de Ingeniería, Arquitectura, Arte y Diseño. Departamento de Química. 2012. 53 p.
46. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Método para Determinar el Contenido de Alcohol Etilico en Cerveza. NTC 3952. Bogotá, D.C. El Instituto. 2002. 7-8 p.
47. GUTIÉRREZ VALENCIA, Tania Milena. Práctica 7: Determinación de Etanol en Bebidas Alcohólicas por CG-FIN. Popayán. Universidad del Cauca. 2013.
48. HORTON, Douglas. La Papa: producción, comercialización y programas. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima Hemisferio Sur, Montevideo. 1992. 98 p.
49. AYALA, Guido. Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. En: Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 1993-2003. 109 p.
50. DOS SANTOS SOBRIHNO, Viviane; FERREIRA da SILVA, Valeria Cristina y PASCOLI CEREDA, Marney. Fermentation of sugar cane juice (*Sacharum officinarum*) cultivar RB 7515 by wild yeasts resistant to UVC. Journal of Biotechnology and Biodiversity. Campo Grande. 2011. 13 p.
51. MILLER, James N. y MILLER Jane C. Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica. 4 ed. Editorial Prentice Hall. España. 2000. 278 p.
52. AOAC INTERNATIONAL. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002. 19 p.
53. CHANDLER, Cintia; VILLALOBOS, Nercy; GONZÁLEZ, Eduardo; ARENAS, Elsy; MÁRMOL, Zulay; RÍOS, Josybel y MAZZARRI, Cateryna Aiello. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. MULTICIENCIAS. 2012. 251 p.
54. RAMÍREZ NIETO, Gabriel Mauricio y PEDROZA FLOREZ, Julián Felipe. Desarrollo de una Fermentación Alcohólica a pH Regulado y Temperatura de 25 °C en el Biorreactor Bioflo 3000 M1227 y Estudio Inicial de Fermentaciones en Sistema Continuo. Trabajo de grado Ingeniero de Producción Agroindustrial. Bogotá, D.C. Universidad de la Sabana. Facultad de Ingeniería de Producción Agroindustrial, 2001. 10 p.
55. LIN, Yan; ZHANG, Wei; LI, Chunjie; SAKAKIBARA, Kei; TANAKA, Shuzo y KONG, Hainan. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. Biomass and Bioenergy. Shanghai. 2012. 5 p.

56. GUIGOU, Mairan. Producción de Bioetanol Combustible a partir de Boniato. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de la Republica. Facultad de Ciencias, 2011, 52-53 p.



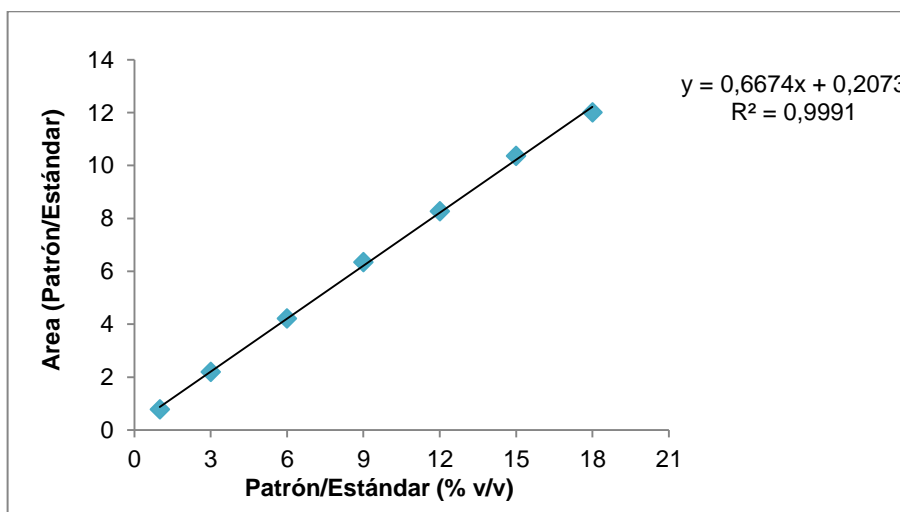
## ANEXO A

### Tabla y Curva de Resultados para Determinación de Etanol por CG-FID

Tabla de calibración para para datos de determinación de etanol (%v/v)

Masa (mg/L) Patrón	Masa (mg/L) Estándar	Masa (%v/v) Patrón/Estándar	Área Patrón/Estándar
10000	10000	1	0,7743
30000	10000	3	2,1973
60000	10000	6	4,2117
90000	10000	9	6,3446
120000	10000	12	8,2664
150000	10000	15	10,3587
180000	10000	18	12,0135

Curva de calibración para para datos de determinación de etanol (%v/v)



## ANEXO B

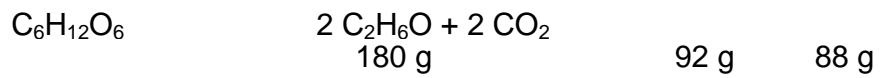
### Eficiencia Global del Proceso de Hidrólisis y Fermentación <sup>[56]</sup>

Dónde:

$C_{ef}$ : Concentración de Etanol ( $\text{g L}^{-1}$ )

$V_{Ff}$ : Volumen Final de Fermentación (L)

De la reacción de fermentación tenemos que:



**Tabla de rendimientos del proceso de Fermentación a partir de almidón de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca" con una eficiencia de hidrólisis del 88,45%**

Etanol (%) *	Almidón (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tiempo (Días)	pH	Eficiencia Global (%)
1,70	25	25	2	4	11,89 ± 0,22
4,53	25	30	2	4	31,67 ± 0,93
4,36	25	25	5	4	30,47 ± 0,59
10,76	25	30	5	4	75,21 ± 0,90
3,78	25	25	8	4	26,40 ± 1,05
11,74	25	30	8	4	82,06 ± 0,97
10,76	50	25	2	4	37,61 ± 0,73
3,88	50	30	2	4	13,57 ± 0,16
12,58	50	25	5	4	43,97 ± 0,78
12,55	50	30	5	4	43,86 ± 1,54
5,68	50	25	8	4	19,85 ± 0,19
16,47	50	30	8	4	57,58 ± 1,45
3,97	75	25	2	4	9,25 ± 0,28
5,32	75	30	2	4	12,39 ± 0,22
16,84	75	25	5	4	39,25 ± 1,52
13,93	75	30	5	4	32,46 ± 0,77
10,87	75	25	8	4	25,34 ± 0,45
19,03	75	30	8	4	44,34 ± 0,61
14,56	25	25	2	5	101,83 ± 3,17
10,54	25	30	2	5	73,66 ± 1,10
6,87	25	25	5	5	48,00 ± 1,87
9,05	25	30	5	5	63,25 ± 1,31
6,26	25	25	8	5	43,77 ± 0,53
6,96	25	30	8	5	48,65 ± 1,77
4,01	50	25	2	5	14,01 ± 0,49
14,53	50	30	2	5	50,79 ± 1,42
4,97	50	25	5	5	17,37 ± 0,22
15,24	50	30	5	5	53,28 ± 1,35
16,91	50	25	8	5	59,10 ± 0,07
12,58	50	30	8	5	43,98 ± 0,22
14,02	75	25	2	5	32,66 ± 1,08
14,29	75	30	2	5	33,31 ± 0,90
16,27	75	25	5	5	37,92 ± 0,16
18,27	75	30	5	5	42,58 ± 1,13
16,97	75	25	8	5	39,54 ± 0,41
14,20	75	30	8	5	33,09 ± 0,44

\*Porcentaje de Etanol en función del promedio

**Tabla de eficiencia global del proceso de Fermentación a partir de *Oxalis tuberosa* Molina "Oca"**

Etanol (%)	Oca (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tiempo (Días)	pH	Eficiencia Global (%)
6,27	500	25	15	4,5	21,92 ± 1,29